

**Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas**

**Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
Águas de Moura**

**Fátima Cristina Bacellar Figueira**

**RICKETTSIAS  
ISOLADAS EM PORTUGAL**

**Contribuição para a identificação  
e classificação de estirpes**

**Dissertação para Obtenção de Grau de Doutor em Biologia**

**Universidade de Évora**

**1996**

**Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas**

**Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge  
Águas de Moura**

**Fátima Cristina Bacellar Figueira**

**RICKETTSIAS  
ISOLADAS EM PORTUGAL**

**Contribuição para a identificação  
e classificação de estirpes**



83440

**Dissertação para Obtenção de Grau de Doutor em Biologia**

**Universidade de Évora**

**1996**

11  
1152

*"O que vem depois de mim é maior do que eu,  
porque existia antes de mim".*

São João, 1, 1-18.

# ÍNDICE

## OBJECTIVOS

## CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS RICKETTSIAS

I. EVOLUÇÃO DA TAXONOMIA .....	15
II. SISTEMÁTICA .....	23
1. Classificação Clássica .....	25
1.1. Ordem Rickettsiales Gieszczykiewicz 1939 .....	25
1.2. Família Rickettsiaceae Pinkerton 1936 .....	27
1.3. Tribo <i>Rickettsieae</i> Philip 1953 .....	27
1.4. Género <i>Rickettsia</i> da Rocha Lima 1916 .....	28
2. Classificação Molecular .....	31
2.1. Filogenia .....	31
2.2. Taxonomia por estudos genéticos do género <i>Rickettsia</i> .....	32
2.3. Classificação de rickettsias do grupo das febres exantemáticas Metodologias mais utilizadas .....	34
3. Considerações .....	40
III. BIOLOGIA .....	45
1. Introdução .....	47
2. Fisiologia .....	47
3. Morfologia, Estrutura e Composição Química .....	52
4. Considerações .....	55
IV. RICKETTSIAS PATOGÉNICAS PARA O HOMEM .....	57
1. Introdução .....	59
2. <i>Rickettsia prowazekii</i> da Rocha Lima, 1916 .....	59
3. <i>Rickettsia typhi</i> Wolbach e Todd, 1920 .....	61
4. <i>Rickettsia rickettsii</i> (Wolbach, 1919) Brumpt, 1922 .....	62
5. <i>Rickettsia conorii</i> Brumpt, 1932 .....	64
6. <i>Rickettsia sibirica</i> Zdrodovskij, 1949 .....	69
7. <i>Rickettsia australis</i> Philip, 1950 .....	70
7.1. FISF ("Flinders Island Spotted Fever") .....	71
8. <i>Rickettsia japonica</i> Uchida, Uchiyama, Kumano e Walker, 1992 .....	72
9. <i>Rickettsia africana</i> Kelly, Beati, Matthewman, Roux e Raoult, 1996 .....	73
10. <i>Rickettsia akari</i> Huebner, Jellinson e Pomerantz, 1946 .....	75
11. Considerações .....	77
V. RICKETTSIAS ISOLADAS DE IXODÍDEOS .....	79
1. Introdução .....	81
2. <i>Rickettsia montana</i> Lackman, Bell, Stoenner e Pickens, 1965 .....	81
3. <i>Rickettsia parkeri</i> Lackman, Bell, Stoenner e Pickens, 1965 .....	82
4. <i>Rickettsia rhipicephali</i> Burgdorfer, Brinton, Krynski e Philip, 1978 .....	82
5. <i>Rickettsia slovaca</i> Urvolgyi e Brezina, 1978 .....	83
6. <i>Rickettsia helvetica</i> Beati, Péter, Burgdorfer, Aeschlimann e Raoult, 1993 .....	84
7. <i>Rickettsia canada</i> McKiel, Bell e Lackman, 1967 .....	85
8. <i>Rickettsia bellii</i> Philip, Casper, Anacker, Cory, Hayes, Burgdorfer e Yunker, 1983 .....	86
9. <i>Rickettsia massiliae</i> Beati e Raoult, 1993 .....	88
10. Outras rickettsias isoladas de ixodídeos .....	88
10.1. "Agente 364-D" .....	88
10.2. "Agente isolado de <i>Dermacentor parumapertus</i> " .....	89
10.3. "Agente de Tillamook" .....	89
10.4. "Agente WB-8-2" .....	89
10.5. "Agente East Side" .....	89
10.6. " <i>Rickettsia heilongjiangi</i> " .....	90
10.7. Tifo da carraça da Tailândia, " <i>Thai tick typhus</i> ", Ttt .....	90
10.8. Tifo da carraça do Paquistão, " <i>Pakistani tick typhus</i> ", Ptt .....	90
10.9. Mtu5 .....	91
10.10. Agente S .....	91
11. Considerações .....	92

RESULTADOS	
I. RESULTADOS DA ANÁLISE DOS IXODÍDEOS CAPTURADOS .....	173
II. RESULTADOS DO TESTE DOS HEMÓCITOS .....	181
III. ISOLAMENTO DE RICKETTSIAS POR "SHELL VIAL" .....	187
1. Isolamento a Partir de Ixodídeos .....	189
2. Isolamento a Partir de Sangue Humano .....	192
3. Isolamento a Partir de Órgãos de Micromamíferos .....	193
IV. RESULTADOS DA IDENTIFICAÇÃO E CLASSIFICAÇÃO POR MICROIMUNOFUORESCÊNCIA DAS ESTIRPES ISOLADAS .....	195
1. Estirpes Isoladas de Humanos .....	197
2. Estirpes Isoladas de Ixodídeos .....	198
2.1. Estirpes isoladas de <i>D. marginatus</i> .....	198
2.2. Estirpes isoladas de <i>R. sanguineus</i> .....	206
2.3. Estirpes isoladas de <i>R. turanicus</i> .....	210
2.4. Estirpe isolada de <i>I. ricinus</i> .....	213
2.5. Estirpe isolada de <i>I. ventalloi</i> .....	213
2.6. Estirpe isolada de <i>H. marginatum</i> .....	214
3. Resultado do MIF com Soros Humanos .....	215
V. RESULTADOS DO "PCR-RFLP" DAS ESTIRPES ISOLADAS .....	217
1. Espécies Padrão .....	219
2. Estirpes Isoladas de Humanos .....	224
3. Estirpes Isoladas de Ixodídeos .....	225
3.1. Estirpes Isoladas de <i>D. marginatus</i> .....	225
3.2. Estirpes Isoladas de <i>R. sanguineus</i> .....	230
3.3. Estirpes Isoladas de <i>R. turanicus</i> .....	234
3.4. Estirpes Isoladas de <i>I. ricinus</i> e <i>I. ventalloi</i> .....	237
3.5. Estirpe Isolada de <i>H. marginatum</i> .....	238
VI. RESULTADOS DO ESTUDO POR MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO DE ALGUMAS DAS ESTIRPES ISOLADAS .....	241
1. Espécie Padrão – <i>R. conorii</i> marroquina .....	243
2. Estirpe de <i>R. conorii</i> isolada de <i>R. sanguineus</i> .....	245
3. Estirpe de <i>R. slovacica</i> isolada de <i>D. marginatus</i> .....	248
4. Estirpe isolada de <i>H. marginatum</i> .....	251
5. Estirpe isolada de sangue humano .....	252
VII. RESULTADOS DOS ESTUDOS SEROEPIDEMIOLÓGICOS .....	253
1. Pesquisa de Anticorpos Contra <i>R. conorii</i> em Soros Humanos .....	255
1.1. Diagnóstico serológico de Febre escarar nodular .....	255
1.2. Inquéritos seroepidemiológicos .....	257
1.2.1. Serologia de uma população de doadores de sangue .....	257
1.2.2. Serologia de doentes com diagnóstico de febre de origem indeterminada e outras patologias ..	257
1.2.3. Serologia de populações de grupo de risco .....	258
2. Serologia em População de Animais Domésticos ( <i>Canis familiaris</i> ) .....	259
2.1. Estudo de cães do Canil Municipal de Setúbal .....	259
2.2. Estudo sazonal da cinética de anticorpos em cães .....	260
3. Serologia em Micromamíferos .....	263
3.1. Estudo realizado na Marateca .....	263
3.2. Estudo realizado no Monte de Pancas .....	266
3.3. Estudo realizado em Montemor-o-Velho .....	266
DISCUSSÃO DOS RESULTADOS .....	269
SINOPSE E RECOMENDAÇÕES/SUMMARY AND RECOMMENDATIONS .....	283
ANEXO .....	289
BIBLIOGRAFIA .....	293
AGRADECIMENTOS .....	323
ÍNDICE DE FIGURAS e TABELAS .....	325

## ERRATA

Página	Onde se lê	Leia-se
26 Tabela II	<i>Rickettsia</i> eae <i>Ehrlichia</i> eae <i>Wolbachia</i> eae	<i>Rickettsie</i> ae <i>Ehrlichie</i> ae <i>Wolbachie</i> ae
49 Linha 26	destruiriam	destroem
51 Linha 3	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. rickettsii</i> e <i>R. conorii</i>
61 Linha 12	infecto-contagiosa	infecciosa, com
67 Linha 20	selvagens	silváticos
74 Linha 26	selvagens	silváticos
81 Linha 1	classificados	agrupados
120 Linha 24	descreveu	descreveram
121 Linha 26	1992	1991
125 Linha 17	1992	1991
139 Linha 5	2 mm	5 mm
153 Linha 9	IgM 1:4	IgM 1:40
165 linha 10	5	3
184 Figura 11a	-	(10x100)
184 Figura 11b	-	(10x40)
191 Tabela XIII	<i>R. rattus</i>	<i>R. norvegicus</i>
240 Fig. 26b Leg.	-	3- <i>R. rhipicephali</i>
244 Legenda	-	— = 1 $\mu$ m
246 Legenda	-	— = 1 $\mu$ m
249 Legenda	-	— = 1 $\mu$ m
251 Legenda	-	— = 1 $\mu$ m
252 Legenda	-	— = 1 $\mu$ m
266 Linha 8	tabela XXX	tabela XXXI
267	Tabela XXXI	Tabela XXXII
276 Linha 12	necessita de ter os resultados ...	necessita de ter os resultados comprovados por outras técnicas. A caracterização genética do segmento de um gene funcional (o gene da enzima citrato sintetase e do segmento do gene que codifica a proteína antigénica rOmp A de 190 kDa permitiu confirmar a identificação das estirpes, realizada por microimunofluorescência. Isto porque em ambas as metodologias se estudam, de duas maneiras, as mesmas macromoléculas. A caracterização genética tem a vantagem de ser mais objectiva do que a caracterização sero-imunológica por analisar o genoma directamente e não depender do observador e, utilizando os mesmos materiais e os mesmos padrões, podem obter-se resultados ...
291 Linha 3	Vero 76	Vero E6
291 Linha 22	107 células	10 <sup>7</sup> células

# **OBJECTIVOS**

*"In past years, rickettsiae have been of major interest primarily because of the human disease they produced. These diseases, at least temporarily, are largely controlled... The problems of the nature of parasitism and commensalism remain."*

R. A. Ormsbee, *Rickettsiae (as organisms)*, 1969

A Organização Mundial de Saúde coordena um programa intitulado "*Global Surveillance of Rickettsial Diseases*" para onde são enviadas, embora sem carácter obrigatório, as informações sobre as rickettsioses que ocorrem por todo o mundo. A razão desta vigilância reside no facto de nenhum agente etiológico ter sido erradicado embora na presente era dos antibióticos, aparentemente, estejam sob controlo. Nesta dissertação, consideram-se como rickettsioses apenas as afecções causadas por microrganismos do género *Rickettsia* e não aquelas que são devidas à infecção por qualquer outro agente da Ordem Rickettsiales, por vezes também denominados rickettsias, como é o caso de *Ehrlichia* sp., *Coxiella burnetti* e *Bartonella* sp. (ex-*Rochalimaea*).

Em Portugal, são reconhecidas como rickettsioses: o tifo epidémico, o tifo endémico ou murino e a Febre escaro nodular (popularmente designada por febre da carraça). Nos últimos 30 anos, apenas a Febre escaro nodular tem tido expressão em Saúde Pública no nosso País. Esta doença tem como agente etiológico *Rickettsia conorii*, cujo artrópodo vector é o ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* (a carraça do cão). Em outras regiões do mundo foi demonstrado que os ixodídeos podem estar parasitados por diversas espécies de rickettsias; algumas destas bactérias são conhecidas pela sua patogenicidade para o homem e para o cobaio (animal de eleição para o seu estudo), enquanto outras são consideradas agentes não patogénicos.

Em virtude dos conhecimentos sobre a ixodofauna portuguesa terem sido dirigidos essencialmente para as áreas de sistemática e ecologia, o papel destes artrópodos na manutenção e transmissão de agentes infecciosos só tem sido abordado ocasionalmente. Devido a esta lacuna, especialmente no que respeita à relação ixodídeo-rickettsia, os objectivos fundamentais que presidiram à elaboração desta dissertação foram os seguintes:

1. a detecção de rickettsias em ixodídeos;
2. o isolamento destas bactérias em cultura "*in vitro*";
3. a caracterização, identificação e classificação das estirpes de rickettsia isoladas.



Contudo, no decurso dos trabalhos de investigação, foi possível abordar outros aspectos relacionados com as rickettsias, nomeadamente a utilização de material humano para isolamento de estirpes, o estudo por microscopia electrónica de transmissão destas bactérias e, ainda, estudos seroepidemiológicos, realizados com o objectivo de determinar a incidência e a prevalência da Febre escaro nodular em populações humanas e animais.

Devido à ausência de bibliografia actualizada, em língua portuguesa, sobre este assunto foi considerado de interesse que, na presente dissertação, existisse uma primeira parte onde se apresentasse uma revisão dos conhecimentos gerais, focando diversos aspectos a propósito da identidade, biologia e ecoepidemiologia das rickettsias. A sequência desta primeira parte consistiu nos seguintes temas:

- a) a apresentação dos conhecimentos clássicos e actuais acerca da identidade e classificação das rickettsias, com os dados introduzidos pela utilização de técnicas de biologia molecular;
- b) em fornecer algumas noções sobre a biologia destas bactérias parasitas obrigatórias;
- c) a discriminação das espécies patogénicas para o Homem e das espécies isoladas de ixodídeos consideradas não patogénicas, com um pequeno historial sobre cada uma;
- d) a referência a alguns aspectos sobre os vectores e reservatórios artrópodos e sobre os vertebrados implicados no ciclo biológico destes microrganismos;
- e) a recolha de dados sobre o estudo do género *Rickettsia* em Portugal.

Cada tema foi tratado como uma unidade, com estrutura própria e com algumas considerações à maneira de conclusões parciais.

Na segunda parte da dissertação descreveram-se o material e os métodos utilizados para alcançar os objectivos propostos e apresentaram-se os resultados obtidos. Procurou-se discutir estes resultados e retirar uma conclusão geral sobre a problemática da existência de rickettsias e da sua circulação no território Português.

A bibliografia citada constou dos trabalhos antigos, fundamentais para a compreensão da evolução dos estudos em rickettsiologia, e dos trabalhos publicados mais recentemente que contivessem contribuições significativas, especialmente na área da biologia molecular.

# **CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS RICKETTSIAS**



# **I**

## **Evolução da Taxonomia**



*"The Rickettsiae needed a name for themselves because they cannot be logically grouped either with the bacteria or with the Protozoa. In the end they will probably be found closely related to the true bacteria..."*

Hans Zinsser, *Rats, Lice and History*, 1935.

A classificação das bactérias iniciou-se nos séculos XVII e XVIII quando o mundo microscópico foi posto em evidência e cedo foi compreendido que o desenvolvimento de métodos simples para a obtenção de culturas puras seria essencial ao progresso da Microbiologia. Um dos grandes impulsionadores desta ciência foi Robert Koch (1843-1910) que estabeleceu o método de placas feitas com ágar fundido para isolamento e cultura de bactérias. Os microrganismos, assim isolados, foram então identificados tendo como critérios de classificação as características fenotípicas das colónias que formavam nas placas de ágar, as fontes nutricionais que exigiam para o seu crescimento e os seus processos metabólicos (Logan, 1994).

Koch, como é sabido, dedicou grande parte dos seus estudos às bactérias patogénicas para o Homem, formulando os postulados que se tornaram condição essencial para que um determinado microrganismo fosse aceite como agente causal de uma doença específica. Assim, além da presença constante do microrganismo nos tecidos do hospedeiro naturalmente infectado, exigia-se que aquele fosse isolado artificialmente, em cultura pura, e que, após numerosas subculturas, pudesse reproduzir a doença específica quando inoculado num hospedeiro receptivo (Brock *et al*, 1994).

No início deste século tornou-se evidente a existência de agentes patogénicos, parasitas intracelulares obrigatórios, que eludiam alguns dos postulados de Koch: apresentavam características de bactérias Gram negativas, eram retidos por filtros e observáveis ao microscópio óptico comum após coloração, porém não eram isolados nem cultivados em meios artificiais do mesmo modo que os vírus (Weiss, 1973; Harden, 1987). A estes microrganismos chamaram rickettsias e foi dada uma definição que, nas suas linhas gerais, tem persistido até aos nossos dias. Assim, nos manuais de Microbiologia, o termo rickettsia é utilizado indiscriminadamente para descrever "qualquer microrganismo, com aparência de bactéria Gram negativa, que cresça intracelularmente e que não seja possível cultivar em meios de cultura bacteriológicos sintéticos, e que esteja associado a artrópodos e por vezes a outros invertebrados ou a protozoários, durante o seu ciclo de vida".

Para a sistemática clássica de rickettsias, além da comparação dos caracteres fenotípicos e do metabolismo, foi relevante o estudo da ecoepidemiologia (espécies de vectores, distribuição geográfica e patogenia para o Homem ou para o animal de laboratório) e um método de estudo serológico, a denominada reacção de Weil Felix, que analisa a capaci-

dade de aglutinação de bactérias do género *Proteus* com o soro de indivíduos que tiveram contacto com rickettsias diversas (Weil e Felix, 1916; Bengston, 1948).

Um dos primeiros sistemas de classificação de rickettsias apareceu no clássico “*Précis de Parasitologie*” de Brumpt. Numa lista de “*parasites intracellulaires ou libres a affinités incertaines*” (sic) estes microrganismos eram descritos como agentes de doença humana e de animais, sendo agrupadas várias entidades, hoje reconhecidas como pertencendo a géneros diferentes (Brumpt, 1949).

Em 1923 foi editado, nos Estados Unidos da América do Norte (EUA), o *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* com o objectivo de “... *make the system of classification promulgated by the Society of American Bacteriologists of greater value to students by extending the classification to the individual species of the genera that have been recognized as valid by the Committee*” (sic). Este Manual estabelecia que as regras de classificação a aplicar à Bacteriologia fossem retiradas do “*International Rules of Botanical Nomenclature*”, adoptadas pelos Congressos Internacionais de Viena, em 1905, e de Bruxelas, em 1910. Nesta primeira edição não vinha referenciado o grupo das rickettsias.

Em 1948, num suplemento da 6ª edição deste Manual, as Rickettsiales e Borreliomycetaceae vêm citadas, pela primeira vez, juntamente com o grupo Virales. À ordem Rickettsiales pertenciam duas famílias: Rickettsiaceae, com o género *Rickettsia* e Bartonellaceae incluindo os géneros *Bartonella* e *Grahamella*. Na família Rickettsiaceae encontravam-se já descritas e caracterizadas as seguintes espécies: *Rickettsia prowazekii*, *R. typhi*, *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. tsutsugamushi*, *R. akari*, *Coxiella burnetii* e *Cowdria ruminantium*. Num apêndice deste Manual encontravam-se ainda *Rickettsia quintana* e vários agentes que hoje são reconhecidos como pertencendo a outros grupos. A ordem Rickettsiales era descrita como agrupando: “*microrganismos pequenos, com a forma de bastonetes, cocos, esféricos ou irregulares, que coram fracamente com derivados de anilina. Gram negativos. Geralmente não filtráveis. Cultivados apenas em tecidos vivos, ovos embrionados ou, mais raramente, em meios que contenham fluídos corporais. Organismos parasitas, associados a células de tecidos e eritrócitos, principalmente de vertebrados e mais raramente de artrópodos, os quais actuam como vectores. Parasitas intracelulares, classificados como Protozoa possivelmente pertencem a este grupo. Podem causar doenças ao Homem, a animais, ou a ambos*” (Bengston, 1948).

Na 7.ª edição do Manual, em 1957, os editores referiram: “...*our knowledge of the still smaller types of parasitic and pathogenic organisms such as the numerous kinds of organisms found in the Rickettsiales and Virales is still more inadequate than our knowledge of the true bacteria in the first edition...*” (sic). A descrição da ordem é semelhante à da edição de 1948 (Philip, 1957).

A edição de 1984 foi considerada, pelos editores, como a primeira do *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, devido ao facto de no seu conteúdo constarem não só as chaves

e tabelas de classificação, mas também informações detalhadas sobre a ecologia, isolamento, descrição da espécie e das suas características determinativas, além de comentários sobre taxonomia. Nesta edição, a secção 9 é dedicada às Rickettsias e Chlamydias (Krieg e Holt, 1984).

Os microrganismos que constituem as Ordens Rickettsiales e Chlamydiales têm como característica classificativa comum serem parasitas de células eucarióticas. As clamídias diferenciam-se das rickettsias por parasitarem primariamente células de mamíferos e serem transmitidas de hospedeiro vertebrado a hospedeiro vertebrado, sem a intervenção biológica de um artrópodo vector (Williams e Vodkin, 1987).

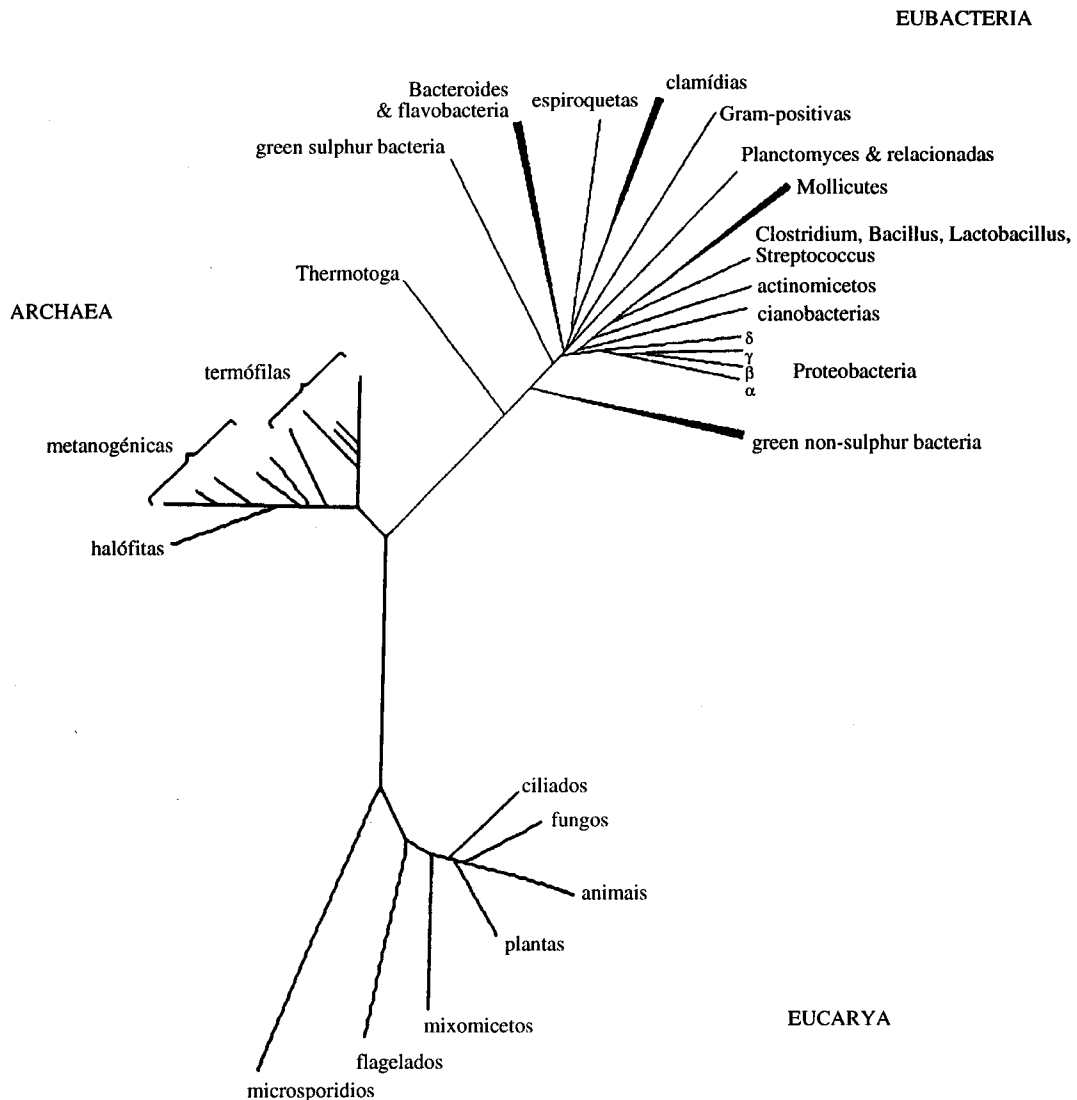
Vários foram os factores que impediram que o estudo das rickettsias progredisse ao mesmo ritmo que o das outras bactérias. O mais importante foi o carácter de parasitas obrigatórios de células e a dificuldade de serem separadas dos componentes das células hospedeiras, mantendo a sua integridade. O consenso, existente entre os taxonomistas, de aplicar aos microrganismos o sistema de classificação dos metazoários, criado por Lineu, também dificultou a sistemática deste grupo, já que o conceito de espécie de bactéria não inclui a sexualidade e o isolamento reprodutor, como acontece na definição de espécie eucariota. Nas classificações mais actuais considera-se que uma espécie bacteriana consiste no conjunto formado por uma estirpe padrão e todas as outras estirpes que são suficientemente semelhantes a ela (Krieg e Holt, 1984; Logan, 1994). São estes critérios de semelhança que ao longo dos anos têm variado, e com eles, os diferentes sistemas de classificação.

Nestas duas últimas décadas, em grande parte devido ao desenvolvimento de técnicas de estudo dos ácidos nucleicos e da sua aplicação em estudos de sistemática, emergiu uma taxonomia baseada na filogenia dos seres vivos. As bactérias, e os outros seres vivos, passaram a ser classificados não pela morfologia e caracterização bioquímica das estirpes, mas pelas relações filogenéticas que apresentam entre si, numa perspectiva evolutiva (Woese, 1987; Olsen *et al.*, 1994; Ahern, 1994).

Um critério de classificação molecular, muito utilizado em estudos filogenéticos, tem sido a análise da sequência do ácido desoxiribonucleico (ADN) que codifica as subunidades 16S e 23S do ácido ribonucleico ribossómico (rARN) (Woese *et al.*, 1983; Amnan *et al.*, 1994). O rARN existe em todos os seres vivos e desempenha, em todos eles, a mesma função na síntese proteica; por esta razão, é considerado como um bom padrão para análise e comparação dos diferentes grupos de seres vivos (Fox *et al.*, 1980). A informação genética, como critério taxonómico, foi julgada mais precisa e fiável, além de que os diversos estudos (e resultados) poderiam ser facilmente comparados e reproduzidos. As sequências das bases nucleotídicas dos genes, obtidas de diferentes organismos, podem ser comparadas pela consulta de bancos de dados informatizados e às relações de parentesco definidas pelas percentagens de semelhanças entre elas (Woese, 1987).



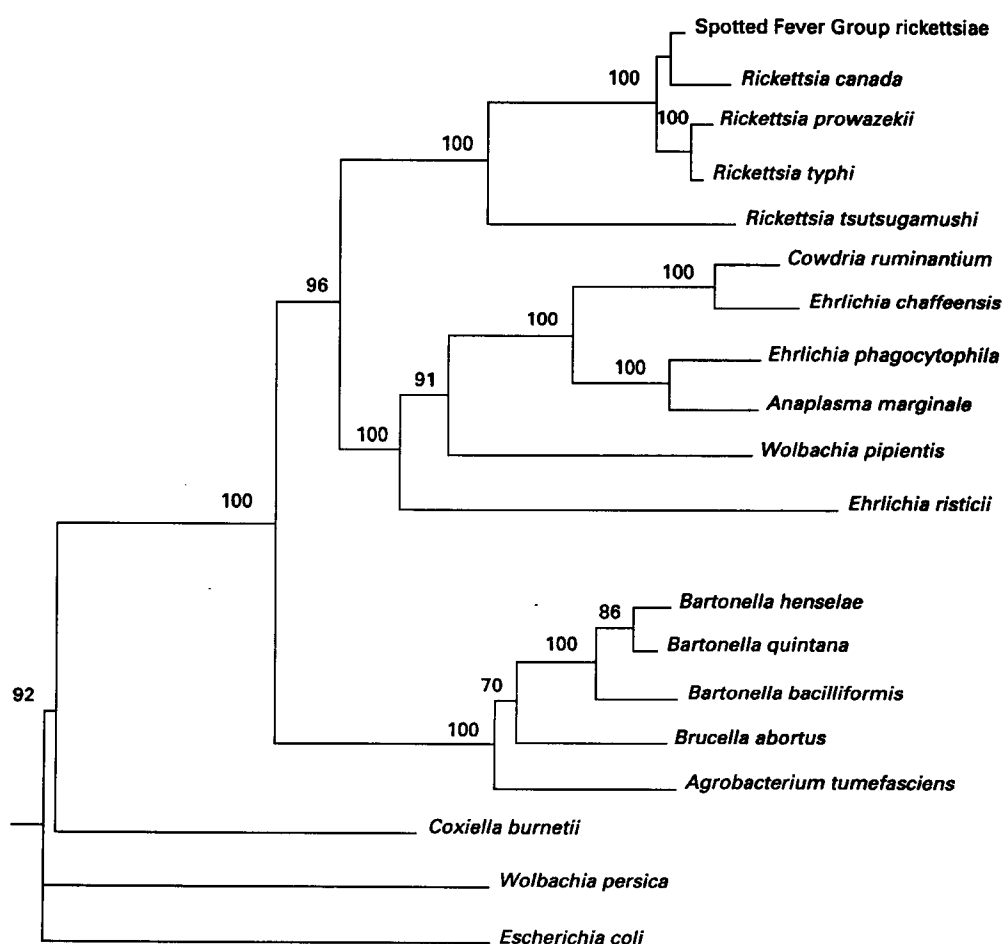
Na figura 1 apresenta-se a árvore filogenética dos seres vivos elaborada de acordo com este critério. Ao Domínio Eucaria pertencem os actuais eucariotas: plantas verdes, animais, fungos, ciliados, dinoflagelados, entre outros; o Domínio Archea compreende as bactérias termoacidófilas, as metanogénicas e as halófitas; o Domínio Eubacteria ou Bacteria abrange as bactérias Gram positivas, as Gram negativas, as cianobactérias, as espiroquetas, as clamídias, entre outras (Woese *et al*, 1990). Na figura 1 apresenta-se a árvore filogenética dos seres vivos elaborada de acordo com este critério.



**Figura 1. Filogenia dos seres vivos elaborada pela análise do 16S rARN.**

adaptado de Woese *et al*, 1990

Neste sistema, as rickettsias são classificadas como pertencendo ao Domínio Eubacteria, divisão Proteobacteria (vulgarmente conhecidas por “purple bacteria”), subdivisão  $\alpha$ , juntamente com alguns microrganismos fenotípica e ecologicamente afastados (Weisburg *et al*, 1985; 1989). A subdivisão  $\alpha$  agrupa as bactérias não fotossintéticas, que estabeleceram associações intrínsecas com vários eucariotas, com tendência para se tornarem intracelulares. Encontram-se neste grupo, entre outros, os endossimbiontes que deram origem às mitocôndrias eucariotas, as rizobactérias (essenciais para fixação do azoto nas leguminosas), as agrobactérias (patogénicas para plantas), as brucelas e as rickettsias. (Woese, 1987). A posição filogenética dos membros da Ordem Rickettsiales pode ser observada na figura 2. Esta árvore filogenética foi criada considerando como limite de diferenciação entre as espécies do grupo  $\alpha$  das Proteobactérias uma variação de 5-10% na sequência das bases nucleotídicas do ADN que codifica a subunidade 16S do rARN (Drancourt e Raoult, 1994; Roux e Raoult, 1995).



**Figura 2.** Classificação filogenética da Ordem Rickettsiales e espécies relacionadas. Segundo Roux e Raoult, 1995

A emergência da classificação dos microrganismos com base na biologia molecular, levou a que, em 1987, o “*Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approches to Bacterial Systematics*” publicasse algumas normas de trabalho. Foi acordado que a técnica padrão para determinar a filogenia seria a sequenciação da molécula de ADN total e que a filogenia determinaria a taxonomia. A única categoria taxonómica que poderia ser definida em termos filogenéticos seria a espécie e a definição filogenética de espécie deveria incluir apenas as estirpes com aproximadamente 70% ou mais de semelhança de hibridação de ADN total, em condições padronizadas. No final, seria a presença ou ausência de coerência fenotípica, entre as estirpes, o factor que deveria decidir se pertencem ou não a uma mesma espécie (Wayne *et al*, 1987). Por extrapolação, muitos autores consideram que as espécies com 97% ou mais de homologia na sequência no ADN que codifica a subunidade 16S do rARN têm identidade de sequências do ADN total de mais de 70% e, por consequência, pertencem à mesma espécie (Stackebrandt e Goebel, 1994).

Com o aperfeiçoamento das técnicas de biologia molecular e a facilidade de analisar os ácidos nucleicos, sem a necessidade premente de obter “culturas puras” dos microrganismos, o estudo das rickettsias tem avançado (Relman, 1993; Amnan *et al*, 1994). Hoje em dia, aceita-se que as rickettsias são bactérias que se especializaram em nichos ecológicos muito restritos e que o seu ciclo natural depende apenas de um hospedeiro, geralmente um artrópodo.

**II**  
**Sistemática**



*"The fact is too often lost sight of that Nature evolved but did not classify; man did that for his own convenience, though sometimes it seems more to his inconvenience ..."*

Cornelius B. Philip, Comments on the classification of the Order Rickettsiales, 1956.

## 1. CLASSIFICAÇÃO CLÁSSICA

Este trabalho de revisão sobre a sistemática das rickettsias será fundamentado nos dados da edição de 1984 do Manual de Bacteriologia Sistemática de Bergey (Krieg e Holt, 1984). Como já foi referido, as rickettsias encontram-se descritas na secção 9 deste Manual, juntamente com as clamídias. Pretende-se apresentar nesta parte da dissertação uma tradução livre do que se encontra descrito sobre as rickettsias naquele Manual. Apresenta-se, também, uma compilação dos dados sobre os novos critérios de classificação com base na biologia molecular e os seus resultados, referindo as espécies identificadas após 1984, aceites como válidas pelo "*International Journal of Systematic Bacteriology*", bem como as várias estirpes ainda sem nomenclatura oficial.

### 1.1. Ordem Rickettsiales Gieszcwkiewicz 1939

(revista por E. Weiss e J.W. Moulder, 1984)

Microorganismos Gram negativos, com forma de bastonete ou cocos, frequentemente pleomórficos, com parede celular tipicamente bacteriana e sem flagelo. Multiplicam-se apenas dentro de células hospedeiras. Podem ser cultivados em tecidos vivos tais como: ovos de galinha embrionados ou células de metazoários em cultura. A divisão por fissão binária é comum a todos os membros da Ordem, enquanto que as outras características admitem excepções. Por exemplo, são incluídos microorganismos com forma anelar, com flagelo, Gram positivos, e/ou que se multiplicam em meios bacteriológicos sintéticos de complexidade moderada. Todos são parasitas ou mutualistas. As formas parasitárias podem estar associadas a eritrócitos, às células endoteliais vasculares ou com o sistema reticuloendotelial de vertebrados e, frequentemente, com vários órgãos de artrópodos, os quais actuam como vectores ou hospedeiros primários. Podem causar doenças ao Homem ou a outros hospedeiros vertebrados e invertebrados. As formas mutualistas de insectos têm um papel essencial no desenvolvimento e reprodução destes animais.

Na Ordem Rickettsiales, para além das famílias Rickettsiaceae e Bartonellaceae, foi incluída a família Anaplasmataceae. As características diferenciais destas famílias encontram-se sumarizadas na tabela I e a classificação taxonómica encontra-se na tabela II. Os autores desta classificação ressaltam que muitos microorganismos com características de rickettsias, permanecem classificados apenas parcialmente ou simplesmente não classificados.



**Tabela I. Características diferenciais das Famílias da Ordem Rickettsiales**

Características	<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Bartonellaceae</i>	<i>Anaplasmataceae</i>
Parede celular trilaminar	+	+	-
Cultivo axénico	-	+	-
Associação com células de vertebrados:			
células nucleadas	+	+	-
eritrócitos	-	+	+

adaptado de Weiss e Moulder, 1984.

Os organismos incluídos na família *Rickettsiaceae* distinguem-se por se reproduzirem em células nucleadas de vertebrados e de invertebrados, e não em eritrócitos, como os membros das outras duas famílias. Parasitam preferencialmente as células endoteliais e os leucócitos de vertebrados (Weiss e Moulder, 1984). Apesar de tanto vertebrados como invertebrados surgirem como hospedeiros para as bactérias da família *Rickettsiaceae*, alguns autores consideram que a sua associação com estes últimos seria evolutivamente mais antiga já que os artrópodos, com excepção do piolho, não apresentam patologias evidentes associadas à infecção por estes microrganismos (Hoogstraal, 1967; Friedhoff, 1990).

**Tabela II. Taxonomia da Ordem Rickettsiales**

Família	Tribo	Género	Grupo
<i>Rickettsiaceae</i>	<i>Rickettsiiaeae</i>	<i>Rickettsia</i>	Tifo
		<i>Orientia</i>	Febres exantemáticas
		<i>Coxiella</i>	
	<i>Ehrlichiaeeae</i>	<i>Ehrlichia</i>	
		<i>Cowdria</i> <i>Neorickettsia</i>	
	<i>Wolbachiaeeae</i>	<i>Wolbachia</i>	
<i>Rickettsiella</i>			
<i>Bartonellaceae</i>		<i>Bartonella</i> <i>Grahamella</i>	
<i>Anaplasmataceae</i>		<i>Anaplasma</i> <i>Aegyptionella</i> <i>Haemobartonella</i>	

adaptado de Drancourt e Raoult, 1994

Devido à natureza deste trabalho, a revisão da literatura será restrita à família Rickettsiaceae.

## 1.2. Família Rickettsiaceae Pinkerton 1936

Microrganismos com forma de bastonete, cocos, diplococos ou pleomórficos, frequentemente associados com os tecidos de artrópodos, geralmente intracelulares. Gram negativos. Com a exceção de *Rochalimaea*, os géneros patogénicos para os vertebrados ainda não foram cultivados em meios sintéticos. Podem ser parasitas do Homem e de outros vertebrados, causando doenças (p.ex. tifo e outras doenças exantemáticas no Homem, ou pancitopenia tropical canina em canídeos) que são transmitidas por artrópodos (pioelhos, pulgas, carraças e ácaros) e, raramente, por outros invertebrados. Alguns são simbiossiontes ou agentes patogénicos exclusivos de hospedeiros invertebrados.

Esta família foi subdividida, tradicionalmente, consoante o hospedeiro infectado, em três tribos: tribo *Ehrlichieae*, tribo *Wolbachieae* e tribo *Rickettsieae*. A tribo *Ehrlichieae* compreendia os organismos que, geralmente, são patogénicos para algumas espécies de animais domésticos. Os membros da tribo *Wolbachieae* são simbiossiontes ou parasitas de invertebrados, não sendo patogénicos para os vertebrados (Weiss *et al*, 1984). Finalmente, os membros da tribo *Rickettsieae* estavam associados, principalmente, a patologias humanas, apesar do Homem ser um hospedeiro acidental funcionando em “fundo de saco” para estas bactérias. Recentemente, algumas alterações têm vindo a ser feitas nesta classificação: na tribo *Ehrlichieae* nos últimos anos foram classificadas algumas espécies isoladas de humanos, *E. chaffeensis* e uma *Ehrlichia*, que parasita os granulócitos, denominada HGE (“human granulocytic *Ehrlichia*”) (Dawson *et al*, 1991; 1996; Bakken *et al*, 1994; Dumler e Bakken, 1995), bem como detectadas algumas espécies novas em animais (Walker *et al*, 1996). Na Europa, a presença de *E. chaffeensis* foi assinalada em Portugal (Morais *et al*, 1993) e de HGE na Suécia e Noruega (Dumler *et al*, 1996). Na tribo *Rickettsieae*, além das espécies patogénicas para o Homem, encontraram-se várias espécies consideradas não patogénicas, pelo facto de terem sido isoladas apenas de artrópodos.

O âmbito desta revisão será restrito à tribo *Rickettsieae*.

## 1.3. Tribo Rickettsieae Philip 1953

Organismos pequenos, pleomórficos, geralmente intracelulares, encontrados em artrópodos e patogénicos para o Homem e para alguns outros hospedeiros vertebrados.



A tribo *Rickettsieae* era dividida até há bem pouco tempo, de acordo com as características fenotípicas do crescimento nas células, em três géneros: *Rickettsia*, *Coxiella* e *Rochalimaea*. Quando associados com células hospedeiras eucarióticas, o crescimento destes microrganismos pode ocorrer livre, no citoplasma ou no núcleo (*Rickettsia*), dentro de fagolisossomas citoplasmáticos (*Coxiella*) ou epicelularmente (*Rochalimaea*). Apenas a única espécie do género *Coxiella*, *C. burnetti*, tem no seu ciclo de vida uma fase de tipo endospórica e uma fase de tipo liso-rugoso, comum às outras bactérias. Adicionalmente, esta última pode ser transmitida por aerossóis, enquanto que os membros de *Rickettsia* e de *Rochalimaea* são transmitidas exclusivamente por artrópodos vectores (Weiss e Moulder, 1984). Recentemente, a classificação do género *Rochalimaea* foi revista pois, por análise filogenética, concluiu-se que estes microrganismos pertenciam ao género *Bartonella*, família *Bartonellaceae* (Brenner *et al*, 1993).

O âmbito desta revisão será restrito ao género *Rickettsia*.

#### 1.4. Género *Rickettsia* da Rocha Lima 1916

Pequenos bastonetes, com 0,3-0,5 µm de diâmetro e 0,8-2,0 µm de comprimento, por vezes, com maiores dimensões, especialmente se a divisão da célula hospedeira for inibida. Geralmente estão envolvidos por uma microcápsula proteica e uma camada mucopolissacárida. Gram negativos. Quando corados pelo método de Giménez retêm a fucsina básica. Considerados não móveis, sem flagelo. Aeróbios. Não foram cultivados na ausência de células. Multiplicação no citoplasma, por vezes no núcleo, de algumas células de vertebrados e artrópodos. Não se multiplicam nos fagossomas. Estabilidade fisiológica mantida por certas proteínas, pela sacarose e por reagentes que conservem a integridade da membrana celular e os níveis de ATP do meio. Instáveis quando separados dos componentes do hospedeiro. Conservam-se melhor por congelação rápida e armazenamento abaixo de 50°C negativos. Rapidamente inactivados a 56°C. Produzem energia pelo metabolismo do glutamato, no ciclo do ácido cítrico, mas não utilizam glucose. Transportam e metabolizam compostos fosforilados, mas não sintetizam ou degradam nucleosídeos monofosfatados. Percentagem do conteúdo molar do ADN em guanina e citosina de 29-33 %. O ciclo biológico envolve, geralmente, um hospedeiro vertebrado e um invertebrado.

Os microrganismos do género *Rickettsia* têm sido classificados em três biotipos distintos. Estes eram, até há bem pouco tempo, o grupo tifo, o grupo das febres exantemáticas e o grupo do tifo fluvial do Japão. O grupo do tifo fluvial do Japão é composto por estirpes definidas antigenicamente (serovariantes) de uma só espécie, *R. tsutsugamushi*. Esta espécie tem propriedades tão próprias que recentemente foi reclassificada em outro género, *Orientia tsutsugamushi* (Tamura *et al*, 1995). O grupo tifo era conhecido por incluir duas espécies patogénicas para o Homem e uma espécie isolada somente de ixodídeos, a qual, actualmente, está colocada numa posição isolada dentro do género. O grupo das febres exantemáticas, presentemente, conta com dez agentes de doenças humanas reconhecidos, oito espécies de patogenicidade desconhecida e, pelo menos, dez estirpes ainda sem nomenclatura oficial (Drancourt e Raoult, 1994).

Em termos gerais, com base nos métodos clássicos de classificação bacteriana, poder-se-ia dizer que o género *Rickettsia* reúne microrganismos diferenciados de acordo com características baseadas em:

- a) factores ecológicos, tais como a distribuição geográfica e o artrópodo vector;
- b) factores biológicos, como o crescimento intracelular, as propriedades que apresentam em culturas celulares (a velocidade de multiplicação e a citopatogenicidade), a patologia que induzem nos humanos e nos animais de laboratório e a actividade hemolítica para eritrócitos de carneiro;
- c) factores bioquímicos, como a razão molar G+C do ADN, e características antigénicas, às quais permitem agrupar os microrganismos em serogrupos e serotipos dentro de cada grupo (Drancourt e Raoult, 1994).

Da leitura da tabela III percebe-se que é relativamente fácil distinguir o grupo das febres exantemáticas, do grupo tifo, tendo em atenção algumas das características aí referidas (Weiss e Moulder, 1984). As doenças causadas pelas rickettsias do grupo tifo, sobretudo o tifo epidémico, ocorreram principalmente no Velho Mundo, sendo consideradas, actualmente, de distribuição mundial. Este grupo inclui duas espécies patogénicas com características semelhantes, transmitidas ao Homem por insectos, *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi* (Weiss e Moulder, 1984). Estas espécies têm uma percentagem de conteúdo molar de G+C de 29-30%, crescem a 35°C e têm actividade hemolítica para os eritrócitos de carneiro. As zonas de destruição celular (placas) que formam nas culturas de células "in vitro" têm um diâmetro inferior a 1 mm e levam dez ou mais dias a tornar-se visíveis. As rickettsias do grupo tifo crescem apenas no citoplasma das células hospedeiras onde se aglomeram em formações compactas (Wisseman e Waddell, 1975; Weiss, 1982; Silvermann, 1991). As espécies do grupo das febres exantemáticas parecem estar associadas à distribuição geográfica dos artrópodos vectores (ixodídeos e ácaros). Há duas espécies patogénicas no grupo das febres exantemáticas consideradas como padrões: *Rickettsia rickettsii*, restrita ao Novo Mundo, e *Rickettsia conorii*, no Velho Mundo. O conteúdo molar G+C é de 32-33%; a temperatura óptima de crescimento varia entre 32-34°C e não apresentam actividade hemolítica para eritrócitos de carneiro. Nas camadas celulares infectadas as placas surgem 5 a 8 dias após a infecção da cultura, atingindo 2-3 mm de diâmetro. O ciclo de infecção celular destas rickettsias caracteriza-se por um crescimento exponencial de curta duração. Depois desta fase, as bactérias saem para o meio extracelular através de extrusões citoplasmáticas, causando lesões pontuais à membrana da célula hospedeira (Wisseman *et al*, 1976; Silverman e Santucci, 1988). Este tipo de multiplicação resulta numa baixa densidade de organismos por célula (20-25 rickettsias); ocasionalmente, o núcleo também é invadido (Burgdorfer *et al*, 1968; Silverman e Wisseman, 1979). Durante o processo degenerativo da célula hospedeira as rickettsias não sofrem grandes alterações morfológicas (Silverman, 1991).

**Tabela III. Características fenotípicas das espécies de *Rickettsia***

Características	Grupo Tifo		Grupo das Febres Exantemáticas														
	<i>R. prowazekii</i>	<i>R. typhi</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. sibirica</i>	<i>R. conorii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. australis</i>	<i>R. akari</i>	<i>R. montana</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. slovaca</i>	<i>R. africae</i>	<i>R. japonica</i>	<i>R. helvetica</i>	<i>R. massilliae</i>	<i>R. canada</i>	<i>R. belli</i>
Distribuição geográfica:																	
- Todo o Mundo	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	o	o	-	-	-	-	
- Somente Hemisfério Ocidental	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	+	o	+	+	+	
- Somente Hemisfério Oriental	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	o	+	-	-	-	-	
Hospedeiro artrópodo:																	
- Piolho	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
- Pulga	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
- Carraça	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
- Ácaro	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	
Localização intracelular:																	
- Citoplasma	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
- Núcleo	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	o	o	+	+	+	o	
Cultivo em embriões de galinha:																	
Temperatura ótima:																	
35°C	+	+	-	-	-	-	-	-	NA (a)	-	-	-	-	-	+	o	
32-34°C	-	-	+	+	+	+	+	+	NA (a)	+	+	+	+	+	-	o	
Número máximo:																	
Mesmo antes da morte	+	+	-	-	-	-	-	-	NA (a)	o	o	o	o	o	+	o	
24-72 h depois da morte	-	-	+	+	+	+	+	+	NA (a)	o	o	o	o	o	-	o	
Formação de placa:																	
Dias requeridos:																	
5-8	-	-	+	+	+	+	+	+	NA (b)	o	o	o	o	o	-	o	
8-10	+	+	-	-	-	-	-	-	NA (b)	o	o	o	o	o	+	o	
11-17	-	-	-	-	-	-	-	-	NA (b)	o	o	o	o	o	-	o	
Tamanho:																	
1 mm	+	+	-	-	-	-	-	-	NA (b)	o	o	o	o	o	+	o	
2-3 mm	-	-	+	+	+	+	+	+	NA (b)	o	o	o	o	o	-	o	
Actividade hemolítica (c)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	o	o	o	o	o	+	o	
Susceptibilidade à infecção:																	
Cobaio (d)	+	++	+++	+++	++	++	++	++	-	-	-	-	o	-	-	o	
Murganho (e)	-	+	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	o	-	-	o	
% molecular G + C de DNA:																	
29-30	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
32-33	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	

+ = sim; - = não; o = não há informação

(a) NA = crescimento não satisfatório

(b) NA = placas não mensuráveis

(c) Para eritrócitos de carneiro

(d) Símbolos: - sem sintomas; + febre; ++ febre e edema escrotal; +++ febre e necrose escrotal

(e) Símbolos: - sem infecção; + infecção; ++ animal de escolha para inoculação

adaptado de Weis e Moulder, 1984.

adaptado de Weis e Moulder, 198

*"The study of bacterial evolutionary relationships is central to the historical account of life on this planet.."*

Carl R. Woese, *Bacterial Evolution*, 1987

## 2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR

### 2.1. Filogenia

Os estudos filogenéticos das bactérias, com base na análise do gene que codifica a subunidade 16S rARN, trouxeram novas informações para a sistemática da Ordem Rickettsiales. Esta abordagem permitiu compreender as relações, dentro dos géneros, e com outras bactérias de géneros diferentes.



**Figura 3.** Filogenia do Grupo  $\alpha_2$  das Proteobacteria elaborada pela análise do 16S rARN.

Segundo Roux e Raoult, 1995

Como pode ser observado atrás na Fig. 2, todas as Rickettsiales estudadas por este método, foram incluídas na divisão Proteobactéria, nas subdivisões  $\alpha$  ou  $\gamma$ . Na subdivisão  $\alpha$  encontram-se as espécies dos géneros *Rickettsia*, *Cowdria*, *Ehrlichia*, *Bartonella* (Weisburg *et al.*, 1991; Dame *et al.*, 1992) e as espécies isoladas de insectos relacionadas com *Wolbachia pipientis*. Na subdivisão  $\gamma$  encontram-se *Coxiella burnetii* e *Wolbachia persica* (Woese *et al.*, 1984). Este último agente foi reclassificado no género *Francisella*, tendo sido proposta a alteração da sua nomenclatura para *Francisella sutorii* (Weiss *et al.*, 1994). A análise filogenética sugere ainda que o facto de serem parasitas intracelulares é recente na vida das rickettsias, dado que organismos extracelulares e intracelulares se encontram incluídos no mesmo grupo das rickettsias estritamente intracelulares. Por outro lado, indica a existência de um antepassado comum que desenvolveu a capacidade de destruir a membrana do vacúolo fagocítico e de utilizar o citoplasma celular como habitat (Roux e Raoult, 1995).

Como pode ser visto na Fig. 3, todas as espécies do género *Rickettsia* do grupo das febres exantemáticas já analisadas pela sequenciação do rARN, estão localizadas no mesmo ramo monofilético, dito grupo  $\alpha 2$  (Dasch e Weiss, 1992; Stothard *et al.*, 1994; Roux e Raoult, 1995). *R. canada* encontra-se numa posição intermédia na evolução das rickettsias, entre os grupos tifo e das febres exantemáticas (Roux e Raoult, 1995). *R. belli*, pela análise da subunidade 23S rARN também se situa numa posição intermédia entre os referidos grupos (Stothard *et al.*, 1994) mas distante de *R. canada* (Roux e Raoult, 1995). Estes factos explicam-se pela hipótese destas duas rickettsias serem filogeneticamente mais antigas, partilhando características comuns a ambos os grupos, tifo e das febres exantemáticas, o que já era evidenciado pelos caracteres ecofenotípicos.

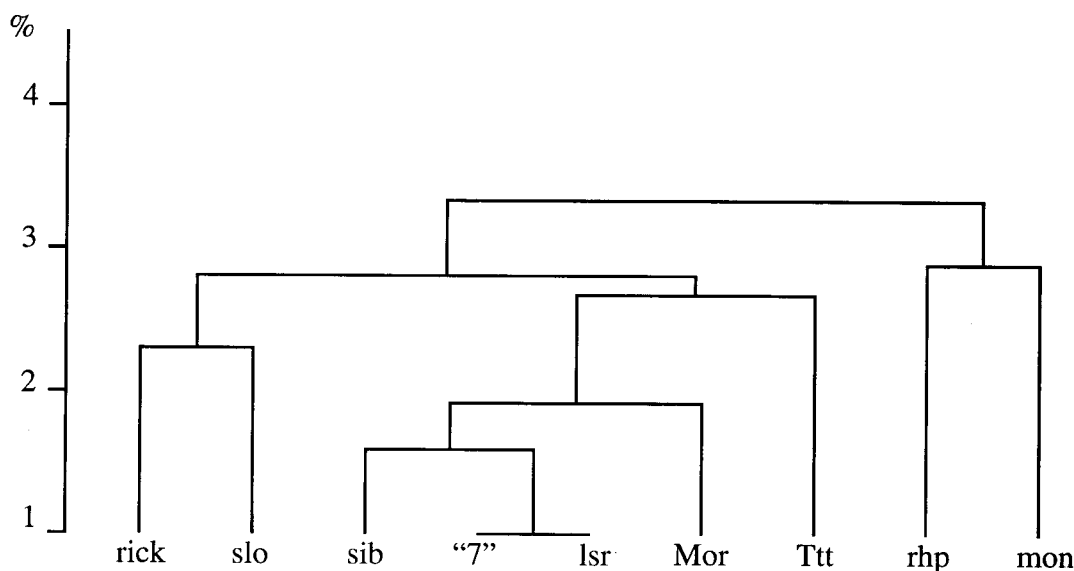
## 2.2. Taxonomia por estudos genéticos do género *Rickettsia*

Os estudos genéticos baseiam-se na análise do ADN total ou de segmentos do ADN, responsáveis por determinados fenótipos.

Como já foi referido, a definição de espécie de bactéria a nível molecular requer uma homologia de hibridização de ADN-ADN de pelo menos 70%, em condições padronizadas de experimentação (Wayne *et al.*, 1987). No género *Rickettsia* os ensaios conduzidos com as várias estirpes de *R. prowazekii* tiveram uma razão de hibridização de 100%, enquanto que entre esta espécie e *R. typhi* a razão foi de 70-77% (Myers e Wisseman, 1980).

As relações entre as espécies deste género também foram determinadas pela análise do polimorfismo dos perfis de fragmentos do ADN, obtidos pela actuação de enzimas de

restrição. Estes perfis podem ser obtidos a partir do genoma total ou de segmentos do genoma e analisados por visualização directa (electroforese em gel) ou indirecta (“Southern blot”). A comparação do polimorfismo dos perfis dos genomas totais de *R. prowazekii*, *R. typhi* e *R. rickettsii* permitiu confirmar a divergência existente entre os grupos tifo e das febres exantemáticas (Demkin *et al*, 1994). Contudo, ainda não foi possível criar um banco de dados de referência dos perfis de restrição do grupo tifo para a diferenciação das espécies que o compõem (Regnery *et al*, 1983). A análise do grupo das febres exantemáticas já permitiu a construção de dendrogramas de relações genómicas entre as espécies, conforme expresso na figura 4 (Regnery *et al*, 1991; Roux e Raoult, 1993).



**Figura 4.** Dendrograma das relações genéticas entre as sequências do gene que codifica a proteína antigénica de 190 kDa das espécies do grupo das febres exantemáticas.

segundo Regnery *et al*, 1991; % da substituição das bases nucleotídicas

rick = *R. rickettsii*, slo = *R. slovacica*, sib = *R. sibirica*, “7” = *R. conorii*, Isr = *R. conorii* israelita, Mor = *R. conorii* marroquina, Ttt = tifo da carraça da Tailândia, rhp = *R. rhipicephali*; mon = *R. montana*

A metodologia que utiliza apenas parte do genoma rickettsiano para esta análise compreende dois passos: primeiro é feita uma replicação “*in vitro*” de sequências de ADN, conhecidas como responsáveis por funções metabólicas ou fisiológicas das rickettsias; segundo, faz-se o corte as sequências amplificadas com enzimas de restrição, obtendo-se fragmentos de tamanhos diferentes de acordo com as enzimas usadas. Após separação dos fragmentos por electroforese em gel de poliacrilamida o parentesco entre as diversas espécies é estimado pelo número de fragmentos que migram à mesma distância, denominados bandas co-migrantes (Regnery *et al*, 1991).

A maior parte dos estudos de segmentos de ADN efectuados para classificar taxonomicamente as rickettsias baseia-se na amplificação de segmentos de dois genes: um que codifica a produção da enzima citrato sintetase e outro que codifica uma proteína de 190 kDa (kiloDaltons). A citrato sintetase é a primeira enzima do ciclo do ácido tricarbóxico, tanto em procariotas como em eucariotas, actuando na produção de adenosina tri-fosfato (ATP) (Wood *et al.*, 1987). Este gene foi isolado de *R. prowazekii*, clonado e sequenciado. O segmento amplificado tem o mesmo tamanho em todas as espécies de rickettsia, embora a sequência nucleotídica varie, sendo utilizado como indicador de que o organismo que o contém pertence ao género *Rickettsia* (Regnery *et al.*, 1991). O gene denominado “190 kDa” codifica uma proteína de superfície com propriedades antigénicas, denominada “*rickettsia outer membrane protein*” (rOmp). Foi isolado de *R. rickettsii*, clonado, sequenciado e é utilizado para caracterizar as espécies do grupo das febres exantemáticas (Anderson *et al.*, 1990; Gilmore e Hackstadt, 1991). A análise dos perfis obtidos por corte enzimático do segmento do gene da citrato sintetase confirmaram a existência dos dois grupos, tifo e febres exantemáticas e a posição independente de algumas espécies (*R. akari* e *R. australis*, e de *R. canada* e de *R. bellii*). Pela análise dos perfis obtidos com o segmento do gene de “190 kDa” demonstrou-se que este é altamente conservado em todas as rickettsias do grupo das febres exantemáticas estudadas, embora cada espécie tenha um perfil de restrição característico (Regnery *et al.*, 1991).

Há porém outros genes que têm sido estudados com vista à classificação de rickettsias, como é o caso do gene “17 kDa” que codifica uma proteína estrutural de membrana, uma lipoproteína (Anderson *et al.*, 1987; 1988). A sequência deste gene mostrou que *R. rickettsii* tem uma homologia de 99,8% com *R. conorii* (com a diferença em apenas um nucleotídeo), de 88,7% com *R. typhi* e de 88,1% com *R. prowazekii* (Anderson e Tzinabos, 1989). Utilizado por investigadores australianos permitiu diferenciar *R. australis* de um outro agente de febre exantemática, para o qual foi proposta a classificação taxonómica de “*R. honei*” (Baird *et al.*, 1992; 1996; Stenos *et al.*, 1994).

Muitos outros estudos genéticos, empregando diferentes metodologias, têm sido realizados com diversas espécies, o que dificulta uma comparação dos resultados. Em geral, pode afirmar-se que os diferentes métodos de classificação genética têm confirmado a classificação tradicional.

### **2.3. Classificação de rickettsias do grupo das febres exantemáticas. Metodologias mais utilizadas.**

Alguns métodos para diferenciar e classificar as rickettsias do grupo das febres exantemáticas foram utilizados ao longo dos anos com maior constância, por diversos grupos de investigadores, com conclusões que a seguir se generalizam.

As relações imunológicas entre as rickettsias do grupo das febres exantemáticas foram estudadas empregando, sucessivamente, o teste de fixação do complemento (Plotz *et al*, 1944; Pickens *et al*, 1965), o teste de neutralização de toxinas em animais de laboratório (Bell e Pickens, 1953; Bell e Stoenner, 1960; 1961), testes de imunidade cruzada e de protecção de murganhos e cobaios induzida por vacinas (Bozeman *et al*, 1960), e a técnica de microimunofluorescência indirecta (MIF) com soros de doentes com rickettsioses ou preparados em animais de laboratório (Philip *et al*, 1976; 1978a; 1978b). É importante salientar que muitos destes estudos imunológicos foram realizados antes de ser conhecida a base molecular da resposta imunitária

Os estudos de fixação do complemento (Bengston, 1944; Plotz *et al*, 1944) permitiram o agrupamento das doenças causadas pelas rickettsias em três subgrupos:

- a) Febre das Montanhas Rochosas, febre de São Paulo e febre mexicana;
- b) Febre escaro nodular, febre da carraça da África do Sul, tifo das carraças do Quênia e tifo das carraças da Índia;
- c) Varicela rickettsiana.

Os estudos com o teste de neutralização de toxinas, na década de 50, confirmaram a existência destes três grupos de doenças e estabeleceram mais dois (Bell e Pickens, 1953; Pickens *et al*, 1965):

- d) o do tifo da carraça siberiano;
- e) a febre da carraça de Queensland na Austrália.

Quando da identificação das rickettsias do grupo das febres exantemáticas, os testes de imunidade cruzada sugeriram a existência de uma única espécie de microrganismos capazes de induzirem patologias diferentes. Porém, a incapacidade de protecção de animais contra *R. conorii*, utilizando como vacina *R. rickettsii*, fez com que se formassem dois subgrupos específicos, um com o agente da febre das Montanhas Rochosas e outro com o da Febre escaro nodular (Bozeman *et al*, 1960). Ainda por fixação do complemento foram reorganizadas as espécies nos diferentes grupos e incluídas algumas não patogénicas (Lackman *et al*, 1965):

- a) *R. rickettsii* e *R. sibirica*;
- b) *R. conorii* e *R. parkeri*;
- c) *R. akari* e *R. australis*;
- d) *R. montana*.



Finalmente, o teste de microimunofluorescência (MIF), utilizando soros policlonais de murganhos e antigénios purificados, identificou doze serotipos dentro do serogrupo (Philip *et al*, 1978a). Os termos serogrupo e serotipo são, nesta técnica, sinónimos de género (*Rickettsia*) e espécie. Actualmente, o MIF é a técnica de referência cujos resultados são aceites pelo comité do “*International Journal of Systematic Bacteriology*” para a classificação de um novo “isolado”, isto é, um organismo que se presume ser rickettsia, isolado do Homem, de artrópodos ou de animais. Nos últimos anos este método foi utilizado para classificar algumas novas espécies: *R. japonica* (Uchida *et al*, 1992), *R. africae* (Kelly e Mason, 1990; Kelly *et al*, 1994), *R. massiliae* (Beati e Raoult, 1993a) e *R. helvetica* (Beati *et al*, 1993a), assim como, para determinar a existência de espécies já conhecidas, em áreas geográficas diferentes (Tarasevich *et al*, 1991a; Beati *et al*, 1993b; 1994a; Yu *et al*, 1993).

O estudo das proteínas das rickettsias é uma outra abordagem para a classificação a nível de espécie. Por análises dos perfis proteicos obtidos por electroforese em gel de poliacrilamida (PAGE, “*polyacrilamide gel electrophoresis*”) de rickettsias purificadas (Weiss *et al*, 1975) e solubilizadas com sódio duodecil sulfato (SDS) e mercaptoetanol (Laemmli, 1970) foram identificadas duas bandas proteicas, de elevado peso molecular, constantes em todas as espécies, mas com mobilidade electroforética característica para cada uma. A banda superior, denominada rOmpA, tem peso molecular entre 155-190 kDa e a banda inferior, rOmpB, tem peso molecular entre 120-133 kDa (Eisemann e Osterman, 1976; Dasch *et al*, 1978; Osterman e Eisemann, 1978; Walker *et al*, 1984a). Com esta metodologia foram estabelecidos perfis proteicos para cada espécie conhecida, aos quais são comparados os perfis obtidos para os novos “isolados” com o objectivo de os classificar (Li e Walker, 1990; Hackstad *et al*, 1992). Refira-se, porém, que esta metodologia deve ser estritamente padronizada para que se obtenham resultados comparáveis (Logan, 1994). A análise das proteínas por SDS-PAGE também permitiu encontrar diferenças intraespecíficas. Foi posto em evidência que as proteínas de estirpes virulentas e não virulentas de *R. rickettsii* apresentam mobilidades eletroforéticas diferentes (Anacker *et al*, 1984; 1986; Gilmore *et al*, 1991).

Os anticorpos monoclonais, preparados contra determinadas estirpes, permitiram uma distinção entre as várias espécies pois aumentam a especificidade, tanto da técnica de MIF, como de “*Western blot*” (WB) após SDS-PAGE (“*Western immunoblotting*”) (Anacker *et al*, 1985; 1987; Jarboe *et al*, 1986; Feng *et al*, 1987; McDade *et al*, 1988; Vitale *et al*, 1989; Uchiyama *et al*, 1990). Porém, os anticorpos monoclonais não existem ainda contra a maior parte dos serotipos descritos e normalmente só são utilizados nos laboratórios onde são produzidos.

Uma aplicação recente deste conjunto de metodologias foram os estudos realizados na classificação das estirpes de rickettsias isoladas em Israel, a partir de humanos e de ixodídeos e denominadas provisoriamente "*R. israeli*". Pela análise com MIF as estirpes foram classificadas como pertencendo ao mesmo serogrupo e serotipo, sendo semelhantes a *R. conorii*, utilizada como padrão. Porém, a utilização de anticorpos monoclonais nesta técnica, evidenciou epítopos diferentes entre as rickettsias israelitas e a padrão. A análise dos antígenos lipolissacarídeos (LPS) resultou em padrões iguais em todas as estirpes. A mobilidade eletroforética das proteínas de superfície, indicou que rOmpA de "*R. israeli*" é diferente da das outras rickettsias estudadas (Walker *et al*, 1995). Apesar destas diferenças e devido à falta de acordo entre os diferentes laboratórios sobre os critérios classificativos, as estirpes israelitas ainda estão classificadas como *R. conorii*, sendo consideradas uma variante geográfica.

A análise do genoma total de rickettsias do grupo das febres exantemáticas mostrou que a homologia ADN-ADN entre *R. rickettsii* e *R. conorii* é de 91-94%, com *R. sibirica* é de 70-74%, de 73% com *R. montana*, 53% com *R. australis* e de 46% com *R. akari*. Devido a estes resultados *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. sibirica* e *R. montana* formam um subgrupo, enquanto que *R. australis*, e *R. akari* são consideradas espécies independentes (Myers e Weiseman, 1980; 1982; Roux *et al*, 1992).

A comparação da migração de fragmentos do ADN total por eletroforese em campo pulsado ("*pulsed field gel electrophoresis*"- PFGE), para efeitos de taxonomia interespecífica, permitiu que fossem agrupadas *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. africae*, *R. sibirica*, *R. slovacica* e *R. conorii* e as estirpes geográficas que vão formar o denominado complexo-*R. conorii* ("*Indian tick typhus*", "*Israeli tick typhus*", "*Thai tick typhus*", "*Astrakan fever*", entre outras). Um outro grupo foi ainda formado incluindo *R. montana*, *R. japonica* e *R. massiliae*, enquanto que *R. australis*, *R. rhipicephali*, *R. akari*, *R. helvetica* e *R. belli* são únicas, em grupos individuais (Roux *et al*, 1992; Roux e Raoult, 1993).

A análise filogenética do grupo das febres exantemáticas (sequenciação do gene que codifica a subunidade 16S rARN) permitiu formar dois subgrupos: um com onze serotipos: *R. rickettsii*, *R. sibirica*; *R. parkeri*; *R. africae*, *R. slovacica* e o complexo-*R. conorii* (com 6 estirpes) e outro incluindo *R. massiliae* e duas estirpes denominadas GS e Bar 29 (isolados de ixodídeos na Grécia e em Barcelona, Espanha, respectivamente). Os outros serotipos do grupo das febres exantemáticas, *R. japonica*, *R. rhipicephali*, *R. montana*, *R. belli*, *R. australis* e *R. akari*, analisados por esta técnica, parecem ser independentes uns dos outros (Roux e Raoult, 1995).

Regnery e colaboradores (1991), utilizando uma combinação de três enzimas de restrição, obtiveram um conjunto de perfis de fragmentos do gene "190 kDa" para cada

espécie já classificada pela metodologia clássica. Actualmente, qualquer novo “isolado” pode ser rapidamente identificado (ou diferenciado) por comparação dos perfis obtidos com os padrões através da mesma metodologia. Os resultados deste trabalho indicaram que *R. akari* e *R. australis* se situam fora do grupo das febres exantemáticas. As outras espécies estudadas teriam menos de 3.2% de divergência neste segmento de ADN.

A identificação por metodologias de biologia molecular das diferentes estirpes de rickettsias, isoladas um pouco por toda a ex-URSS, permitiu determinar a distribuição geográfica das espécies patogénicas já conhecidas (*R. akari*, *R. conorii* e *R. sibirica*). Por outro lado permitiu estabelecer a existência de pelo menos mais uma estirpe patogénica, denominada provisoriamente de “agente da febre de Astrakan”, além de detectar a presença de *R. slovacica*, espécie de patogenicidade desconhecida (Tarasevich *et al*, 1991a e 1991b; Ereemeeva *et al*, 1993b).

Como já foi mencionado, o “complexo-*R. conorii*” engloba uma variedade de estirpes geográficas que variam em algumas características. Os investigadores americanos tendem a classificá-las todas como uma única espécie. Nos vários trabalhos publicados encontram-se, geralmente, como estirpes padrão deste “complexo-*R. conorii*” a estirpe marroquina ou Casablanca (de origem desconhecida) e a estirpe Malish 7# (isolada de um doente na África do Sul). Outras estirpes de rickettsias identificadas como *R. conorii* encontram-se listadas na tabela IV.

A ideia estabelecida de que as estirpes geográficas de *R. conorii* são semelhantes tem vindo a ser alterada. No gene que codifica a proteína rOmpA, da estirpe Malish 7#, encontraram-se dois conjuntos de nucleotídeos que se repetem com elevada frequência e que são diferentes em *R. rickettsii*, *R. akari* e *R. conorii* estirpe keniana. Estes conjuntos que funcionam como unidades codificadoras da conformação dos epitopos, poderiam ser os responsáveis pela diversidade antigénica inter e intraespecífica nas rickettsias do grupo das febres exantemáticas (Gilmore e Hackstadt, 1991; Crocquet-Valdes *et al*, 1994). Os dados sobre variantes mais ou menos virulentas têm-se acumulado, encontrando-se diferenças antigénicas (Cwikel *et al*, 1990; Walker *et al*, 1984b e 1992; Schuenke e Walker, 1994) e genotípicas (Manor, *et al*, 1992; Zhang *et al*, 1994), eventualmente responsáveis pela patogenicidade. A análise desta diversidade de *R. conorii*, por diversas metodologias, tem demonstrado que existe uma variação intraespecífica, à qual ainda não foi atribuído valor sistemático (Tringali *et al*, 1989; Walker *et al*, 1992; 1995; Demkin *et al*, 1994; Zhang *et al*, 1994). Porém, a análise de segmentos do ADN amplificado, obtidos com enzimas de restrição, indica que a diversidade genética intra-específica não estaria relacionada com a origem geográfica das estirpes (Zhang *et al*, 1994).

Tabela IV: Estirpes do “complexo-*Rickettsia conorii*”

Estirpe	Hospedeiro	Local	Autor
M1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Georgia, Crimeia	Golinevich, 1960
Barbash	ixodídeo	Russia	WHO, 1970
<i>Astrachan tick fever</i>	humano, <i>R. pumillo</i>	Russia	Tarasevich <i>et al</i> , 1991a
agente S	<i>R. sanguineus</i>	Arménia, Rússia	Eremeeva <i>et al</i> , 1995b
<i>Indian tick typhus - Itt</i>	<i>R. sanguineus</i>	Kashmir	Philip <i>et al</i> , 1950
<i>Israel tick typhus - Istt</i> T192 e T193	<i>R. sanguineus</i>	Israel	Goldwasser <i>et al</i> , 1974
G212 e G358 A828 S484	humano, doença leve humano, doença severa humano, doença fatal		Manor <i>et al</i> , 1992
T 40 T210*, T38, Villafrate e Sciacca	humano ixodídeo (*reisolada de huma- no após acidente laboratorial)	Itália	Tringali <i>et al</i> , 1989
Manuel	humano	França	Raoult, 1992
<i>Kenyan tick typhus</i>	<i>Haemaphysalis leachi</i>	Nairobi	Bell e Stonner, 1960
Simko	<i>R. simus</i>	Etiópia	Philips <i>et al</i> , 1966
<i>Ethiopian (“R. africae”)</i>	<i>Amblyomma variegatum</i>	Etiópia	Philip <i>et al</i> , 1966

*"There are as many ideas on species as there are biologists, and many time a biologist has changed his idea during the course of his working life."*

S. T. Cowan, A dictionary of microbial taxonomy usage, 1968.

### 3. CONSIDERAÇÕES

Algumas das características consideradas na sistemática clássica de rickettsias não são exclusivas destes microrganismos. Alguns exemplos já foram mencionados. A demonstração da existência de reacções cruzadas entre as bactérias *Proteus vulgaris* OX2 e o soro de doentes com febres exantemáticas e de *P. vulgaris* OX19 com o soro de doentes com tifo (reacção de Weil Felix) permitiu uma primeira diferenciação entre os agentes rickettsianos. O estudo bioquímico das rickettsias e de *Proteus* spp. demonstrou que as substâncias imunogénicas indutoras da produção de imunoglobulinas da classe M, responsáveis pelas reacções cruzadas observadas, são lipopolissacarídeos solúveis (Beati *et al*, 1994b). Estas macromoléculas, além de provocarem reacções cruzadas moderadas entre os dois grupos de rickettsias, do tifo e das febres exantemáticas, e reacções quantificáveis com *Proteus*, também induzem reacções com estirpes de *Legionella*, sugerindo que estão presentes em larga escala no mundo bacteriano (Sompolinsky *et al*, 1986; Raoult *et al*, 1994).

Mais ainda, a capacidade de invadir o núcleo das células hospedeiras, característica que permite diferenciar as rickettsias do grupo das febres exantemáticas das do grupo tifo, depende de um mecanismo bioquímico, a activação da actina da célula hospedeira pelas rickettsias. Dentro das eubactérias, algumas espécies de *Shigellas* e de *Listeria* têm o mesmo padrão bioquímico (Teysserie *et al*, 1992; Teysserie, 1993). É convém também recordar que, apesar do crescimento intracelular obrigatório ser um denominador comum a todas as rickettsias, muitas outras bactérias classificadas em géneros distantes (*Agrobacter* sp., *Brucella* sp.) partilham esta característica (Weisburg, 1986).

Um outro exemplo de abrangência dos caracteres classificativos pode ser encontrado analisando os vectores destes microrganismos. A maioria das espécies de rickettsia do grupo das febres exantemáticas, patogénicas para o Homem, têm como artrópodo vector as carraças da família Ixodidae. Porém, recentemente, foi detectado um agente em pulgas, denominado ELB (*Rickettsia felis*), responsável por uma patologia em humanos, semelhante ao tifo murino. Este microrganismo está mais próximo filogeneti-

camente das rickettsias do grupo das febres exantemáticas do que dos agentes do grupo tifo (Azad *et al*, 1992; Schriefer *et al*, 1994a; 1994b; Higgins *et al*, 1996). Por outro lado, *R. canada* e *R. belli*, consideradas não patogénicas e com características bioquímicas que as aproximam do grupo tifo, têm ixodídeos como hospedeiros (Weiss e Moulder, 1984). Ainda no grupo das rickettsias das febres exantemáticas foi classificado um agente patogénico para insectos, denominado AB, associado à morte dos machos de *Adalia bipunctata*, a joaninha (Werren *et al*, 1994). Daí se conclui que os artrópodos vectores não são um critério de classificação estrito.

Quanto ao poder patogénico, verifica-se que, no grupo das rickettsias agentes de febres exantemáticas, foram colocadas várias espécies, isoladas exclusivamente de ixodídeos, consideradas não patogénicas para o Homem. Contudo, uma destas espécies, isolada de ixodídeos em África, em 1966, foi novamente isolada, em 1992, desta vez a partir do sangue de um doente (Kelly *et al*, 1994; 1996). Este acontecimento revela a importância de não se rotularem as espécies com base em critérios de patogenia.

Pelo que foi exposto sobre a sistemática das rickettsias, pode-se considerar que a tribo Rickettsiæae fica reduzida ao género *Rickettsia*. O género *Coxiella* pertence a uma subdivisão das Proteobactérias diferente (subdivisão  $\gamma$ ) e deverá existir uma categoria taxonómica apenas para este microrganismo, numa futura classificação. O género *Rochalimaea* foi unido a *Bartonella* (e a família Bartonellaceae provavelmente será retirada da ordem Rickettsiales). Quanto às espécies, *R. tsutsugamushi* passou a pertencer ao género *Orientia*. *R. canada* e *R. belli* seriam espécies “ancestrais” dos grupos tifo e das febres exantemáticas. O grupo tifo fica com duas espécies, *R. prowazekii* e *R. typhi*.

No que respeita aos critérios taxonómicos baseados na análise filogenética, alguns autores consideram que o tamanho do gene que codifica a subunidade 16S rARN não é suficiente para garantir a estabilidade dos cladogramas construídos e, portanto, uma classificação com base neste critério não seria segura (Fuerst e Sothard, 1994). Também, não foi ainda conseguido um consenso sobre quais os critérios genómicos suficientes para separar as *Rickettsia* spp. A sequenciação do ADN total de cada espécie seria o método ideal de classificação, porém o conhecimento da estrutura do ADN cromossómico das rickettsias ainda é muito incompleto para se decidir quais as diferenças genéticas encontradas que devem ser utilizadas como marcadoras de desvios interespecíficos ou mesmo intraespecíficos (Fuerst e Poetter, 1991). O método desenvolvido por Regnery e colaboradores (1991) permite que novas estirpes isoladas possam ser rapidamente classificadas por comparação com os perfis das espécies padrão. Estes perfis já se encontram catalogados em imagens informatizadas facilitando esta comparação. Porém, este autor não o considera válido “*per si*” para classificar novas espécies. Reflexo deste facto são as dificuldades

encontradas para diferenciar as estirpes do “complexo *R. conorii*”. Porém, outros segmentos de ADN e outras enzimas, têm vindo a ser estudados para aperfeiçoar esta metodologia (Emereeva *et al*, 1994a).

Em resumo, a eficiência das modernas técnicas de biologia molecular empregues na classificação das rickettsias e especialmente na diferenciação das estirpes do “complexo-*R. conorii*” depende:

- a) da macromolécula a ser estudada (ADN, ARN ou proteínas);
- b) das áreas genómicas seleccionadas;
- c) do facto destas áreas serem detectadas por sequenciação, clonagem, ou amplificação do ADN total ou de segmentos de ADN (Anisovich *et al*, 1993).

A análise do gene que codifica o 16S rARN permitiria dizer a que grupo o microrganismo pertence, porém as pequenas diferenças entre os pares de bases nucleotídicas seriam insuficientes para separar espécies. Os genes que codificam proteínas de superfície, como é o caso do segmento do gene da rOmp A (proteína de 190 kDa), mostrariam maior variabilidade e permitiriam diferenciar os microrganismos. A metodologia empregue no estudo destes genes para que realmente mostrassem as diferenças específicas também dependeria do objectivo; caracterizar espécies conhecidas seria sempre mais fiável do que caracterizar algo “novo”, dado que as semelhanças seriam critérios taxonómicos mas as diferenças não. Enfim, apenas quando os investigadores a trabalhar nesta área decidirem os critérios classificativos a adoptar poderão utilizar-se as características moleculares de um microrganismo como base para a sua classificação.

A utilização da mesma metodologia, em diferentes laboratórios, asseguraria a comparação dos resultados, porém esta depende, muitas vezes, de condições extra-científicas (económicas, obtenção de reagentes da mesma casa comercial, etc.) sendo difícil de obter uma convergência total de resultados.

Finalmente, na tabela V, apresenta-se uma relação das espécies de rickettsias do grupo das febres exantemáticas, tendo por base os diferentes estudos realizados para as classificar.

**Tabela V. Classificação das rickettsias do grupo das febres exantemáticas**

Metodologia	Autores e ano	Espécies
Fixação do complemento	Plotz <i>et al</i> , 1944	<i>R. rickettsii</i> <i>R. conorii</i> <i>R. akarii</i>
Neutralização das toxinas	Bell e Pickens, 1960	<i>R. rickettsii</i> <i>R. conorii</i> <i>R. akarii</i> <i>R. australis</i> <i>R. sibirica</i>
Teste de Imunidade cruzada	Bozemann <i>et al</i> , 1960	<i>R. rickettsii</i> <i>R. conorii</i> <i>R. parkeri</i> <i>R. sibirica</i>
Fixação do complemento	Urvolgyi e Brezina, 1978	<i>R. slovacica</i>
MIF	Philip <i>et al</i> , 1978a	<i>R. rickettsii</i> <i>R. conorii</i> <i>R. australis</i> <i>R. sibirica</i> <i>R. akarii</i> <i>R. montana</i> <i>R. rhipicephali</i> <i>R. parkeri</i> outros
MIF	Péter <i>et al</i> , 1985	<i>R. helvetica</i>
“PCR/RFLP” 190 kDa	Regnery <i>et al</i> , 1991	<i>R. rickettsii</i> <i>R. slovacica</i> <i>R. sibirica</i> <i>R. conorii</i> 7# “ <i>R. israeli</i> ” <i>R. conorii marroquina</i> <i>Tt</i> <i>R. rhipicephali</i> <i>R. montana</i>
MIF	Uchida <i>et al</i> , 1992	<i>R. japonica</i>
MIF, SDS-PAGE, “PCR/RFLP” 190 kDa	Beati <i>et al</i> , 1993a Kelly <i>et al</i> , 1994 Eremeeva <i>et al</i> , 1993b, 1995b	<i>R. massilae</i> <i>R. helvetica</i> <i>R. africae</i> Mtu5 agente S agente Astrachan outros
“PCR/RFLP” 17 kDa	Baird <i>et al</i> , 1992	FISF - “ <i>R. honei</i> ”
rARN	Azad <i>et al</i> , 1992	agente ELB - <i>R. felis</i>
rARN, “PCR” 17kDa	Werren <i>et al</i> , 1994	agente <i>Adalia bipunctata</i>





# **III**

## **Biologia**



*"... organisms whose environmental niche is the cytoplasm of a eucaryotic cell."*

Helbert Winkler, *Rickettsia* species (as organisms), 1990

## 1. INTRODUÇÃO

Na revisão que aqui se apresenta, os dados sobre a biologia das rickettsias foram colhidos, principalmente, em trabalhos realizados com rickettsias cultivadas em ovos embrionados ou em cultura de células de mamífero e com rickettsias extracelulares, isto é, isoladas dos componentes das células hospedeiras.

Os estudos relativos à fisiologia das rickettsias têm progredido lentamente devido às dificuldades decorrentes do facto destas bactérias serem parasitas intracelulares, estritamente obrigatórios. Consequentemente, as pesquisas utilizando modelos animais ou culturas de células têm de levar em conta os componentes celulares do hospedeiro nas respostas metabólicas detectadas, por outro lado, a análise das rickettsias isoladas das células, implica vários procedimentos de purificação que podem afectar a realidade rickettsiana.

O alvo preferencial "*in vivo*" destas bactérias são as células endoteliais, mas uma grande variedade de linhas celulares pode manter a infecção "*in vitro*" (Winkler, 1990). Os estudos com animais de laboratório foram feitos para isolamentos de estirpes, ensaios de infecção, testes de virulência e testes de imunidade (Weiss, 1973). O cultivo de rickettsias em artrópodos é de interesse histórico, embora alguns autores acreditem que estes poderiam ser potencialmente úteis como hospedeiros experimentais ou como fonte de linhas celulares (Rehacek, 1994).

## 2. FISILOGIA

Vários grupos de investigadores têm desenvolvido alguns modelos com o objectivo de explicar o ciclo de vida parasitário destas bactérias. Considera-se que as vias metabólicas são semelhantes em todas as espécies (Weiss, 1968) e por isso apresenta-se aqui um sumário generalizando os resultados obtidos com o estudo de diferentes espécies de rickettsias.

Para estas bactérias penetrarem nas células hospedeiras foi comprovado ser necessário, simultaneamente, que os microrganismos estivessem metabolicamente activos e que as células os fagocitassem. Este processo foi denominado fagocitose induzida (Walker e Winkler, 1978). Nas membranas das células hospedeiras foram detectados receptores, contendo colesterol, a que as rickettsias aderem (Winkler e Ramm, 1975; Ramm e Winkler, 1976). Por sua vez, as bactérias têm uma enzima, a fosfolipase A, que activada durante a adsorção participa na dissolução dos glicero-fosfolípidos membranares da célula hospedeira (Winkler e Miller, 1982; Walker *et al*, 1983; Winkler, 1991; Silverman *et al*, 1992; Teyssere *et al*, 1995). Deste modo, as rickettsias, ao mesmo tempo em que são fagocitadas, lisam a membrana da vesícula fagocítica, ficando livres no citoplasma da célula hospedeira (Walker *et al*, 1984a; Winkler *et al*, 1994; Teyssere *et al*, 1995). Refira-se, contudo, que ainda não foi posta de parte a possibilidade das enzimas celulares (fosfolipase C), entre outros factores, participem neste processo de interiorização (Winkler, 1990; Winkler *et al*, 1994; Ojcius *et al*, 1995). Ao escaparem-se para o citoplasma as rickettsias ficariam protegidas da acção das enzimas lisossómicas celulares. Assinale-se que o modelo de fagocitose induzida não é comum entre as bactérias patogénicas (Brock *et al*, 1994; Teysserie *et al*, 1995).

Como as reacções catalizadas pela fosfolipase A são exergónicas, as rickettsias têm, obrigatoriamente, de produzir energia durante o processo de penetração nas células. Uma das teorias elaboradas para explicar este facto sugere que esta energia pode provir da oxidação do glutamato dando origem à formação de ATP. Foi comprovado que o metabolismo do glutamato nas rickettsias extracelulares é semelhante ao metabolismo deste substrato noutros microrganismos, participando no ciclo de Krebs (Bovarnick, 1956). Já em 1949, Bovarnick e Snyder, demonstraram que as rickettsias consumiam oxigénio e produziam dióxido de carbono na presença de glutamato, com a formação de três produtos finais: amónia, dióxido de carbono e aspartato. A maior parte da amónia seria transferida para o oxaloacetato, com a formação de aspartato, evitando a sua concentração a níveis tóxicos para a célula (Bovarnick e Miller, 1950). O dióxido de carbono seria proveniente da oxidação dos átomos de carbono do glutamato (Weiss, 1973). A única diferença encontrada neste processo parece ser a incapacidade das rickettsias de utilizarem partes do esqueleto carbónico do glutamato para síntese das suas moléculas (Weiss, 1968). Apesar de não ter sido demonstrada a formação de ácido cítrico e de outros ácidos tricarbóxicos, verificou-se que existem nas rickettsias as enzimas que catalizam a formação destes produtos (transaminases e citrato sintetase) (Bovarnick e Miller, 1950). Também foi demonstrada a existência de citocromos nas rickettsias apesar da sua actividade específica ser baixa (Hayes *et al*, 1957). Portanto, as rickettsias, potencialmente, têm a capacidade de produzir ATP pela via metabólica do ciclo de Krebs (Wisseman *et al*, 1952; Ormsbee, 1969).

Um outro dado a apoiar esta teoria resultou dos estudos da respiração das rickettsias. Esta, geralmente, não é detectável mas, pode ser estimulada por vários substratos, sendo o glutamato o mais potente. A glutamina é o segundo substrato mais eficaz na estimulação da respiração das rickettsias (a glutamina é hidrolizada originando glutamato e ião amónia). Este poderia também ser o modo pelo qual a glutamina, essencial aos meios de cultura celular “*in vitro*”, é metabolizada pelas rickettsias quando se encontram nos espaços intercelulares, antes da invasão de uma nova célula. Além deste aminoácido, intervêm outros substratos, entre eles o piruvato e o ácido dicarboxílico, intermediários no ciclo do ácido cítrico. A quantidade necessária destes aminoácidos é maior nos organismos do grupo tifo do que no das febres exantemáticas, o que explicaria a maior patogenicidade dos primeiros (Bovarnick e Snyder, 1949; Weiss *et al*, 1987). A glucose e glucose-6-fosfato, o lactato e a sacarose não estimulam a respiração das rickettsias (Weiss, 1973). Contudo, não está determinado se a incapacidade das rickettsias em catabolizar estes últimos substratos é devida à falta de enzimas apropriadas, ou se resulta de falhas existentes no próprio sistema glicolítico (Winkler, 1990).

O significado biológico das rickettsias não catabolizarem a glucose celular, mas sim o glutamato, não foi ainda explicado pelos investigadores, embora algumas comparações fossem feitas com o estudo de outros organismos. Um exemplo utilizado foi o ciclo de vida intracelular facultativo das estirpes virulentas de *Brucella abortus*. Sabe-se que *B. abortus* oxida o glutamato mais rapidamente que qualquer outro substrato e utiliza-o como fonte de energia e para sua multiplicação. Determinou-se que a velocidade de captura do oxigénio por uma estirpe de brucela não virulenta é o dobro da velocidade do metabolismo de oxigénio numa estirpe virulenta. Este facto explicaria a razão pela qual as brucelas não virulentas não podem ser cultivadas em monócitos de porco, já que os destruiriam muito rapidamente por “stress” oxidativo (Dasinger e Wilson, 1962; Freeman *et al*, 1964). Se este facto for extrapolável para o caso das rickettsias, estaria justificada a velocidade lenta com que elas removem o glutamato da célula hospedeira. Uma velocidade maior levaria a destruição do meio ambiente intracelular, com a consequente morte do próprio parasita (Weiss, 1973). A utilização da glucose apenas para biossíntese de polissacarídeos e não para obtenção de energia também é compatível com a biologia de um organismo que se multiplica lentamente (Wisseman e Waddell, 1975; Wisseman *et al*, 1976; Turco e Winkler, 1989).

A teoria mais aceite, para explicar a razão do parasitismo obrigatório das rickettsias, implica que estas não sejam capazes de metabolizar níveis suficientemente elevados de ATP endógeno para manter todas as suas funções de síntese (Weiss, 1973). Por isso, a adaptação mais importante que estas bactérias teriam sofrido, para sobreviver no meio intracitoplasmático, parece ser o mecanismo de transporte activo das biomoléculas pre-

cursoras e de fosfatos energéticos das células hospedeiras. Demonstrou-se que quando se fornece ADP, fosfato inorgânico, hexoquinase e glucose às rickettsias, o ADP é fosforilado e dá origem ao ATP, formando glucose-6-fosfato. Esta glucose é utilizada como fonte de carboidratos para as membranas, especialmente nas rickettsias do grupo tifo (Winkler e Daugherty, 1986). Outras experiências demonstraram que as rickettsias, mantidas sem substrato, a 36°C, durante 3 horas, não produzem ATP mensurável. Pelo contrário, quando incubadas com glutamato e outros substratos, a quantidade de ATP aumenta proporcionalmente à quantidade adicionada. Contudo, os maiores níveis de ATP obtidos são sempre menores do que os normalmente existentes nas bactérias de vida livre (Bovarnick, 1956). Uma outra evidência do “stress” oxidativo sofrido pelas células parasitadas por rickettsias é a existência de uma quantidade crescente de radicais livres de oxigénio no seu interior, os quais vão participar na lise da célula hospedeira pela peroxidação dos lípidos membranares (Silverman e Santucci, 1988; Santucci *et al*, 1992).

A multiplicação do género *Rickettsia* é por divisão binária. Apesar de ser necessário que as células hospedeiras estejam em boas condições de cultivo, a sua divisão não é necessária para a multiplicação das rickettsias (Hase, 1985). No citoplasma da célula hospedeira estes microrganismos encontram todos os metabolitos necessários ao seu crescimento mas, mesmo assim, ao contrário do que acontece com as bactérias de vida livre, a multiplicação das rickettsias é lenta (6 a 12 horas em média). Esta bradiplasia pode ser, também, um reflexo da selecção natural no processo evolutivo de adaptação à vida parasitária; uma divisão mais rápida, num meio tão rico e estável, levaria à morte da célula hospedeira o que seria desfavorável para a bactéria (Winkler, 1990). A multiplicação das rickettsias “*in vitro*” é mantida e estimulada pelo aumento de CO<sub>2</sub> no meio de cultura conforme progride a infecção das células (Weiss, 1987).

As rickettsias são capazes de sintetizar pequenas quantidades de proteínas e lípidos. Porém, foi observada a incorporação de aminoácidos exógenos e estabeleceu-se a necessidade de iões potássio e magnésio, para as reacções de síntese proteica (Weiss, 1987). Estas reacções, por requererem substratos exógenos, indicam que as rickettsias virtualmente não têm aminoácidos endógenos (Ormsbee, 1969; Austin *et al*, 1987). O perfil lipídico das rickettsias é constituído por ácidos gordos de cadeia insaturadas e saturadas (octadecénicos-C<sub>18:1</sub>, hexadecanóicos-C<sub>16:1</sub> e hexadecénicos-C<sub>16:1</sub>) tal como nas outras bactérias (Weiss, 1973).

O mecanismo de saída das rickettsias de uma célula para o meio intercelular, antes de nova interiorização, é típico de cada grupo. No grupo tifo, as rickettsias multiplicam-se no citoplasma até romperem a célula hospedeira. As rickettsias do grupo das febres

exantemáticas saem para o meio extracelular durante a vida da célula hospedeira, nunca se acumulando em grandes quantidades no citoplasma. Este movimento de saída e também os movimentos através do citoplasma das células, foi estudado em *R. rickettsii* (Schaechter *et al*, 1957; Wisseman *et al*, 1976). Muitas vezes foram observadas, em microscopia electrónica, rickettsias em estruturas fibrilares que se estendem para além dos limites da célula. Pensou-se que quando estas microfibrilhas se contraíam, transportariam as rickettsias para dentro da célula ou as libertariam nos fluidos intercelulares. Da composição química das microfibrilhas faz parte a actina, originária da célula hospedeira, polimerizada pela acção das rickettsias. O mecanismo deste movimento originado pela polimerização da actina ainda não está esclarecido (Austin e Winkler, 1988; Teysseire *et al*, 1992; Heinzen *et al*, 1993). As rickettsias do grupo tifo parecem não ter a capacidade de polimerizar a actina celular, sendo esta a razão de se acumularem no citoplasma da célula infectada (Teysseire *et al*, 1992).

Um fenómeno exclusivo na biologia das rickettsias é o processo de reactivação que se evidencia nas alterações da virulência de uma mesma estirpe de rickettsia (Bovarnick e Allen, 1957; Graumann e McDonald, 1994). Já em 1909, Ricketts associou a variação na virulência das rickettsias inoculadas em cobaios com o estado de alimentação do ixodídeo (Ricketts, 1991). Nos anos 20 foi postulado que a virulência de *R. rickettsii* no vector estaria relacionada com o estado fisiológico do ixodídeo (Weiss, 1987). Demonstrou-se que as rickettsias nos ixodídeos não ingurgitados tinham a capacidade de induzir uma resposta imune em animais mas não eram capazes de induzir doença. Entretanto, as carraças infectadas com rickettsias, após uma refeição de sangue ou após incubação a 37 °C por 24-48 horas, quando inoculadas em cobaios produziam a afecção típica (Hayes e Burgdorfer, 1982). Este mecanismo de reactivação foi reproduzido “*in vitro*” com estirpes virulentas de *R. rickettsii* cultivadas e congeladas no saco da gema do ovo. Quando descongeladas e inoculadas em cobaios perdiam sua virulência. Porém, a incubação deste saco da gema com extratos de carraças ingurgitadas, restaurou a virulência da estirpe produzindo a doença típica. Alguns estudos sugeriram que seria o ferro da hemoglobina que estimularia, de alguma forma, a virulência das rickettsias (Walker *et al*, 1982). Como referido oportunamente, a fagocitose induzida é um mecanismo dependente de transporte activo através da membrana de moléculas carregadas electricamente. No metabolismo das bactérias em geral, o ferro é parte integrante dos citocromos e de outras proteínas essenciais ao sistema de transporte de electrões (Brock *et al*, 1994). Portanto, este metal poderia ser um factor importante tanto no processo de reactivação como no processo da fagocitose induzida.



### 3. MORFOLOGIA, ESTRUTURA E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O parasitismo intracelular obrigatório das rickettsias não se reflecte em características morfológicas ou macromoleculares especiais. Os estudos de ultraestrutura e composição química das rickettsias confirmaram a sua semelhança com as bactérias Gram negativas.

Os membros do género *Rickettsia* são bacilos com 0,3-0,7 µm de largura, mas variando em comprimento, consoante o material examinado. *R. prowazekii*, uma das mais pleomórficas, mede 2-4 µm de comprimento, enquanto as outras rickettsias medem em média 1,5 µm (Andersen *et al*, 1965; Weiss, 1973).

Em ultramicroscopia, dentro da célula hospedeira, observa-se uma camada proeminente de cor clara à volta das rickettsias (“*slime layer*” ou camada mucosa); uma membrana externa ou parede celular, definindo um espaço periplasmático; e, uma membrana citoplasmática a envolver o citoplasma (Popov *et al*, 1976; Silverman e Wisseman, 1978; Silverman, 1991). A camada mucosa pode ser evidenciada com corantes indicadores da presença de mucopolissacarídeos (Silverman e Wisseman, 1978). Como nas outras bactérias, esta estrutura estaria relacionada com a ligação do microrganismo às células do hospedeiro e, provavelmente, evitaria o seu reconhecimento pelo sistema imunológico (Brock *et al*, 1994). Por outro lado, Hayes e Burgdorfer (1982) demonstraram que esta cápsula era mais espessa nas rickettsias que se encontravam em ixodídeos já alimentados do que nos que não estavam ingurgitados, podendo ter influência na virulência da bactéria (fenómeno de reactivação). Esta camada de mucopolissacarídeos, quando examinada em microscopia de alta voltagem, revelou ter estriações finas que pareciam corresponder ou a extensões da membrana externa da rickettsia ou a ligações entre rickettsias adjacentes (Todd *et al*, 1983). Apesar do significado deste material fibrilar não estar esclarecido, alguns autores pensam que os microfilamentos poderiam corresponder à actina polimerizada para o movimento das rickettsias, associada a proteínas da célula hospedeira, tal como já referido (Heizen *et al*, 1993).

Após o isolamento e purificação das rickettsias dos componentes da célula hospedeira já não é observada a camada de mucopolissacarídeos. Porém, os microrganismos mantêm-se sem perda aparente de vitalidade ou das capacidades metabólicas. Visualiza-se sim, uma microcápsula, aderente à parede celular, caracterizada em ultramicroscopia também por ter estriações, opacas aos electrões. Esta microcápsula foi considerada como sendo a origem do antigénio específico de espécie, sendo constituída, maioritariamente, por proteínas com pesos moleculares de 110 a 170 kDa. Como foi referido nesta dissertação, estas proteínas foram denominadas rOmp (“*rickettsia outer membrane protein*”), e em alguns trabalhos SPA (“*specific protein antigen*”), e muitos dos trabalhos de biologia molecular, realizados

nos últimos anos, têm tido como objectivo a sua caracterização. Estes antigénios específicos são inactivados a 56°C durante 30 min. Podem ser extraídos e constituem 10-15% do total proteico da rickettsia (Eisemann e Osterman, 1976; Dasch, 1981; Dasch e Bourgeois, 1981; Feng *et al*, 1986). Nestas proteínas encontram-se os epitopos antigénicos reconhecidos pelos soros policlonais, preparados em murganhos, utilizados para classificar as rickettsias pelo teste de MIF. Um outro papel importante destas proteínas da microcápsula estaria relacionado com a virulência das rickettsias, já que esta microcápsula têm menor espessura nas rickettsias em ixodídeos não ingurgitados. Após a refeição de sangue, tanto a microcápsula como a virulência das rickettsias são restauradas (Hayes e Burgdorfer, 1982). Além disso, *R. bellii*, rickettsia não patogénica, não possui microcápsula (Philip *et al*, 1983). Além de rOmp, encontraram-se lipoproteínas na microcápsula. O gene 17 kDa, que codifica algumas delas, foi clonado e expresso em *E. coli*. Foi encontrada uma sequência repetitiva de aminoácidos “Leu-Gln-Ala-Cys” semelhante à existente em outras bactérias Gram negativas (Anderson *et al*, 1988). Dasch (1981) demonstrou ainda, que as rickettsias do grupo tifo têm uma proteína específica de espécie que seria análoga das proteínas de “choque” de outras bactérias (“*heat shock protein*”).

A parede celular das rickettsias revelou ser formada por três camadas lipoproteicas e um peptidoglicano que contém ácido glutâmico, alanina, ácido murâmico e ácido diaminopimélico (Wood e Wisseman, 1967). Este último aminoácido está presente nas cadeias peptídicas da parede celular apenas das bactérias Gram negativas. Este peptidoglicano é insolúvel em detergentes iónicos, é sensível às lisozimas e tem uma sequência de aminoácidos semelhante à encontrada em *E. coli*. (Silverman e Wisseman, 1978; Pang e Winkler, 1994b). Os lipopolissacarídeos da membrana celular (LPS) constituiriam o antigénio específico de grupo, isto é, existiriam em todas as rickettsias do grupo das febres exantemáticas e em pouca quantidade nos agentes do grupo tifo (Hechemy *et al*, 1986). Como já foi referido, seriam o equivalente ao “antigénio solúvel” de outras bactérias, actuariam nas reacções de fixação do complemento e dariam origem às reacções imunitárias cruzadas que ocorrem entre as próprias rickettsias e com outros grupos de microrganismos (Raoult e Dasch, 1989; Teyssere e Raoult, 1992; Beati *et al*, 1994b). Os LPS, de ambos os grupos de rickettsias, distribuem-se, por eletroforese, em bandas de diferentes pesos moleculares, tendo um perfil semelhante ao encontrado no grupo de enterobactérias não-rugosas (Hechemy *et al*, 1986). A membrana citoplasmática apresenta o modelo clássico da “membrana unitária”. Ao microscópio electrónico surge como duas linhas escuras, lípidos, separadas por uma zona mais clara, proteínas (Hase, 1985).

A estrutura interna (citoplasma) consiste em grânulos opacos aos electrões e filamentos finos, que correspondem a ribossomas e ADN, respectivamente. Foram isolados de rickettsias cerca de 11,3 µg de ARN e 2,6 µg de ADN (Pang e Winkler, 1994a). A concentração de ribossomas no citoplasma/por célula é equivalente à existente em *E. coli*,

apesar da produção de proteínas pelas rickettsias ser limitada (Pang e Winkler, 1994a). A percentagem molar dos conteúdos em guanina (G) e citosina (C) varia nas diferentes espécies de rickettsia (as do grupo tifo têm 30% e as do grupo das febres exantemáticas 32,5%) (Schrameck, 1972). Esta diferença é significativa e indica uma evolução divergente (Tyeryar *et al*, 1973). O conteúdo molar de G+C é baixo, em comparação com o conteúdo dos seres de vida livre. Este facto suporta a hipótese de Singer e Ames (1970) de que seria típico de parasitas intracelulares, e de outros organismos que estão protegidos das radiações ultravioletas e sujeitos apenas a radiactividade natural, um baixo conteúdo molar destes nucleotídeos. A razão apontada por estes autores é de que as duplas pontes de hidrogénio estabelecidas entre os nucleotídeos adenina (A) e timina (T) seriam mais fáceis de se estabelecer, embora fossem menos estáveis do que as ligações triplas entre citosina e guanina. Por este motivo, nos organismos protegidos da acção catalítica da luz ultravioleta, a quantidade de A+T seria maior do que C+G.

O ADN das rickettsias é duplo, com um tamanho menor, embora comparável ao de outros microrganismos de mesma dimensão ( $110-150 \times 10^7$  daltons, o que corresponderia a cerca de 2000 pares de bases). Inicialmente, considerou-se que o facto das rickettsias serem parasitas intracelulares obrigatórios não resultaria de terem um genoma menor, mas poderia ser devido às sucessivas adaptações ao ambiente intracelular que desenvolveram no decurso da evolução (Myers *et al*, 1979; Myers e Wisseman, 1980). Porém, alguns autores justificam o parasitismo obrigatório destas bactérias por terem perdido material genómico, dando origem a um cromossoma menor que o das outras bactérias filogeneticamente relacionadas (Roux *et al*, 1992). A apoiar esta hipótese, foi encontrado apenas um gene a codificar as subunidades 16S e 23S rARN com o operão diferente do das bactérias de vida livre. Este facto aponta para que as rickettsias possam ter sofrido deleções no genoma ancestral, após recombinações intracromossómicas em vários genes, tornando-se parasitas (Pang e Winkler, 1993; Andersson *et al*, 1995; 1996).

Numa tentativa de compreender o parasitismo obrigatório destas bactérias ou com outros objectivos, como o de conseguir a produção de uma vacina, alguns genes têm sido isolados e caracterizados. Já foram sequenciados alguns genes que codificam proteínas com actividade enzimática (Phibbs e Winkler, 1982; Wood *et al*, 1987; 1993; Winkler, 1990; Vishwanath *et al*, 1990; Aliabadi *et al*, 1993; Dunkin e Wood, 1994). A caracterização da ARN polimerase das rickettsias (Marks *et al*, 1992) revelou que esta enzima, embora semelhante à de *E. coli*, pode transcreever mais do que um gene (Ding e Winkler, 1993). Determinou-se também, que esta polimerase tem uma baixa razão de activação pelo factor catalítico  $\delta$ , responsável pelo reconhecimento do local apropriado no ADN para a síntese de ARN, em contraste com o que acontece em *E. coli* (Ding e Winkler, 1994). Este último facto poderia ser uma explicação para a velocidade de multiplicação lenta das rickettsias.

*"As for parasitism in general, harm to the host is a useless by product. Perfection of parasitism would entail infection that stimulated neither disease nor immunity..."*

D. Walker, *The rickettsia – host interaction*, Intracellular Parasitism, 1988

#### 4. CONSIDERAÇÕES

O estudo da biologia das rickettsias tem sido realizado por poucos grupos de investigadores e muitos dos resultados não são comparáveis, talvez devido a utilização de diferentes abordagens. A razão do parasitismo obrigatório deste grupo de bactérias é ainda uma questão sem resposta. Todos os autores são unânimes em afirmar que um parasita intracelular de sucesso deve ser capaz de criar dentro da célula um microambiente, em que os metabolitos estejam equilibrados, sem lesar o hospedeiro. A perda deste ambiente, quando situadas extracelularmente, poderia ser o factor limitativo da vida livre das rickettsias. Pensa-se que as condições microaerófilas do citoplasma protegeriam os grupos sulfidrilos das enzimas rickettsianas do ataque pelo oxigénio mantendo sua actividade; por isso o aumento de dióxido de carbono no meio celular facilitaria a sua multiplicação (Weiss, 1968).

Da literatura especializada ressalta ser possível que em todas as experiências realizadas, para cultivar rickettsias na ausência de células, falte um factor chave ou então que os compostos adicionados aos meios sintéticos não sejam necessários ou sejam tóxicos ou até mesmo antagonistas destas bactérias. Especula-se, ainda, que as rickettsias quando fora das células poderiam entrar em “dormência” e teriam as suas actividades enzimáticas inibidas, tal como acontece com as bactérias de vida livre quando em condições desfavoráveis. Um factor do meio ambiente intracelular poderia ser essencial para a indução da acção de algumas enzimas de síntese e para a sua activação. Ou, o mais provável, é que o equilíbrio fisiológico entre os mecanismos de repressão, indução e inibição pelos produtos finais das reacções metabólicas seja mais delicado nas rickettsias do que nas outras bactérias e que esteja extremamente adaptado ao ambiente intracelular. As vantagens em termos evolutivos seriam óbvias. As rickettsias só se multiplicariam quando as condições do ambiente intracelular fossem óptimas. Assim que o processo de multiplicação implicasse na diminuição de alguns metabolitos celulares a indução seria interrompida (ou a inibição pelos produtos finais actuaría), antes da lesão irreparável da célula hospedeira (Winkler, 1987).

Por fim verifica-se que, ao se adaptarem ao citoplasma da célula hospedeira, as rickettsias desenvolveram sistemas de transporte especializados para explorar um meio ambiente rico

em nutrientes, ao mesmo tempo que mantiveram algumas das vias bioquímicas de síntese, comuns à todas as bactérias Gram negativas de vida livre. Talvez a interligação entre estes dois processos é que tenha sido quebrada (ou não estabelecida) não permitindo assim que o microrganismo explore os dois nichos ecológicos, tal como acontece com *Brucella*, *Listeria* e com outras bactérias intracelulares facultativas (Hanawa *et al*, 1995).

Os estudos genéticos têm, por agora, fornecido dados pontuais; no futuro a análise integrada dos vários resultados poderá dar uma resposta para as questões sobre a biologia destas e de outras bactérias parasitas.

## **IV**

### **Rickettsias Patogénicas para o Homem**



*"Except for the families and friends of the victims, most people could argue with conviction that antibiotics and insecticides has eliminated rickettsiosis as a threat to modern society"*

WHO, Report of a working group on rickettsial diseases, 1981

## 1. INTRODUÇÃO

O género *Rickettsia* engloba várias espécies de bactérias que são transmitidas ao Homem por artrópodos. Estes microrganismos induzem patologias, cujos sintomas comuns são a febre e o exantema cutâneo. A constatação de que um único género de microrganismos é o responsável por várias doenças humanas salienta o importante papel que estes agentes tiveram na morbidade e mortalidade das populações, ao longo da História da Humanidade. A patologia de referência, causada por rickettsias, é o tifo exantemático epidémico.

Na presente dissertação encontra-se uma curta revisão sobre as espécies causadoras de rickettsioses humanas, do grupo tifo e do grupo das febres exantemáticas, constantes no Manual de Bacteriologia Sistemática (Krieg e Holt, 1984). Para além dos factos já conhecidos, procura-se abordar os dados publicados recentemente. Também são referenciadas as novas rickettsias patogénicas para o Homem classificadas no "*International Journal of Systematic Bacteriology*".

## 2. *RICKETTSIA PROWAZEKII* da Rocha Lima, 1916

agente etiológico do tifo epidémico, febre das prisões, febre da fome, *morbus hungaricus*, tifo histórico, dermatifo, tifo exantemático, *louse-borne typhus*, *tabardillo*, *fleckfieber*...

As referências aos sinais clínicos e aos sintomas, hoje relacionados com o tifo epidémico, acompanharam todas as descrições de guerras e batalhas que ocorreram na Europa. As primeiras crónicas militares que referem a existência do tifo são as do cerco de Granada, Espanha, em 1489 (McNeill, 1979). Nas Américas o tifo epidémico foi responsabilizado pela morte de 2 milhões de indígenas no México, entre 1576 e 1577. Durante a II Guerra Mundial esta doença afectou as forças aliadas no Norte de África e, em 1943, reapareceu na Europa, vários anos após da sua aparente erradicação (Snyder, 1965; Weiss, 1988).



O termo rickettsia foi mencionado pela primeira vez numa publicação de Rocha Lima (1916), microbiologista brasileiro, patologista do “*Tropeninstitut*” de Hamburgo. Rocha Lima denominou o agente etiológico do tifo epidémico, *Rickettsia prowazekii*, em honra aos dois cientistas que admirava e que morreram ao contraírem esta doença: o americano Ricketts (morto em Maio de 1910) e o austríaco Prowazek (morto em Fevereiro de 1915) (Bier, 1960; Bacellar, 1963).

O tifo epidémico é uma doença aguda, marcada clinicamente pela prostração, por um exantema purpúrico, um gráfico de temperatura característico e por envolvimento cerebral. A palavra tifo deriva do grego e expressa os sintomas sensoriais que aparecem no decurso da doença (τιφο = obnubilação, torpor) (Snyder, 1965; Walker, 1990).

O Homem é considerado o reservatório natural de *R. prowazekii* e a transmissão é feita pelo piolho do corpo humano, *Pediculus humanus humanus*. Para a ocorrência de uma epidemia de tifo clássica são necessários três factores: populações humanas susceptíveis; presença do piolho humano, vector da doença; e um reservatório infectado com *R. prowazekii*. Os piolhos do corpo são parasitas altamente específicos do Homem e morrem, geralmente, uma a duas semanas após a infecção por *R. prowazekii*, não sendo considerados reservatórios do agente (Boese *et al*, 1973). A sobrevivência de *R. prowazekii* na natureza, entre os surtos epidémicos, é garantida pelo Homem que se pode tornar portador assintomático da bactéria. A doença pode recrudescer, muitos anos após a infecção primária, numa forma menos grave, que é conhecida como doença de Brill-Zinsser ou tifo esporádico. Esta virulência diminuída possibilitaria, assim, a sobrevivência interepidémica da rickettsia (Zinsser, 1935; Smadel, 1963; Snyder, 1965; Gaon e Murray, 1966). Além da benignidade do tifo esporádico, outra indicação de que a virulência da bactéria poderia efectivamente variar, veio do estudo de estirpes de *R. prowazekii* isoladas quando o tifo epidémico estava generalizado na Europa de Leste, em Espanha e em África, durante e logo a seguir à II Guerra Mundial. Estas estirpes têm antigénios de superfície e características biológicas ligeiramente diferentes entre si, com variações no seu potencial patogénico para o Homem e para o piolho (Balayeva *et al*, 1973; Regnery *et al*, 1983).

Até há alguns anos atrás, aceitou-se como regra, que o agente do tifo epidémico estava limitado ao Homem e não era transmitido a outros hospedeiros na natureza. Isto, apesar de já terem sido detectados anticorpos contra *R. prowazekii* em vários animais domésticos na Etiópia, Sérvia, Egipto, México e Equador, o que implicava um papel, ainda que limitado, destes animais na epidemiologia da doença (Iman e Alfy, 1966; Philip *et al*, 1966). No fim da década de 70, foi descoberto, nos E.U.A., um reservatório não humano de uma variante genética de *R. prowazeki*. Tanto o esquilo voador, *Glaucomys volans*, como os seus ectoparasitas (pulgas e piolhos) foram encontrados infectados naturalmente com esta

rickettsia (Bozeman *et al*, 1975). Mais ainda, todos os casos de tifo epidémico naquele país, puderam ser relacionados com o contacto com aqueles animais, incidindo especialmente nos turistas que frequentavam os parques naturais da Flórida e da Virgínia (McDade *et al*, 1980). O real significado deste reservatório não humano na epidemiologia do tifo epidémico ainda é objectivo de debate. Apesar do conhecimento de que as estirpes de rickettsias isoladas de esquilos têm variação genética, são questões sem resposta se existem outros ciclos silváticos por descobrir, se existia um ciclo silvático e a infecção do Homem resultou da sua introdução accidental, ou se o esquilo é que se tornou um reservatório através de uma fonte humana de rickettsias (Dasch *et al*, 1978; Regnery *et al*, 1986).

### **3. RICKETTSIA TYPHI** Wolbach e Todd, 1920

agente do tifo endémico, tifo murino, tifo das pulgas, tifo urbano, *shop typhus*, *flea-borne typhus*...

O tifo murino ou tifo endémico é uma doença infecto-contagiosa, sinais clínicos e sintomas semelhantes aos do tifo epidémico embora mais atenuados e raramente mortal (Walker, 1990; Dumler, 1994). O agente etiológico, *Rickettsia typhi*, foi identificado por Mooser em 1932, e até hoje, alguns autores preferem designá-lo *Rickettsia mooseri*, em honra àquele investigador (Snyder, 1965). A doença está associada à presença de ratazanas (*Rattus rattus* e *R. norvegicus*) e as suas pulgas e piolhos, e é detectada com maior prevalência em zonas portuárias (Azad, 1990).

Até os anos 40, o tifo murino ocorria frequentemente na Europa Ocidental, na América do Norte e ao longo da costa oeste da América do Sul. Actualmente, devido ao controlo de roedores e seus ectoparasitas, o tifo endémico tem sido raramente notificado nos países desenvolvidos, apesar dos cientistas serem unânimes em afirmar que existe em todos os países onde é devidamente procurado. Recentemente, na ilha de Evia, Grécia, após vários casos de doença, foi feito um estudo epidemiológico por análise genética ("PCR") e serológica (IFA) tendo sido encontrado tanto as pulgas como *R. rattus* com altas frequências de infecção (Tselentis *et al*, 1996).

A ecologia do tifo murino e o mecanismo de transmissão ainda estão pouco estudados, o diagnóstico específico é raramente pedido ou feito e a doença é confundida com outras (Traub *et al*, 1978; Dumler, 1994). Um factor epidemiológico comum aos novos casos de tifo murino resulta do extermínio dos roedores sem o controlo dos vectores que, ao perderem a sua fonte de alimentação, passam a parasitar o Homem (Snyder, 1965).

Além das ratazanas, que são os principais reservatórios naturais do agente etiológico, foram encontrados infectados ou com serologia positiva, ainda que em menor escala, outros roedores como *Mus musculus* (ratinho caseiro), insectívoros, marsupiais e o gato doméstico. A infecção no reservatório animal não é mortal e durante o período rickettsiémico, que dura de uma a duas semanas, as rickettsias podem ser eficientemente transmitidas aos artrópodos vectores e estes, por sua vez, podem transmiti-las a outros animais ou ao Homem (Azad, 1988; Azad e Traub, 1989).

O principal vector do tifo murino é a pulga do rato, *Xenopsylla cheopsis*, que também mantém a rickettsia na natureza transovariamente. A aquisição de rickettsias pelas pulgas é feita durante a refeição em hospedeiros vertebrados rickettsiémicos. Ao efectuar a digestão enzimática das células do sangue infectado o insecto liberta as rickettsias intracelulares e estas bactérias vão colonizar as células do intestino destes artrópodos (Vaughan e Azad, 1990). Foi também demonstrado que é possível a transmissão por via oral aos ratos, o que leva a considerar o contágio humano por aerossóis infectados em áreas infestadas por pulgas (Traub *et al*, 1978).

#### **4. RICKETTSIA RICKETTSII (Wolbach, 1919) Brumpt, 1922**

agente da febre das Montanhas Rochosas, febre de Bull, febre negra, doença azul, tifo-malária, *fièvre manchada* (México), Tobiã (Panamá e Colômbia), febre de São Paulo, febre maculosa brasileira ...

A febre das Montanhas Rochosas é a doença mais severa do grupo das febres exantemáticas causadas por rickettsias transmitidas por ixodídeos e já foi considerada como uma das mais graves doenças infecciosas da América do Norte (Helmick e Winkler, 1980).

Nos E.U.A., no estado de Montana, há muitos anos que os índios reconheciam a existência de áreas geográficas onde “*evil spirits were present in spring*” evitando-as nesta estação (Weiss, 1988). Quando os colonos europeus se estabeleceram no leste americano e a mortalidade devida a uma afecção febril exantemática chegou a atingir 70 a 80%, no Vale de Bitterroot nas Montanhas Rochosas, iniciou-se uma epopeia na história da epidemiologia das doenças infecciosas (Harden, 1990). O estudo da febre das Montanhas Rochosas é um exemplo, ainda actual, de como uma pesquisa sistemática sobre uma doença deve ser realizada e pelo impulso que deu ao conhecimento da ecologia, etiologia e patologia das zoonoses.

Numa série de experiências brilhantes, realizadas entre 1906 e 1909, Ricketts e colaboradores demonstraram, entre outros factos, que os ixodídeos, habitando os dois lados do referido vale, estavam infectados com um microrganismo bacteriano; que a aquisição da

infecção pelo artrópodo era feita durante a alimentação em animais silváticos infectados; e, que as carraças transmitiam a infecção à sua descendência, transovaricamente. Ricketts descreveu os microrganismos que observou, em animais infectados experimentalmente e nos ovos dos ixodídeos, como pequenos corpos diplococóides ou diplobacilos; reconheceu que nem todos eram infecciosos e postulou que, em alguns ixodídeos, a bactéria perdia a sua virulência, especialmente após um inverno rigoroso (Ricketts, 1991).

Foi Wolbach (1919), porém, quem descreveu detalhadamente o agente. Observou um bacilo intracelular com marcada preferência pelo endotélio dos vertebrados e, apesar de reconhecer as semelhanças com os agentes do tifo e da febre fluvial do Japão, denominou-o *Dermacentroxenus rickettsii*. Brumpt (1932a), propôs que o nome fosse alterado para *Rickettsia rickettsii*. Muito do que se postula sobre as rickettsias do grupo das febres exantemáticas resulta dos trabalhos realizados com *R. rickettsii*, espécie padrão do grupo.

A febre das Montanhas Rochosas é uma doença sistémica proteica; as rickettsias infectam e lesam os vasos sanguíneos e os efeitos fisiopatológicos são consequência do aumento da permeabilidade vascular e da perfusão reduzida dos órgãos. O período de incubação varia entre 2-14 dias e os primeiros sinais clínicos da doença são a febre, o mal estar e cefaleias severas. O exantema, que se torna hemorrágico, surge após o terceiro dia do início dos sintomas, em 90% dos casos (Walker, 1989b). O agente, *R. rickettsii*, está restrito ao continente americano e que o vector e reservatório natural são os ixodídeos, principalmente dos géneros *Dermacentor*, na América do Norte, *Rhipicephalus* e *Amblyomma*, na América Central e do Sul (Bustamante e Varela, 1947; Peacock *et al*, 1971; McDade e Newhouse, 1986; Melles *et al*, 1992; Sexton *et al*, 1993; Walker, 1995).

A relação entre *R. rickettsii* e os hospedeiros artrópodos foi intensamente estudada por Burgdorfer e colaboradores nos anos 70. Observaram que, dos ovos postos por um ixodídeo infectado com rickettsias, eclodiam larvas infectadas, que ao se alimentarem em pequenos mamíferos transmitiam-lhes as bactérias. Ainda que, larvas não infectadas que efectuavam uma refeição sanguínea ao mesmo tempo que as infectadas, também podiam ficar infectadas. As ninfas que resultavam da muda destas larvas mantinham as bactérias e ao se alimentarem em animais de maiores dimensões repetiam o ciclo de infecção: da ninfa para o vertebrado e deste para outros ixodídeos (larvas e adultos) não infectados. Da mesma forma, os adultos que eclodiam continuavam infectados e, além disso, os machos podiam passar as rickettsias para as fêmeas não infectadas, durante a cópula. As fêmeas ao fazerem a postura de ovos fechavam o ciclo de infecção de uma geração de ixodídeo. A infecção podia persistir durante toda a vida da carraça e, se na natureza a transmissão transovárica raramente ultrapassava os 10%, no laboratório obtiveram-se 100% de ovos e larvas infectadas (Burgdorfer *et al*, 1966; Burgdorfer, 1975; 1980; Burgdorfer e Brington, 1975). Embora, o hospedeiro vertebrado não seja

fundamental para o ciclo natural, mantém o número de carraças infectadas “*de novo*” em substituição das que, devido a presença de rickettsias nas células do ovário, não fazem postura (McDade e Newhouse, 1986).

Apesar da existência de um número considerável de estudos serológicos em animais silváticos e domésticos que contactaram com *R. rickettsii*, o isolamento da bactéria a partir de amostras de sangue ou de órgãos é raro. Este facto é consequência do curto período de tempo em que os animais ficam rickettsiémicos e porque nem todos os vertebrados desenvolvem níveis elevados de rickettsias no sangue (Burgdorfer, 1977). A infecção natural de vertebrados foi demonstrada, pela primeira vez no Brasil, em 1930, em canídeos, roedores e marsupiais (Dias e Martins, 1939) e nos E.U.A., em 1954, no rato-calunga (*Microtus pensylvanicus*) (Gould e Miesse, 1954). Muitos outros roedores, insectívoros, lagomorfos, marsupiais, artiodáctilos e carnívoros foram encontrados com serologia positiva e/ou com rickettsias (McDade e Newhouse, 1986). A infecção do cão tem particular interesse na epidemiologia desta espécie. O vector principal de *R. rickettsii*, no leste dos E.U.A., *Dermacentor variabilis*, é considerado a carraça do cão. Os ixodídeos são trazidos ao contacto com o Homem pelo animal doméstico e são uma fonte de infecção, não só pela picada como pelo contacto das mucosas com material biológico infectado (Sexton *et al*, 1976; Norment e Burgdorfer, 1984).

O Homem é um hospedeiro acidental e a sua infecção é normalmente o reflexo de mudanças ecológicas que introduz nos ambientes naturais. O aumento da incidência da febre das Montanhas Rochosas nos E.U.A. é atribuída à suburbanização, à criação de novos habitats (jardins, parques naturais, etc.) onde os vectores e os reservatórios mamíferos proliferam e ao maior contacto do Homem com a natureza em actividades lúdicas (turismo e campismo) (Sonenshine *et al*, 1972; Salgo *et al*, 1988; Dalton *et al*, 1995).

## 5. RICKETTSIA CONORII Brumpt, 1932

agente da febre botonosa, febre de Marselha, febre escaro nodular, febre exantemática mediterrânica, Kenya tick typhus, Indian tick typhus, South African tick-bite fever, Israel tick typhus, Thai tick typhus, exantema tifóide estival, febre de Conor e Bruch...

A doença causada por *Rickettsia conorii* foi reconhecida pela primeira vez em Tunis, por Conor e Bruch (1910) e designada por “*fièvre boutonneuse de Tunisie*”. Em 1910, estes autores comunicaram à “*Société de Patologie Exotique*” as suas observações sobre uma doença exantemática que se caracterizava por “*éléments dermo-épidermiques, s’effaçant en partie par la pression, de couleur rose ou rouge foncé, de la grosseur d’une lentille ... Elles sont difficiles à classer dans le cadre nosologique... ni taches, ni des macules, ni des papules.... de lésions boutonneuses...*”.

Em França, a doença foi redescoberta nos anos 20, ocorrendo ao longo da costa mediterrânica. As pesquisas dos investigadores franceses foram essenciais para o estudo desta patologia:

- a) identificaram clinicamente a doença (Olmer, 1925);
- b) descreveram a escara de inoculação, “*tache noire*” (Piéri e Brugeas, 1925);
- c) demonstraram o papel do ixodídeo *Rhipicephalus sanguineus* como reservatório e vector do agente (Durand, 1930; Troisier e Cattan, 1931; Brumpt, 1932b);
- d) comprovaram a identidade entre a “*fièvre de Marseille*” e a “*fièvre boutonneuse de Tunisie*” por uma série de trabalhos de inoculações experimentais no Homem (Blanc e Caminopetros, 1932).

A doença foi dada como endémica no sul de França (na região de Avignon e Marselha) (Olmer, 1925), em Trípoli, Itália, Grécia, Creta e Roménia (Blanc e Caminopetros, 1932), em Portugal (Jorge, 1930a), em Espanha (Albaladejo, 1941), na Palestina, Marrocos e Egipto (Lemierre, 1934; Meskini *et al*, 1995), na Crimeia (Zdrodovskii, 1966) e Ucrânia (Rehacek e Tarasevich, 1988). Foi encontrada na Somália, Quênia, República Centro-Africana, Gana, Camarões, Congo, Ruanda, Zimbabué, Moçambique e África do Sul (Roberts, 1935; Pipjer e Dau, 1936; Philip *et al*, 1966; Hoogstraal, 1967; Kelly e Mason, 1991; Brouqui *et al*, 1992b). Na Ásia, foi descrita na Índia (Philip *et al*, 1950; Philip, 1952; Marchete, 1966), Paquistão e Tailândia (Robertson *et al*, 1970; Robertson e Wisseman, 1973). Algumas vezes a doença foi encontrada em zonas consideradas não endémicas (Canadá, Suécia, Suíça, entre outros) sendo a sua ocorrência atribuída à introdução de vectores e/ou humanos que adquiriram a infecção em zonas endémicas (Chamot *et al*, 1987; McDonald *et al*, 1988; Vene, 1989). Foi também descrito um caso no Uruguai, sendo a primeira referência de *R. conorii* nas Américas (Conti-Diaz *et al*, 1990).

A diversidade de nomes por que esta doença é conhecida reflecte esta distribuição geográfica alargada e cada estirpe do agente etiológico, isolada localmente, recebeu uma designação sub-específica. A Organização Mundial de Saúde (WHO) aconselhou a agrupar sob a mesma terminologia, “*tick-borne typhus*”, todas as rickettsioses causadas por *R. conorii*, descritas na costa do Mediterrâneo, tanto do lado europeu como do lado africano e asiático, bem como em Portugal e Espanha, e ainda as descritas um pouco por toda África tropical. Porém, como foi referido, é mais frequente encontrá-las denominadas na literatura especializada como febres exantemáticas causadas por rickettsias do “complexo *R. conorii*”.

O agente da febre escaro nodular, *R. conorii*, classificado no grupo das febres exantemáticas, foi diferenciado de *R. rickettsii* pela reacção de fixação do complemento e pelo teste de toxinas para o murganho (Bozeman *et al*, 1960; Bell e Stonner, 1960; Oaks e Osterman, 1979). O conceito de que todas as estirpes geográficas de *R. conorii* pertencem a uma mesma espécie resultou da comparação da sua biologia e, particularmente, das suas propriedades antigénicas (Bell e Stonner, 1960; Tyeryar *et al*, 1973; Pedersen e Walters, 1977; Anacker *et al*, 1980).

A febre escaro nodular é geralmente considerada menos grave do que a febre das Montanhas Rochosas. A bactéria é inoculada pela picada indolor da carraça. Contudo, considera-se que para a transmissão ocorrer é necessário que o ixodídeo se alimente no Homem cerca de 6 a 20 horas (Dupont e Raoult, 1993a; Raoult *et al*, 1993). Em cerca de 70% dos casos desenvolve-se no local da inoculação uma pequena úlcera com um centro necrótico, a denominada escara negra, patognomónica da doença. Após uma incubação de 5-7 dias iniciam-se bruscamente os quadros febris (acima de 40° C), com tremores, mialgias e cefaleias. O exantema maculo-papular aparece de seguida estendendo-se, caracteristicamente, às palmas das mãos e às plantas dos pés. A vasculite causada por *R. conorii* envolve quase que exclusivamente o endotélio dos vasos sanguíneos, sem atingir órgãos vitais. A maior parte dos casos, mesmo quando não tratados, resolvem-se naturalmente (Walker e Gear, 1985; Drancourt e Raoult, 1993). Podem, no entanto, tornar-se graves, por vezes fatais, em crianças com menos de dez anos, em adultos acima dos 50 anos de idade e em pessoas com outras patologias subjacentes como, por exemplo, cardiopatias e deficiência da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase ou de enzimas hepáticas. São ainda factores de risco a antibióticoterapia inicial errada e a inoculação por aerossóis ou por via conjuntival (Lemierre, 1934; Reina *et al*, 1982; Piras *et al*, 1983; Walker *et al*, 1986). Uma complicação frequente da infecção é a gangrena dos dígitos, com a consequente necessidade de amputação, mesmo em doentes sujeitos ao tratamento correcto, devido a coagulação estimulada pelas lesões vasculares causadas pelas rickettsias (Walker e Gear, 1985; Herrero *et al*, 1993a).

A cinética dos anticorpos no decurso da Febre escaro nodular é a seguinte: na fase aguda, as imunoglobulinas da classe M detectáveis surgem entre o sétimo e décimo dia após a inoculação, antes do início da febre e duram cerca de 4 meses; os anticorpos IgG atingem o título mais elevado à volta do terceiro mês após a infecção e podem persistir cerca de 4 anos, embora a média seja de um ano, com títulos baixos (Mansueto *et al*, 1983; 1985; Tringali *et al*, 1983). A antibióticoterapia, correcta ou não, pode decapitar a infecção, alterando a cinética dos anticorpos.

A Febre escaro nodular tem sido pesquisada por muitos inquéritos seroepidemiológicos os quais comprovaram:

- a) uma maior prevalência do que a indicada pela incidência (Babalís *et al*, 1993; Herrero *et al*, 1993; Raoult *et al*, 1993; Raoult *et al*, 1994);
- b) a existência de casos assintomáticos e sem exantema (Mansueto *et al*, 1984; Herrero *et al*, 1989; Brouqui *et al*, 1992a);
- c) uma distribuição geográfica mais vasta do que a conhecida (Fan *et al*, 1987a; 1987b).

O ixodídeo, *R. sanguineus*, também conhecido como a carraça do cão na região mediterrânica, foi confirmado como vector e reservatório (transmissão transovárica e transtadial) do agente na Europa, na Índia e em África (Roberts, 1935; Nobre, 1971; Tringali *et al*, 1986a; Gilot *et al*, 1990; Rehacek e Tarasevich, 1988; Kelly e Mason, 1991a). Em Itália, um técnico de laboratório se infectou, acidentalmente, com uma estirpe isolada desta espécie de ixodídeo, sofrendo a afecção típica, com excepção da escara (Perna *et al*, 1990). Outras espécies de ixodídeos foram referidas como infectados com *R. conorii* no Quénia (Heisch *et al*, 1962), na Etiópia (Philip, 1966), e na antiga Jugoslávia (Radulovic *et al*, 1993).

Considera-se que *R. conorii* pode ser encontrada num foco natural e num foco antroponóico. No foco natural, primário, rural e feral, as espécies sinantrópicas de roedores e outros mamíferos selvagens ou domésticos, e os seus ectoparasitas, desempenham um papel importante. Os estádios larval e ninfal do ixodídeo alimentam-se nos micro-mamíferos e os adultos em vertebrados maiores. O Homem pode eventualmente ser picado ao penetrar neste foco, geralmente em actividades relacionadas com a profissão (agricultura, pastorícia) ou de lazer (campismo, caça). O foco antroponóico, secundário e urbano, envolve a circulação do agente principalmente entre o ixodídeo e o cão doméstico. A doença geralmente apresenta-se restrita à determinada áreas, onde várias pessoas ficam doentes num curto espaço de tempo e onde casos novos são referidos todos os anos. O Homem infecta-se pela picada da ninfa ou do adulto, ou por contaminação das mucosas com tecidos ou sangue do vector infectado quando está a tratar da higiene do seu animal de estimação (Rehacek e Tarasevich, 1988; Gear, 1988; Dupont e Raoult, 1993b).

Na região mediterrânica o interesse por esta entidade clínica foi estimulado devido a um aumento dos casos clínicos na última década (Segura e Font, 1982; Raoult *et al*, 1984). Em Portugal a incidência foi estimada em 20 mil casos por ano (Tavares *et al*, 1985), enquanto que em Espanha, nas proximidades de Barcelona, a seroprevalência encontrada foi de 11,6% (Espejo-Arenas *et al*, 1990), em Salamanca de 37 a 73,5%



(Ruiz Beltran *et al*, 1990; Herrero-Herrero *et al*, 1993b), na zona de Soria 20% (Saz *et al*, 1993); em França 26% (Raoult *et al*, 1987); em Itália de 10 a 20% (Mansueto *et al*, 1984); na Grécia cerca de 50% (Babalís *et al*, 1993) e na costa leste do Adriático 42% (Radulovic *et al*, 1993). Alguns autores consideraram os factores climáticos como responsáveis por esta ressurgência: uma primavera quente originaria um maior número de casos de Febre escaro nodular no verão seguinte (Espejo-Arenas *et al*, 1986; Raoult *et al*, 1992). Outros sugerem que um melhor diagnóstico e um maior contacto das pessoas com a natureza seriam os factores responsáveis pelo aumento da incidência (Segura *et al*, 1989; Mansueto *et al*, 1984; Dupont e Raoult, 1993a).

As características clínicas da doença, tradicionalmente considerada como benigna, também têm sofrido alterações fisiopatológicas. Têm sido referidos casos com alterações nos factores de coagulação (Raoult *et al*, 1993; Mateos *et al*, 1986; Vicente *et al*, 1986; Laynez *et al*, 1994), com alterações hepáticas (Walker *et al*, 1986) e pulmonares (Rodríguez *et al*, 1989), com edemas disseminados (Ruiz *et al*, 1984; 1992) e um aumento de casos graves e fatais (Raoult *et al*, 1983; Walker *et al*, 1987; Molins *et al*, 1988; Chiner *et al*, 1989; Castella *et al*, 1991; Arranz *et al*, 1992).

No deserto de Negev, em Israel, foi demonstrado, que os episódios clínicos observados diferiam da Febre escaro nodular clássica pela ausência da escara de inoculação (Gutman *et al*, 1973; Goldwasser *et al*, 1974; Gross *et al*, 1981; Shaked *et al*, 1988; Sarov *et al*, 1991). Os estudos epidemiológicos nesta área revelaram que os micro-mamíferos estavam infestados com ixodídeos e que a colonização humana, especialmente com a introdução e a concentração de cães, gatos e outros hospedeiros, estendeu o foco natural um foco antroponozoonótico (Keysari *et al*, 1988; Mumcuoglu *et al*, 1990). Como oportunamente referido, as estirpes isoladas foram diferenciadas de estirpes padrão de *R. conorii* por imunofluorescência (Goldwasser *et al*, 1974) e pela análise genotípica (Manor *et al*, 1992; Eremeeva *et al*, 1993a; Roux e Raoult, 1995). A bactéria tem sido denominada "*R. israeli*", agente do tifo da carraça de Israel (Istt). No início dos anos 90, foi descrito um novo foco de Febre escaro nodular na região de Astrachan-Rússia (Tarasevich *et al*, 1991a; 1991b). As características clínicas, antigénicas e a análise de segmentos de ADN enfatizaram a semelhança do agente com a estirpe Istt (Drancourt *et al*, 1992a; Eremeeva *et al*, 1994b), embora tenha sido isolada do ixodídeo *R. pumilio* (Eremeeva *et al*, 1994b; 1995c). Estes dois agentes representam novos genótipos de rickettsia do grupo das febres exantemáticas que estão fenotípica e antigenicamente colocadas no "complexo-*R. conorii*".

No continente asiático o "complexo-*R. conorii*" também se têm revelado heterogéneo clínicamente e antigenicamente. "*Indian tick typhus*" (Itt), "*Pakistan tick typhus*" (Ptt) e

“*Thai tick typhus*“(Ttt) têm como agentes etiológicos estirpes de rickettsia que ainda não têm sua posição taxonómica definida (Robertson *et al*, 1970; Robertson e Wisseman, 1973; Eremeeva *et al*, 1993b)

## **6 . RICKETTSIA SIBIRICA Zdrovskij, 1949**

agente do tifo siberiano, tifo da carraça norte asiático, *Siberian tick typhus*, febre exantemática de Primorye...

Durante os anos de 1934 e 1935, os médicos russos, da região de Krasnoyarsk, no sul da Sibéria, notaram a existência de uma doença caracterizada por cefaleias severas, insónia, febres altas, um exantema róseo-papular e uma lesão no local da picada de um artrópodo. Nos quinze anos seguintes, o padrão epidemiológico desta patologia foi delineado e os isolamentos, a partir de doentes e de ixodídeos dos géneros *Dermacentor* e *Haemaphysalis*, comprovaram que era causada por um agente rickettsiano que foi denominado *Dermacentroxenus rickettsii* var. *sibirica* ou *Rickettsia sibirica* (Zdrovskij, 1966). Nos últimos anos tem sido referenciada como *Rickettsia sibirica* (Weiss e Moulder, 1984).

A espécie de referência foi isolada de *Dermacentor nutalli* (Bell e Stonner, 1960). Foi diferenciada das outras rickettsias do grupo das febres exantemáticas por reacções de fixação do complemento. A análise da estrutura antigénica comprovou a semelhança desta rickettsia com *R. rickettsii* e a sua identidade específica (Bell e Stonner, 1960; Yu *et al*, 1993). *R. sibirica* (e a doença de que é agente) é uma das rickettsias que tem a sua biologia mais bem estudada de todas as espécies do grupo das febres exantemáticas, na Europa. Os dados incluem a morbilidade humana, isolamentos a partir de vectores e vertebrados, a seroepidemiologia, bem como estudos fisiológicos, ultramicroscópicos e bioquímicos (Rehacek e Tarasevich, 1988; Yu *et al*, 1990).

O quadro clínico do tifo siberiano é caracterizado por um decurso febril remissivo, a presença da escara de inoculação, com linfadenopatia local e um exantema maculo-papular, tendo também sido referidos casos assintomáticos e casos não diagnosticados devido a sintomatologia não característica (Walker, 1989a). O tifo da carraça asiático ocorre principalmente em zonas agrícolas e os animais domésticos têm o papel de trazer as carraças infectadas para perto das habitações. As infecções urbanas são detectadas em pessoas que estiveram, recentemente, em zonas infestadas com ixodídeos. Os primeiros casos aparecem em Abril, com um pico de incidência em Maio-Junho, registando-se um declínio no Verão e um pequeno aumento em Setembro (Burgdorfer, 1980).

O tifo siberiano é encontrado numa extensa área da Sibéria, desde a costa do Pacífico até a Arménia, na actual República Russa. Os focos naturais estão associados aos habitats de esteques nos sopés das montanhas, com baixa pluviosidade. Nestas áreas habitam uma variedade de micromamíferos dos quais se isolaram estirpes e aí se detectaram anticorpos em animais domésticos. Também se encontraram pelo menos seis espécies de ixodídeos naturalmente infectados com esta rickettsia: *Dermacentor nuttalli* na Sibéria central, *D. silvarum* e *Haemaphysalis concina* no Extremo Oriente, *D. marginatus* e *H. punctata* na Ásia Menor e *D. pictus* na Sibéria ocidental e sudoeste (Zdrovskij, 1966; Burgdorfer, 1980; Rehacek e Tarasevich, 1988). Foi também referida na antiga Checoslováquia e ao sul da Boémia, no Paquistão e em três províncias do norte da China. Os limites de dispersão ao sul, de acordo com evidências serológicas, seriam o centro e sul da China, a Malásia e Tailândia (Robertson *et al*, 1970; Wang *et al*, 1987b; Rehacek e Tarasevich, 1988; Yu *et al*, 1993; Liu *et al*, 1995; Zhang *et al*, 1995).

A dispersão geográfica de *R. sibirica* está a ser reavaliada dado que muitos dos estudos serológicos feitos na Ásia foram realizados utilizando como antigénio a estirpe de rickettsia denominada Barbash, proveniente da WHO, que foi reclassificada, recentemente, como sendo na realidade *R. conorii* (Wang *et al*, 1987a). Os métodos mais antigos de identificação de estirpes também podem ter induzido em erro os investigadores e levado à classificação de *R. slovacica* como *R. sibirica*, já que não se conhecia a existência da primeira nesta área geográfica. Apenas há poucos anos Eremeeva e colaboradores (1993b) encontraram vários *D. marginatus* albergando aquela rickettsia não patogénica na Sibéria

Os ixodídeos são os reservatórios naturais e podem ser os vectores, já que principalmente o género *Haemaphysalis* pode parasitar o Homem, mesmo nos estádios larvar e ninfal. Os reservatórios vertebrados não desenvolvem doença (Zdrovskij, 1966).

## **7. RICKETTSIA AUSTRALIS Philip, 1950**

agente do tifo da carraça de Queensland, *Queensland tick typhus*, QTT...

A história das rickettsioses na Austrália iniciou-se com a colonização pelos europeus que levaram consigo o tifo epidémico e o tifo endémico. Os investigadores australianos ainda encontraram o tifo fluvial do Japão, entre as várias febres que assolaram periodicamente as costas do norte. Alguns autores referiram escaras e a picada de ixodídeos como associadas às patologias que observaram (Burnet, 1942).

Entre 1944 e 1945, os militares em treino de guerra nas florestas em áreas infestadas com ixodídeos, desenvolveram uma patologia que, com base nas evidências clínicas e serológicas, foi classificada como um tifo das carraças, com semelhanças com a Febre

escaro nodular, apesar da ausência da escara de inoculação (Cox, 1965). O agente etiológico foi isolado, pela primeira vez, a partir do sangue de dois militares que tinham sido picados por ixodídeos (Andrew *et al*, 1946). Os testes de identificação das bactérias, utilizados na época, e conduzidos em Melbourne e nos E.U.A., demonstraram que se tratava de uma nova espécie de rickettsia, *Rickettsia australis* (Plotz *et al*, 1946).

A doença foi denominada tifo da carraça de Norte Queensland (Qtt), pois os casos clínicos confirmados limitavam-se a Queensland, uma zona com habitats de savana, rodeados por cinturas de floresta tropical, densamente povoada com marsupiais e roedores e seus ectoparasitas: ácaros e ixodídeos. Subsequentemente, a infecção foi reconhecida por toda costa de Queensland e no litoral norte e centro de New South Wales (Sexton *et al*, 1991). Entre 1946-1989 foram descritos apenas 21 casos esporádicos, sem sazonalidade definida. Da análise clínico-epidemiológica destes, e de outros casos retrospectivos, definiu-se que o período de incubação da doença varia de 7 a 10 dias, tem um início súbito, com forte mal estar geral e cefaleia generalizada. Uma escara, semelhante à do tifo fluvial do Japão, associada a linfadenopatias, aparece em 75% dos casos, e a febre e o exantema são patognomónicos. A doença é em geral benigna e apenas um caso fatal foi descrito na literatura médica (Sexton *et al*, 1991).

Na área geográfica onde ocorre a Qtt são conhecidas quatro espécies de ixodídeos que podem parasitar o Homem: *Ixodes holocyclus*, *Haemaphysalis bancrofti*, *Boophilus annulatus* e *Rhipicephalus sanguineus*. Dos doentes febris foram retiradas carraças identificadas como *I. holocyclus* (Cox, 1965). Apenas em 1974, isolou-se *R. australis* de ixodídeos adultos não ingurgitados da espécie *I. holocyclus* e de ninfas *I. tasmani*, retiradas de *Rattus fuscipes* (Campbell e Domrow, 1974). São hospedeiros destes ixodídeos, roedores (*Rattus* sp, *Melomys* sp e *Uromys* sp) e marsupiais (*Isoodon* sp, *Perameles* sp). *I. holocyclus*, conhecida como a carraça das moitas, é responsável por 93% dos casos de parasitismo humano e encontra-se também a infestar animais domésticos, o que a torna uma séria candidata a vector da doença (Huang *et al*, 1990; Sexton *et al*, 1991).

Ao contrário das outras rickettsias do grupo das febres exantemáticas, *R. australis* é facilmente isolada em murganhos recém-nascidos, para os quais é muito virulenta (Campbell e Pope, 1968).

### 7.1. FISF (“Flinders Island spotted fever”)

Considerou-se que a febre de Queensland era a única doença exantemática transmitida por ixodídeos na Austrália, e que, embora o vector provável seja encontrado em toda a costa leste, esta doença estava restrita ao nordeste do continente. Em 1991, Robert

Stewart, o único médico residente há 20 anos nas ilhas Flinders, localizadas no sudeste da Austrália, próximo da Tasmânia, publicou os dados que recolheu sobre um grupo de pacientes que apresentavam uma doença exantemática, com menor incidência na presença de escara e linfadenopatias. Embora reconhecendo ser de origem rickettsiana e ser a picada de um artrópodo a porta de entrada, o agente etiológico não foi isolado. A doença foi denominada “febre exantemática das Ilhas Flinders” (FISF) (Stewart, 1991; Graves *et al*, 1991).

Em 1993, como consequência dos estudos iniciados após a comunicação de Stewart, foi isolada uma rickettsia a partir do sangue de doentes e de um dos enfermos foi retirado o ixodídeo, *Aponoma hydrosauri* (Graves *et al*, 1993). Um outro foco desta patologia foi detectado em East Gippsland, Vitória, onde *Ixodes cornuatus* seria o vector e *Rattus fuscipes*, o reservatório vertebrado (Dwyer *et al*, 1991; Graves *et al*, 1993). A análise do genoma deste microrganismo, por métodos de biologia molecular, indicaram que se tratava de uma nova espécie de rickettsia, patogénica para o Homem, para qual foi proposto o nome de “*Rickettsia honei*” (Graves *et al*, 1993; Stenos *et al*, 1994). Os estudos clínicos e epidemiológicos estão a decorrer e o significado da existência de espécies diferentes a causar febres exantemáticas no continente australiano deve ser reavaliado. Ou é o reflexo do isolamento geográfico, tão importante para a fauna e flora endémicas das ilhas ou as diferenças no genoma não serão “*per si*” suficientes para definir novas espécies.

## **8. RICKETTSIA JAPONICA Uchida, Uchiyama, Kumano e Walker, 1992.**

agente da febre exantemática oriental, febre exantemática japonesa, *Nihon Kohannetsu*...

No Verão de 1984, na ilha de Shikoku, Japão, foi descrita uma nova rickettsiose (Uchida *et al*, 1986; Okada *et al*, 1990). Os doentes apresentavam febre e exantema e uma picada de carraça foi identificada. A escara nem sempre se desenvolvia mas o tratamento, com os antibióticos apropriados, resolvia prontamente a situação clínica e os testes serológicos (Weil Felix) indicaram a identidade do agente com as rickettsias do grupo das febres exantemáticas. Até essa data, apenas eram conhecidas, no arquipélago japonês, a febre fluvial do Japão, o tifo endémico e o tifo epidémico, este erradicado a seguir à II Guerra Mundial. Como em Shikoku nunca tinha sido encontrada a febre fluvial do Japão e era conhecida a falta de especificidade do teste de Weil Felix, os investigadores japoneses realizaram uma série de pesquisas para confirmar a presunção nosológica da infecção ser uma febre exantemática causada por rickettsias.

Nos verões seguintes a doença foi sendo detectada numa área mais alargada, abrangendo desde o sul da referida ilha, à costa norte do lado sul da ilha de Honshu e à costa sul

perto de Tóquio (Uchida *et al*, 1988). Foram feitos 10 isolamentos humanos, 5 entre os anos de 1985 e 1986. Os estudos imunológicos comparando o agente isolado e os agentes das outras rickettsioses conhecidas, as diferenças nas características antigénicas e o estudo de microscopia electrónica levaram a considerar o agente da febre exantemática japonesa como uma nova espécie do grupo das febres exantemáticas (Uchiyama e Uchida, 1988; Uchida *et al*, 1989; Uchiyama *et al*, 1990; 1994a; 1994b). Foi-lhe dado o nome de *R. japonica* (Uchida *et al*, 1992).

Entre 1983 e 1991, cerca de 100 casos foram notificados no sudoeste do Japão, nas ilhas Kyushu, Shikoku e Honshu, a maior parte na costa virada ao Oceano Pacífico (Uchida, 1993) sendo esta considerada uma área endémica. O recurso a técnicas de biologia molecular para caracterização desta espécie, por perfis de segmentos de ADN (Yan *et al*, 1993), polipéptidos de superfície (Uchiyama *et al*, 1994b) e sequência do 16S rARN (Roux e Raoult, 1995), têm confirmado a sua identidade.

Na área endémica de Shikoku, os anticorpos específicos encontrados em cães e em roedores (*Rattus* sp e *Apodemus* sp) são mais elevados do que aqueles observados nas áreas não endémicas (Morita *et al*, 1989). De *Apodemus speciosus*, uma espécie dominante na fauna japonesa, foi isolada uma estirpe semelhante a *R. japonica* (Yamamoto *et al*, 1992). Este micromamífero é reconhecido também, como o hospedeiro principal dos estádios intermediários de vários ixodídeos. Em 1993, de uma larva do ixodídeo *Dermacentor taiwanensis*, fez-se o isolamento de uma rickettsia serologicamente próxima de *R. japonica*. Os autores consideraram que, além das larvas raramente picarem o Homem, esta espécie também não é antropofílica, porém este ixodídeo poderia fornecer um contributo para a manutenção do ciclo enzoótico da rickettsia. Os vectores mais prováveis serão as espécies do género *Haemaphysalis* (Takada *et al*, 1994).

**9. RICKETTSIA AFRICAE** Kelly, Beati, Mason, Matthewman, Roux e Raoult, 1996  
agente da febre da carraça africana, *african tick-bite fever*, *Zimbabwe tick-bite fever*, febre de carraça não recorrente endémica...

Nos anos 30, Pijper e colaboradores descreveram no sudoeste da África do Sul uma rickettsiose muito comum, a qual denominaram febre da picada da carraça. Na época, apesar de já ser conhecida a presença da Febre escaro nodular neste país, os investigadores diferenciaram as duas doenças com base em dados clínicos e epidemiológicos. A febre da picada da carraça era menos grave que a Febre escaro nodular, muitas vezes sem exantema e, aparentemente, sem casos fatais. Associaram-na mais à picada das

espécies de ixodídeos (*Amblyomma hebraeum*) que habitavam os “veldts” do Transvaal e na costa leste sul-africanas, do que daquelas (*Haemaphysalis leachi*) que tinham o cão como seu hospedeiro preferencial. Demonstraram também, a ausência de imunidade cruzada, entre os agentes da Febre escaro nodular e da febre da carraça, através de experiências em cobaios (Pipjer e Dau, 1936; Pipjer e Crocker, 1938).

Saliente-se aqui que, em 1912, Sant’Anna, médico português na antiga Lourenço Marques, Moçambique, descreveu pormenorizadamente uma doença humana, causada pela picada de larvas de carraças, identificadas como *Amblyomma hebraeum* e *Rhipicephalus simus*, apesar de então não a associar com uma rickettsiose. Em 1923, outro português, Prates, também a trabalhar no Laboratório Bacteriológico de Lourenço Marques, descreveu a doença e a sua epidemiologia. Porém, associou-a à febre fluvial do Japão, ainda que salientando que os vectores eram ixodídeos e não ácaros (Sant’Anna, 1912; Prates, 1923).

Entretanto, Gear (1939; 1954) descreveu, na África do Sul, alguns casos de uma rickettsiose severa, com infecção unilateral da conjuntiva, associados a contactos com cães e seus ectoparasitas. Explicou as diferenças de patogenicidade encontradas por Pijper e colaboradores, com base na idade e susceptibilidade dos hospedeiros e na reactivação da virulência da rickettsia após passagem pela carraça do cão, tal como aconteceria com *R. rickettsii* na América do Norte. Considerou *R. conorii* como agente etiológico das duas formas clínicas. Até há bem pouco tempo, todos os casos de febre por picada de carraça na África do Sul foram considerados como causados por esta última espécie, apesar de alguns autores considerarem o agente uma estirpe variante, denominando-a *R. conorii* var. *pijperi*. (Gear, 1939; Gear, 1978; Gear *et al*, 1983; Walker e Gear, 1985; Gear, 1988).

No Zimbabué, nos anos 90, foram obtidos vários isolamentos de rickettsia a partir de ixodídeos, animais domésticos e selvagens e de humanos. Com as técnicas de classificação baseadas na imunologia e na biologia molecular das estirpes concluiu-se, recentemente, que coexistiam estas duas espécies patogénicas de rickettsias do grupo das febres exantemáticas. *R. conorii*, associada a um ciclo urbano e antropozoonótico, e *R. africae*, isolada de *Amblyomma hebraeum*, um ixodídeo associado a ruminantes domésticos e animais silváticos (Kelly e Mason, 1990; 1991a; 1991b; Kelly *et al*, 1992; 1994;1996). Também, as estirpes de rickettsia isoladas na Etiópia e na República Centro-Africana a partir de ixodídeos, e consideradas *R. conorii* pelos métodos serológicos, parecem ser na realidade *R. africae* (Roux e Raoult, 1995).

## 10. *RICKETTSIA AKARI* Huebner, Jellinson e Pomerantz, 1946

agente da rickettsiose vesicular, *rickettsialpox*, gamasorickettsiose, rickettsiose variceliforme...

Uma nova patologia humana foi reconhecida, entre 1946 e 1949, quando cerca de 500 casos de doença foram notificados nos E.U.A. Entre os meses de Junho e Julho de 1946, 80 casos ocorreram em Nova York. O agente etiológico foi isolado de doentes, de ratinhos e de ácaros e denominado *Rickettsia akari* (Huebner *et al*, 1946a; 1946b). Este agente é o único membro do grupo das rickettsias das febres exantemáticas cujo vector é um ácaro e não um ixodídeo. A semelhança clínica dos sintomas com a varicela levou a doença a ser denominada de rickettsiose vesicular.

Após esta descoberta, os casos de doença e os isolamentos humanos de estirpes de *R. akari*, embora pouco numerosos, sugeriram uma distribuição mundial desta bactéria. São referidos casos na costa oeste dos EUA e esporadicamente em Nova York, o que indica a persistência do agente num ciclo enzoótico (Lackman, 1963; Brettman *et al*, 1981; Kass *et al*, 1994). Ainda, durante 1949-1950, uma outra área de incidência foi descrita na zona Balcânica, Crimeia e Ucrânia (Rehacek e Tarasevich, 1988). Foi isolada de roedores na Coreia (Jackson *et al*, 1957) e estudos serológicos indicaram a sua presença em quase todas as zonas do globo (Cox, 1965; Brezina *et al*, 1973; Rehacek e Tarasevich, 1988).

A doença causada por *R. akari* é considerada benigna, tanto nas Américas como na Eurásia, e cura-se, sem tratamento ou sequelas subsequentes, em uma ou duas semanas. Após um período de incubação de 9-14 dias, mais de 90% dos pacientes desenvolvem uma escara no local da picada, acompanhada de linfadenopatia regional. Surge um exantema maculo-papular que se torna vesicular e muitas vezes pruriginoso. Os outros sintomas são iguais aos das outras febres exantemáticas causadas por rickettsias: febre alta, mal estar geral, tremores, cefaleias e mialgias (Brettman *et al*, 1981).

O vector principal é o ácaro gamasídeo *Liponyssoides (Allodermanyssus) sanguineus*. O hospedeiro primário deste artrópodo é o ratinho-caseiro, *Mus musculus*. Quando o número dos animais diminui, por razões de medidas de controlo de roedores ou por doenças, como é o caso de dermatites ou do vírus da coriomeningite linfocitária (LCM), o Homem pode substituí-los como fonte de alimento para o ácaro (Krinsky, 1983). *L. sanguineus* é também o reservatório principal da rickettsia, já que esta passa para sua proge-nie transovarica e transtadialmente. O ciclo de vida deste ácaro dura cerca de dois meses. Os dois estadios ninfais alimentam-se apenas uma vez no vertebrado, porém o adulto ingere múltiplas refeições, o que lhe permite, tanto adquirir a bactéria a partir de vertebrados rickettsiémicos, como transmiti-la durante a sua vida (Fuller, 1954).



Além de *M. musculus*, *R. akari* foi isolada de *Rattus fuscipes* e de *Microtis fortis peliceus*, na Coreia e a existência da doença nos “*bush veld*” da África do Sul sugere que existem outros reservatórios silvestres para o agente (Jackson *et al*, 1957; Rehacek e Tarasevich, 1988).

A doença parece estar confinada a áreas definidas, especialmente nas cidades, onde os casos aparecem em pequenos focos epidémicos, principalmente entre trabalhadores de lojas, armazéns etc. O contacto entre os ectoparasitas e o Homem também é facilitado quando existem factores que favorecem a aglomeração de pessoas, como é o caso em zonas de guerra. A ocorrência sazonal, Primavera-Verão, está relacionada com a época em que os roedores se reproduzem (Cox, 1965).

Os estudos de microscopia electrónica, a análise do perfil polipeptídico e as propriedades biológicas comprovaram que as estirpes isoladas, tanto na América como na ex-URSS, são idênticas e relacionadas antígenicamente com os outros membros do grupo das febres exantemáticas, especialmente *R. rickettsii* e *R. conorii* (Pedersen e Walters, 1977; Weiss e Moulder, 1984; Emereeva *et al*, 1995a).

*" It is embarrassing to admit that we do not understand exactly  
how rickettsiae make us sick."*

D.Walker, Rocky Mountain Spotted Fever: a disease in need of microbiological concern, 1989b

## 11 . CONSIDERAÇÕES

Nos tempos actuais as rickettsioses são consideradas de pouca importância como doenças infecciosas para o Homem. Este é o reflexo da melhoria nos cuidados de saúde e da existência de antibióticos ainda eficazes. Porém, as rickettsioses continuam a ser um problema global, afectando o Homem em todos os continentes, com excepção da Antártida. Além disso os casos não diagnosticados, mal diagnosticados e não notificados mascaram o papel real que estas infecções têm na saúde pública mundial.

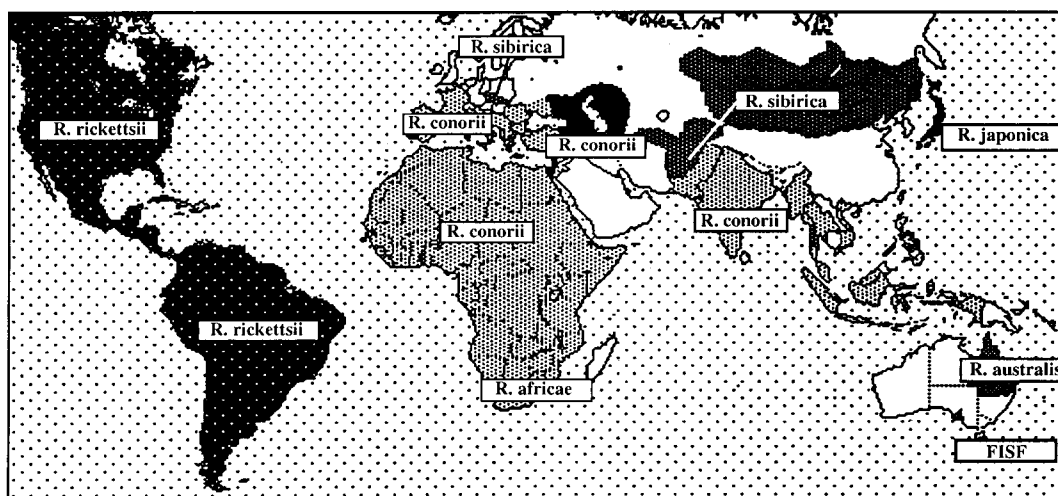
A Organização Mundial de Saúde considera que devido às suas complexas relações epidemiológicas, as rickettsioses requerem uma estreita vigilância e estratégias de controlo. A razão desta atitude diz respeito ao facto de que, apesar do aparente controlo obtido com o uso de antibióticos e com os insecticidas e acaricidas, nenhuma das rickettsias patogénicas para o Homem foi erradicada (Pervikov, 1991).

Assinalam-se a seguir alguns factos que poderiam justificar o interesse nestas patologias pelos Serviços de Saúde. Apesar do grande progresso obtido no conhecimento das rickettsioses desde a II Guerra Mundial, os métodos de diagnóstico, de prevenção e terapia mantiveram-se basicamente inalterados (Harden, 1990). Quanto ao tifo epidémico, na literatura já foram referidos alguns estudos de resistência a antibióticos de estirpes de *R. prowazekii*, assim como o piolho é resistente a diversos insecticidas (Weiss e Dressler, 1962; Shaked *et al*, 1989). Durante as pesquisas para obtenção de vacinas, verificou-se que a patogenidade desta espécie pode flutuar, passando de não virulenta a virulenta, consoante o hospedeiro, impedindo a sua utilização na imunização (Balayeva e Nikolskaya, 1973; Rodionov *et al*, 1991). Aliado a estes dados, não se pode deixar de ponderar a hipótese de uma nova epidemia surgir se observarmos as populações que vivem actualmente sob o risco de contrair tifo epidémico, especialmente as africanas. As actuais situações de conflito, com a consequente degradação dos sistemas de controlo sanitário, higiene e nutrição e a mobilidade das pessoas, traz-nos à memória os cenários descritos nos livros de História da Medicina sobre as epidemias de tifo que flagelaram a humanidade. Quanto ao tifo murino, em Inglaterra, recentemente foram publicados os dados sobre um caso fatal, adquirido em Espanha por uma turista, e os autores recomendam que as zonas onde exista a doença sejam declaradas de risco para o turismo (Pether

*et al*, 1994). A febre das Montanhas Rochosas, em indivíduos reavaliados vários anos após terem tido a doença, muito frequentemente deixa sequelas neurológicas graves (parésias, perda auditiva, disfunções motoras, incontinência) (Archibald e Sexton, 1995). A Febre escaro nodular e as outras rickettsioses consideradas menos graves têm, por sua vez, apresentado outras formas clínicas com inconveniente de co-existirem no mesmo espaço geográfico (Eurásia e África) (Kemper *et al*, 1992).

Alguns dos factores de risco conhecidos como responsáveis pela severidade das rickettsioses são: uma apresentação clínica com extrema variabilidade, com ausência de escara e exantema, resultando, provavelmente de um tratamento errado (Sexton e Corey, 1992); factores relacionados com a condição do doente, como por exemplo, idade avançada, sexo masculino, raça negra, deficiência na produção da enzima glucose-6-fosfato desidrogenase e deficiências hepáticas ou renais; ausência de diagnóstico laboratorial precoce com conseqüente atraso na terapia específica (Burgdorfer, 1980, Walker, 1990). O maior risco de mortalidade por rickettsiose está muitas vezes relacionado com o diagnóstico tardio e a antibióticoterapia inadequada (Kirkland *et al*, 1995). Também a “raridade” de algumas destas doenças faz com que a sua descrição desapareça dos compêndios de medicina, ficando incompleta a formação do agente de saúde.

Na figura 5 apresenta-se a distribuição das diferentes espécies de rickettsias do grupo das febres exantemáticas, tendo em conta que as rickettsias do grupo tifo e *R. akari* são consideradas de distribuição mundial.



**Figura 5.** Distribuição geográfica das espécies patogénicas de rickettsias do grupo das febres exantemáticas.

V

**Rickettsias Isoladas de Ixodídeos**



*"...the distribution of a pathogen is wider than that of disease caused by it and the latter cannot be understood without understanding the former as a whole"*

V. Harden, Rocky Mountain Spotted Fever, History of a Twentieth-Century Disease, 1990

## 1. INTRODUÇÃO

Nos grupos tifo e das febres exantemáticas encontram-se classificados alguns microrganismos classificados como rickettsias que foram isolados apenas a partir de Ixodoidea e, habitualmente, não são considerados como agentes etiológicos de doença humana.

Os primeiros dados sobre o parasitismo de ixodídeos por microrganismos semelhantes a rickettsias, considerados não patogénicos para o Homem, foram obtidos durante a pesquisa do agente da febre das Montanhas Rochosas (Ricketts, 1991). Na década de 70, o grupo que trabalhava no "*Rocky Mountain Laboratories*", Montana, E.U.A., chefiados por Burgdorfer, retomou o assunto. Este cientista de origem suíça ainda realizou este tipo de trabalho em colaboração com Aeschlimann, do "*Institut de Zoologie de Neuchâtel*", Suíça. Na antiga Checoslováquia, na Academia de Ciências de Bratislava, os estudos do grupo de Brezina, Rehacek e Urvolgyi, entre outros, originaram a descrição de novas espécies. Nos anos 90, os estudos de isolamento de rickettsias a partir de ixodídeos foram retomados na "*Unité des Rickettsies*" em Marselha, França, por Beati, Kelly, Raoult, entre outros.

Neste capítulo apresenta-se o resumo dos dados sobre as espécies de rickettsias e agentes, ainda sem nomenclatura oficial, que pertencem ao grupo das febres exantemáticas, dos quais apenas se conhecem estirpes isoladas de ixodídeos.

## 2. RICKETTSIA MONTANA Lackman, Bell, Stoenner e Pickens, 1965

*R. montana* foi isolada no leste do estado de Montana, nos E.U.A., durante os estudos conduzidos para estabelecer a prevalência de *R. rickettsii* nas espécies de ixodídeos *Dermacentor variabilis* e *D. andersoni* (Bell *et al*, 1963). Por várias características, entre as quais, o modo de crescimento no ovo embrionado e a composição antigénica, determinou-se que as estirpes isoladas eram semelhantes às outras rickettsias do grupo das febres exantemáticas, embora não fossem virulentas para o cobaio nem para o murganho.

Distinguiram-se das outras espécies pelo teste de neutralização de toxinas (Bell *et al*, 1963b) e por microimunofluorescência (Philip *et al*, 1978a). Foi também isolada em outras localidades do norte dos E.U.A., a partir de ixodídeos das mesmas espécies e de roedores dos géneros *Microtus*, *Pitymys* e *Peromyscus* (Lackman *et al*, 1965; Philip *et al*, 1978b; Feng e Waner, 1980; Linnemann *et al*, 1980; Magnarelli *et al*, 1981).

Os estudos genómicos realizados com *R. montana* indicaram que se trata de uma espécie que se situa fora do sub-grupo de *R. rickettsii*, mas próxima de *R. conorii* (Ralph *et al*, 1990). Filogeneticamente, *R. montana* fica numa posição entre os grupos tifo e das febres exantemáticas, juntamente com outras espécies de rickettsias isoladas apenas de ixodídeos, tanto na América como na Europa (Roux e Raoult, 1995).

### **3. RICKETTSIA PARKERI** Lackman, Bell, Stoenner e Pickens, 1965

*R. parkeri* foi isolada, após inoculação no cobaio, de carraças da espécie *Amblyomma maculatum*, capturadas em animais domésticos, nos estados do Texas, Georgia e Mississipi, na América do Norte (Goddard e Norment, 1986).

*R. parkeri* foi diferenciada de *R. rickettsii*, *R. conorii* e *R. sibirica* pela reacção de fixação do complemento, sendo colocada próxima de *R. conorii* (Lackman *et al*, 1965). Por microimunofluorescência (Philip *et al*, 1978a) foi integrada no sub-grupo de *R. rickettsii* (Philip *et al*, 1978b). O tipo de placas que produz em cultura de células é único e os anticorpos monoclonais produzidos contra os antigénios de superfície de 120 kDa e 155 kDa de *R. rickettsii* não reconhecem *R. parkeri*. Pela análise do ADN de uma estirpe de *R. parkeri* alguns autores classificam-na como idêntica *R. rickettsii* (Ralph *et al*, 1990). Contudo a análise do genoma total por electroforese em campo pulsado e a comparação dos perfis de segmentos de ADN mantêm a sua identidade (Regnery *et al*, 1991; Roux *et al*, 1992; Roux e Raoult, 1995). Provoca uma doença não fatal no cobaio, caracterizada por febre e edema do escroto (Lackman *et al*, 1965).

### **4. RICKETTSIA RHIPICEPHALI** Burgdorfer, Brinton, Krynski e Philip, 1978

*R. rhipicephali* foi isolada pela primeira vez de *Rhipicephalus sanguineus*, retirados de cães, no Mississipi, E.U.A. (Burgdorfer *et al*, 1975). Nos anos subsequentes foi detectada

um pouco por toda a América do Norte e, ocasionalmente, em *Dermacentor variabilis* (Burgdorfer *et al*, 1978;1981; Lane *et al*, 1981; Philip e Casper, 1981; Philip *et al*, 1981). Foram também encontradas estirpes em França (Drancourt *et al*, 1992b). A existência deste microrganismo em *R. sanguineus* na Europa sugere que acompanha a distribuição do artrópodo.

Estudos por fixação do complemento, microaglutinação, capacidade de induzir imunidade protectora em animais, microimunofluorescência, neutralização das toxinas e perfil proteico demonstraram que diferia de *R. rickettsii* e de outras rickettsias descritas como pertencendo ao grupo das febres exantemáticas (Burgdorfer *et al*, 1978; Philip *et al*, 1978a; Anacker *et al*, 1980). *R. rhipicephali* foi isolada por inoculação do macerado de carraças em *Microtus pennsylvanicus* (rato-calunga) e as estirpes foram mantidas em laboratório por inoculação experimental no artrópodo e por passagens transtadial e transovárica (Burgdorfer *et al*, 1975; Weiss e Moulder, 1984). A sua localização nas células hospedeiras e a ultraestrutura são típicas das rickettsias do grupo das febres exantemáticas. Distribui-se por todo o corpo da carraça, principalmente nas glândulas salivares, nos ovários e no laboratório transmite-se transovaricamente a 100% das larvas que eclodem (Burgdorfer *et al*, 1975). Esta rickettsia é moderadamente patogénica para o cobaio, mas aparentemente não provoca doença no cão, porém, induz imunidade nestes animais contra *R. rickettsii* (Burgdorfer *et al*, 1978). Os antigénios responsáveis pela acção vacinal em cobaios, são os lipopolissacaridos e a proteína de superfície rompB, que provocam uma resposta imunitária celular nestes animais (Gage e Jerrells, 1992). Estudos filogenéticos determinaram que, embora colocada dentro do grupo das rickettsias das febres exantemáticas, situa-se numa posição isolada (Roux e Raoult, 1995).

### **5. RICKETTSIA SLOVACA** Urvolgyi e Brezina, 1978

Durante um estudo organizado no sentido de estabelecer a prevalência de *Coxiella burnetii* em ixodídeos na Eslováquia Central foi detectada, na hemolinfa de *Dermacentor marginatus*, uma rickettsia, posteriormente isolada em ovos embrionados e denominada *R. slovacica* (Brezina *et al*, 1968).

A área geográfica de distribuição desta rickettsia estende-se por toda Europa, desde a Rússia a Portugal, acompanhando a distribuição do ixodídeo *D. marginatus*, seu principal reservatório (Eremeeva *et al*, 1993b; Beati *et al*, 1993b; 1994a; Balayeva *et al*, 1994; Bacellar *et al*, 1995a; 1995b). Algumas estirpes, classificadas como *R. slovacica*,



foram isoladas de *Ixodes ricinus*, *D. reticulatus* e *Argas persicus* e também de roedores dos géneros *Apodemus* e *Microtus* (Rehacek *et al*, 1976a, 1976b, 1977; Rehacek, 1984).

*R. slovacca* é uma das espécies não patogénicas mais estudadas. Conhece-se a sua ultra-estrutura e biologia em cultura de células e em animais, bem como a ecoepidemiologia na Slovaquia (Rehacek, 1984; Rehacek e Tarasevich, 1988). Os estudos de fixação de complemento indicaram que era uma nova espécie, embora muito relacionada com *R. conorii* e *R. sibirica* (Brezina *et al*, 1968; Urvolgyi e Brezina, 1978). A composição do ADN confirmou que pertencia ao grupo das febres exantemáticas com uma razão G+C de 32,7% (Schrameck, 1974). Estudos de infecção no cobaio vieram mostrar que o microrganismo era pouco patogénico e que induzia a produção de anticorpos, que reagiam, por sua vez, com *R. conorii*. A posição filogenética determinada pela análise do 16S rARN situa-a no grupo de *R. rickettsii* e *R. japonica* (Roux e Raoult, 1995). A caracterização por microimunofluorescência, o perfil proteico em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) e os perfis dos segmentos de ADN vieram confirmar que tem características próprias. A existência de anticorpos contra *R. conorii* em populações da Europa Central, onde não existe doença típica (febre exantemática causada por rickettsias), é uma indicação de que esta espécie pode dar origem a uma resposta imunológica no Homem (Rehacek, 1984). Além disso, por meio de testes serológicos foi implicada, indirectamente, como agente causador de um caso de meningoencefalite, adquirida em laboratório (Mittermayer *et al*, 1980). Estes factos sugerem que *R. slovacca* possa por vezes ser agente de uma patologia humana diferente de uma febre exantemática.

## 6. RICKETTSIA HELVETICA Beati, Péter, Burgdorfer, Aeschlimann e Raoult, 1993

A existência de rickettsias do grupo das febres exantemáticas, transmitidas por ixodídeos em zonas não endémicas (Áustria, Bulgária, ex-Checoslováquia, Alemanha) levou a que Aeschlimann e Burgdorfer, no *Institut de Zoologie de Neuchâtel*, Suíça, realizassem um inquérito recorrendo a análise da hemolinfa de *I. ricinus*, para determinar o papel desta carraça como vectores de microrganismos (Aeschlimann *et al*, 1979; 1986). Uma estirpe, denominada “agente suíço”, foi encontrada em 8,5% dos exemplares de *I. ricinus* examinados (Péter *et al*, 1981; 1985). O isolamento de uma estirpe, por inoculação de macerados destas carraças em *Microtus pennsylvanicus* permitiu

verificar que tinha um comportamento semelhante ao das rickettsias do grupo das febres exantemáticas: crescia bem em ovos e em cultura de células, onde não formava placas, e não era patogénica para animais de laboratório (Burgdorfer *et al*, 1979). Por identificação serológica pelas técnicas de microimunofluorescência, microaglutinação, “Western blott” e por análise dos perfis proteicos o microrganismo isolado foi considerado uma rickettsia, diferente das outras espécies já conhecidas (Burgdorfer *et al*, 1979; Péter *et al*, 1985). Recentemente a identificação desta espécie foi confirmada e a denominação de *Rickettsia helvetica* foi aceite oficialmente (Beati *et al*, 1993a). Filogeneticamente, pela análise da sequência do 16S rARN, *R. helvetica* ainda é colocada no grupo das rickettsias das febres exantemáticas mas, numa posição isolada, distante das rickettsias patogénicas conhecidas (Roux e Raoult, 1995). Tem um genoma maior do que o das outras rickettsias (1397 Kb) e diferenças que parecem localizar-se nas proteínas de superfície da membrana de alto peso molecular, codificadas pelo gene de 190 kDa das rickettsias do grupo das febres exantemáticas (Roux *et al*, 1992; Beati *et al*, 1993a) já que o segmento deste gene não é amplificado nesta espécie com as condições experimentais utilizadas no estudo (Beati *et al*, 1994a).

*Rickettsia helvetica* mantém-se transovaricamente e transtadialmente em *I. ricinus* e 32-82% dos animais domésticos e micromamíferos estudados nas altitudes habitadas por este ixodídeo (abaixo de 1000 m) têm anticorpos contra este agente (Péter, 1985). O seu papel como agente patogénico para o Homem não está comprovado, porém dois factos são de se levar em consideração:

- a) *I. ricinus* é abundante e extremamente antropofílico na Suíça e é o vector do agente etiológico da Borreliose de Lyme,
- b) os estudos seroepidemiológicos efectuados na população humana autóctone indicam a existência de um contacto prévio com agentes do grupo das febres exantemáticas.

## **7. RICKETTSIA CANADA McKiel, Bell e Lackman, 1967**

*Rickettsia canada* possui atributos de ambos os grupos, do tifo e das febres exantemáticas, mas por tradição, é incluída no grupo do tifo, na classificação clássica das rickettsias (Weiss e Moulder, 1984).

As primeiras estirpes desta rickettsia foram isoladas de ixodídeos da espécie *Haemaphysalis lepopalustris*, em 1963, em Ontário, Canadá (McKiel *et al*, 1967). Entretanto, a espécie só foi reconhecida como válida, em 1980, quando voltou a ser isolada na Califórnia, da mesma espécie de ixodídeo (Lane *et al*, 1981). Bozeman e colaboradores (1970) descreveram quatro casos de doença humana, onde os anticorpos eram específicos para este microrganismo, porém considera-se que *R. canada* não seja causa frequente de doença humana, já que os ixodídeos mencionados raramente picam o Homem.

As características de poder ser transmitida por ixodídeos, crescer no núcleo das células e de reagir com soros de doentes com febre das Montanhas Rochosas colocou esta rickettsia no grupo das febres exantemáticas (Burgdorfer e Brinton, 1970), mas a presença de actividade hemolítica para os eritrócitos de carneiro, o conteúdo molar de G+C e a reacção com soros policlonais contra as rickettsias do grupo tifo aproxima-as deste último grupo (McKiel *et al*, 1967). As análises do genoma confirmaram a unicidade de *R. canada*, colocando-a isolada num grupo intermédio, com 97,9% de homologia com as rickettsias do grupo tifo e 98,7-98,4% com as rickettsias do grupo das febres exantemáticas (Regnery *et al*, 1991; Roux e Raoult, 1995). Na carraça a infecção é generalizada, como acontece com os agentes do grupo das febres exantemáticas contudo, experimentalmente, *R. canada* multiplica-se no epitélio intestinal do piolho do corpo humano como a *R. prowazekii* embora não o mate (Brinton e Burgdorfer, 1971). Tal qual as rickettsias do grupo tifo, cresce bem em ovos embrionados e leva entre 10 a 14 dias para formar placas pequenas nas camadas celulares (Ormsbee e Peacock, 1976).

O ciclo biológico de *R. canada* ainda não é conhecido. Os estudos serológicos realizados em lebres detectaram anticorpos contra rickettsias do grupo das febres exantemáticas mas com títulos específicos para *R. canada* (Burgdorfer, 1968). Em laboratório, coelhos e lebres não apresentam rickettsiemia detectável e apenas cobaios e ratos lanosos são susceptíveis à infecção experimental (Balayeva e Nikolskaya, 1977). Clifford e colaboradores (1969) detectaram um agente semelhante a esta rickettsia em *H. lepopalustris*, retirados de pássaros migratórios, no Canadá. Teoricamente, se estes ixodídeos e/ou os pássaros são reservatórios desta rickettsia, ela poderia estar dispersa desde o Alaska à Argentina (Philip *et al*, 1982).

## **8. RICKETTSIA BELLII Philip, Casper, Anacker, Cory, Hayes, Burgdorfer e Yunker, 1983**

O primeiro isolamento de *R. bellii* foi feito em 1966 por Bell, a partir de um macerado de *Dermacentor variabilis* no Arkansas, E.U.A., e recebeu a designação 369-C (Philip

*et al.*, 1983). *R. bellii* foi uma das rickettsias não patogénicas encontrada com maior frequência em ixodídeos por toda a América do Norte. Obtiveram-se 261 estirpes isoladas de várias espécies de ixodídeos dos géneros *Dermacentor* e *Haemaphysalis* e 2 espécies de argasídeos, *Argas cooleyi* e *Ornithodoros concanensis*. A maior parte das estirpes foram obtidas de *D. andersoni* e de *D. variabilis*, os vectores principais do agente da Febre das Montanhas Rochosas (Feng *et al.*, 1980; Lane *et al.*, 1981; Pretzman *et al.*, 1990). Os estudos efectuados com as estirpes isoladas revelaram uma certa heterogeneidade de comportamento biológico, porém não se obteve uma correlação entre a variabilidade dos caracteres e o ixodídeo reservatório. Algumas das estirpes estudadas com provas genómicas revelaram ser homogêneas, sendo denominadas serogrupo – *R. bellii* (Ralph *et al.*, 1990).

Em geral, estes microrganismos podem ser mantidos no laboratório em ixodídeos, por passagens transováricas e transtadiais, mas não se conhece o seu comportamento na natureza. Têm muitas propriedades em comum com as rickettsias do grupo das febres exantemáticas mas, também apresentam características semelhantes às do grupo tifo. Na hemolinfa aparecem como bastões finos, de 0,3 a 0,4  $\mu$  por 2,0 a 3,0  $\mu$  e são facilmente diferenciados das bactérias coco-bacilares do grupo das febres exantemáticas. Matam os embriões de galinha entre o 4º e o 5º dia após inoculação, tal como as rickettsias do grupo das febres exantemáticas, e nenhuma estirpe é patogénica para os animais de laboratório (Weiss e Moulder, 1984). O soro de doentes com suspeita de Febre das Montanhas Rochosas reage com *R. bellii*, bem como o soro de doentes convalescentes de tifo epidémico, o que demonstra que esta espécie tem um antigénio comum a ambas espécies. O conteúdo G+C do ADN tem valores semelhantes ao do grupo tifo. A estirpe 369-C de *R. bellii* pode ser diferenciada das espécies conhecidas pelas técnicas de fixação do complemento, neutralização de toxinas e por microimunofluorescência com soros policlonais, pelo perfil proteico em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), pelo efeito citopatogénico nas células Vero e pelo crescimento no saco da gema de ovos. As estirpes analisadas em microscopia electrónica de transmissão não apresentam a microcápsula. O lipopolissacarídeo membranar predominante é alto peso molecular e reage com os anticorpos preparados em coelhos, contra ambos os grupos (Philip *et al.*, 1978a; Anacker *et al.*, 1987; Dasch e Weiss, 1992).

Os estudos de análise de perfis de restrição de segmentos de ADN sugeriram que *R. belli* seria uma espécie equidistante dos grupos tifo e das febres exantemáticas. A análise dos genes que codificam as subunidades 16S e 23S do rARN confirmaram que esta espécie não pertence a nenhum dos grupos citados e se supõe que tenha divergido antes do grupo tifo se ter separado do grupo das febres exantemáticas, sendo considerada uma ancestral destas rickettsias (Stothard *et al.*, 1994).

## 9. *RICKETTSIA MASSILIAE* Beati e Raoult, 1993

Em 1990, foram isoladas duas estirpes de rickettsia de *Rhipicephalus turanicus* capturados em Marselha. Mais tarde, uma outra estirpe foi isolada de *R. sanguineus*, retirado de um cão em Sisteron, França e outras foram detectadas pela pesquisa do ADN (“PCR-RFLP”) em ixodídeos de diferentes espécies do mesmo género colhidos na República Centro-Africana (Beati *et al*, 1992; Beati e Raoult, 1993a; Dupont *et al*, 1994) e na Grécia (GS) (Babalis *et al*, 1994c).

*R. massiliae* tem as mesmas propriedades gerais do grupo das febres exantemáticas e foi diferenciada das outras espécies do grupo pela técnica de microimunofluorescência com soros policlonais, análise do perfil proteico por SDS-PAGE, análise genética por “PCR-RFLP” e eletroforese em campo pulsado; não é patogénica para o cobaio (Beati e Raoult, 1993a; Roux e Raoult, 1993). Pela análise filogenética, *R. massiliae* agrupa-se com outras estirpes, recentemente isoladas de *R. sanguineus*, em Espanha (Bar29) (Beati *et al*, 1994).

## 10. OUTRAS RICKETTSIAS ISOLADAS DE IXODÍDEOS

Alguns microrganismos, com características semelhantes a rickettsias e isolados de ixodídeos foram diferenciados das espécies conhecidas, geralmente pela técnica de microimunofluorescência, embora não tenham recebido ainda uma nomenclatura oficial.

### 10.1. “Agente 364-D”

Este agente foi isolado de *Dermacentor occidentalis* na Califórnia e no Oregon (Lane *et al*, 1981). Está serologicamente relacionado com *R. rickettsii* e *R. parkeri*, porém, os perfis proteicos e os padrões de reacção cruzada com anticorpos monoclonais confirmam-no como um serotipo distinto (Anacker *et al*, 1987). É moderadamente patogénico para cobaios, os quais ficam relativamente imunes a *R. rickettsii*. No laboratório pode ser mantido em cobaios, rato-calunga, ovos embrionados e em cultura de células onde formam placas. Também não foi excluída a sua actuação patogénica para humanos, na Califórnia (Philip *et al*, 1981).

### 10.2 “Agente isolado de *Dermacentor parumapertus*”

*Dermacentor parumapertus* é encontrada como parasita de coelhos e lebres do deserto, do Oregon ao México e da Califórnia ao centro do Texas. As rickettsias encontradas nestes ixodídeos foram observadas em esfregaços do intestino médio e não na hemolinfa (Henke *et al*, 1990). Foram isoladas em ovos embrionados e em cobaias, aos quais causam aumento escrotal e imunidade para *R. rickettsii* e *R. conori*. Os coelhos capturados naquela área apresentam altos títulos de anticorpos contra este agente. Também foi demonstrado, por microimunofluorescência, que “*D. parumapertus-agent*” tem epitopos em comum com *R. sibirica* e *R. conorii* (Philip *et al*, 1978a).

### 10.3. “Agente de Tillamook”

Este organismo foi isolado de *Ixodes pacificus* capturados no Oregon (Hughes *et al*, 1976) e na Califórnia (Philip *et al*, 1981). No cobaio induz uma patologia do tipo de *R. montana* e imunidade contra *R. rickettsii*. Por métodos serológicos é facilmente diferenciado de todos os outros membros do grupo das febres exantemáticas (Philip *et al*, 1978a). Refira-se que *I. pacificus* é uma carraça que parasita o Homem e é reconhecido como o principal vector do agente da Borreliose de Lyme na costa ocidental dos E.U.A.

### 10.4. “Agente WB-8-2”

Entre 5 a 40% dos ixodídeos da espécie *Amblyomma americanum* capturados na América do Norte estão infectados com este agente (Burgdorfer, 1980; Goddard e Norment, 1986). É facilmente isolado em células e propaga-se em ovos embrionados. Este agente não é patogénico para animais e apesar desta carraça se alimentar no Homem, mesmo quando infectadas com o microrganismo, não se associa doença humana após a sua picada. WB-8-2 tem padrões proteicos e serológicos próprios e distintos das outras rickettsias (Anacker *et al*, 1980).

### 10.5. “Agente East Side”

Em 1981, Burgdorfer e colaboradores descreveram uma rickettsia isolada de *Dermacentor andersoni* capturados no lado leste do Vale Bitterroot, Montana. A maior parte dos casos de febre das Montanhas Rochosas ocorreram no lado oeste deste vale. Do lado leste, 80% dos ixodídeos encontravam-se infectados com uma rickettsia que não era possível visualizar pelo teste da hemolinfa. Constatou-se que a infecção na carraça se li-

mitava aos lobos inferiores do intestino médio, ao intestino delgado, ao ovário e, ocasionalmente, aos tubos de Malpighi. Os artrópodos infectados com este microrganismo não adquiriram a infecção por *R. rickettsii*, quando alimentados em animais rickettsiêmicos, inoculados experimentalmente. Esta observação levou ao conceito de interferência das rickettsias não patogênicas na aquisição de rickettsias patogênicas pelos ixodídeos, sendo considerado um mecanismo de profilaxia natural (Burgdorfer *et al*, 1981).

### 10.6. “*Rickettsia heilongjiangi*”

Este é o nome proposto para um novo serotipo (HL-93) de rickettsia do grupo das febres exantemáticas identificado na China. Foram isoladas estirpes de *Haemaphysalis concinna*, *H. japonica* e *Dermacentor silvarum*. Pelos teste de microimunofluorescência e imunoperoxidase estas estirpes são diferentes das estirpes chinesas de *R. sibirica* e de outras rickettsias patogênicas (*R. conorii*, *R. akari*, *R. rickettsii*, *R. japonica*) (Fan *et al*, 1987a; Wang e Walker, 1987). Ainda não foram comparadas com as rickettsias ditas do “complexo-*R. conorii*” que existem na Ásia (tifo da carraça do Paquistão e da Tailândia).

### 10.7. Tifo da carraça da Tailândia, “*Thai tick typhus*”, Ttt

A única estirpe isolada deste agente foi obtida de um “pool” de larvas de *Rhipicephalus sp.* e *Ixodes sp.* retiradas de *Rattus rattus* na Tailândia. Esta estirpe cresce em ovos e é moderadamente patogênica para cobaio e para o rato do deserto, *Meriones shawi*. Diferencia-se facilmente das rickettsias patogênicas dos grupos tifo e febres exantemáticas pelos teste de fixação do complemento, neutralização de toxinas, e microimunofluorescência com soros policlonais e monoclonais (Robertson e Wisseman, 1973; Wang *et al*, 1987b; Li *et al*, 1988). Foi diferenciada especificamente de *R. japonica*, pelos perfis proteicos em “Western blot” e SDS-PAGE (Uchida *et al*, 1989). Pelo estudo do ADN total, Ttt encontra-se antigenicamente próxima de *R. slovaca*. Como tem epitopos proteicos e lipopolissacarídeos que reagem com soros humanos com anticorpos contra *R. conorii* tem sido utilizada como antígeno em inquéritos seroepidemiológicos no sudoeste da Ásia e em África (Raoult e Dasch, 1989; Kelly e Mason, 1991a).

### 10.8. Tifo da carraça do Paquistão, “*Pakistani tick typhus*”, Ptt

Foram isoladas várias estirpes de rickettsias de carraças do “grupo - *R. sanguineus*” as quais foram classificadas como um novo serotipo definido por fixação do complemento

e neutralização de toxinas. Estas estirpes revelaram ser mais patogénicas para o cobaio e para o rato do deserto do que as estirpes de *R. conorii* e *R. sibirica* isoladas no Paquistão. Os ixodídeos foram retirados de cabras, ratazanas, lebres e roedores silváticos, sugerindo uma ecologia e potencial de infecção ainda não compreendidos (Robertson *et al*, 1970; Robertson e Wisseman, 1973).

### 10.9. Mtu5

Esta estirpe foi inicialmente isolada de *Rhipicephalus turanicus* capturados em Sisteron, na Provença francesa. Caracterizada por “PCR-RFLP” apresentou perfis de restrição diferentes das outras estirpes conhecidas (Beati *et al*, 1992). Embora a estirpe original tenha sido perdida por problemas de conservação algumas estirpes com perfis semelhantes tem vindo a ser isolada tanto de *R. turanicus* como de *R. sanguineus*, no sul de França, na Grécia e na região de Barcelona, Espanha (Beati, 1993; Beati e Raoult, 1993b).

### 10.10. Agente S

O agente S foi isolado de *Rhipicephalus sanguineus* capturados na Arménia, no início da década de 90. Inicialmente, foi considerado atípico por poder ser diferenciado serologicamente das outras espécies de rickettsia que circulavam na República Russa.

Por análise comparada utilizando algumas metodologias de biologia molecular determinou-se que esta estirpe possuía padrões antigénicos, proteicos e genéticos diferentes de todas as outras estirpes de rickettsia do grupo das febres exantemáticas. Também comprovou-se que era moderadamente patogénica para animais de laboratório (Eremeeva *et al*, 1995b).



*"Rickettsiology suffers from too many organisms and too few scientists."*

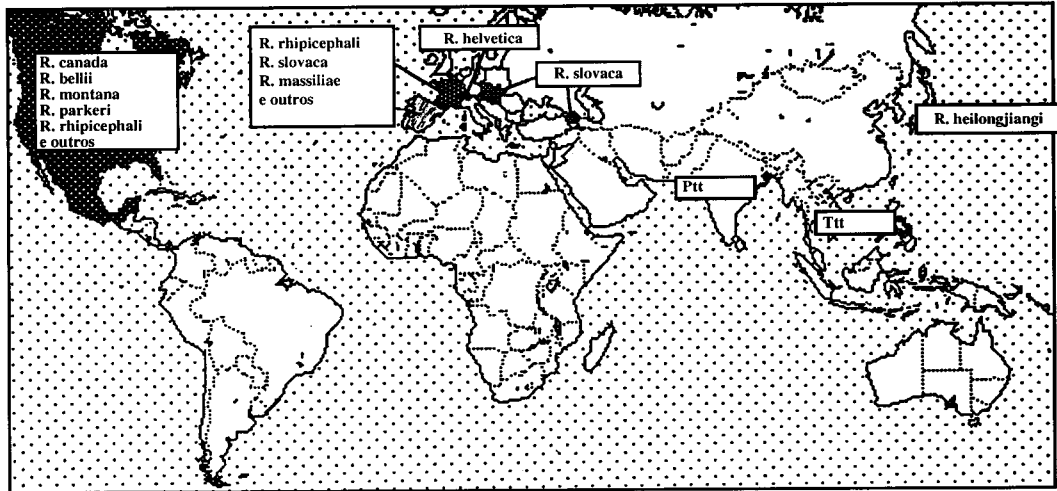
D. Walker, *The rickettsia- host interaction, Intracellular parasitism*, 1988.

## 11. CONSIDERAÇÕES

Considera-se que o poder patogénico das rickettsias é determinado pela sua capacidade para infectar o Homem, causar uma febre exantemática e ser isolada de tecidos do doente. Não se pode deduzir o poder patogénico para o Homem a partir de animais de laboratório, embora a doença que produzem no cobaio seja uma característica das rickettsias patogénicas. Contudo, recorda-se que duas bactérias altamente patogénicas para o Homem, *Coxiella burnetti* e *Legionella pneumophila*, foram classificadas, em determinada época, como não patogénicas. Mais ainda, a estirpe de rickettsia "*Ethiopian*", inicialmente isolada de ixodídeos e considerada não patogénica, revelou ser uma nova espécie patogénica *R. africae*.

Um outro aspecto a salientar diz respeito aos estudos seroepidemiológicos em áreas geográficas onde não são endémicas as rickettsias patogénicas do grupo das febres exantemáticas, embora aí existam rickettsias consideradas não patogénicas. Nestas zonas, as populações humanas e animais autóctones foram encontradas com anticorpos contra rickettsias. Sabendo do poder imunogénico para animais de laboratório das rickettsias não patogénicas suspeita-se que os anticorpos detectados nestas populações possam ser induzidos por estas bactérias. Resta comprovar se estas rickettsias não patogénicas induzem alguma patologia e, se tal acontecer, o mais provável será que a doença se apresente com uma sintomatologia não específica dum febre exantemática.

Na figura 6 apresenta-se a distribuição mundial conhecida actualmente para estes microrganismos.



**Figura 6.** Distribuição geográfica das rickettsias isoladas de ixodídeos e consideradas não patogênicas para o Homem.



## VI

### **Os Ixodídeos Vectores de Rickettsias do Grupo das Febres Exantemáticas**



*"Blood sucking vectors have been often considered as "flying syringes" that pick up and deliver pathogens from and to their vertebrate hosts."*

J.M.C.Ribeiro, Vector saliva and its role in parasite transmission, 1989

## 1. INTRODUÇÃO

As rickettsias patogénicas e as rickettsias consideradas não patogénicas do grupo das febres exantemáticas têm como vectores e reservatórios naturais artrópodos hematófagos restritos, da classe Arachnida, subclasse Acari.

Com excepção de *Rickettsia akari*, que é encontrada a parasitar ácaros mesostigmatas da família Gamasidae, as outras rickettsias do grupo das febres exantemáticas são parasitas de ácaros metastigmatas, da família Ixodidae. A taxonomia desta subclasse está referida na Figura 7. Na família Nuttalliellidae existe apenas uma espécie, *Nuttalliella namaqua*, um ectoparasita de répteis da África do Sul (Arthur, 1962; Oliver, 1989). As outras duas famílias, Ixodidae e Argasidae compreendem, aproximadamente, 800 espécies (650 de Ixodidae e 140 de Argasidae). Destas, considera-se que cerca de 10% estejam implicadas na transmissão ao Homem, e a outros vertebrados, de agentes de várias doenças infecciosas, tais como: borrelioses, rickettsioses, tularémia, anaplasmoses, babesioses, meningo-encefalite virais, entre outras patologias (Busvine, 1975; Oliver, 1989; Friedhoff, 1990).

---

Filo	<b>ARTHROPODA</b>
Subfilos	<b>CHELICERATA</b>
Classes:	<b>ARACHNIDA</b>
Sub-classes:	<b>ACARI</b>
Ordens:	<b>METASTIGMATA</b> MESO-, NOTO-, PRO-, CRYPTO-, A-STIGMATA (Meta- + Mesostigmata = Parasitiformes; Crypto- + Astigmata = Sarcoptiformes)
Subordem	<b>IXODIDA</b>
Superfamília:	<b>IXODOIDEA</b>
Famílias:	<b>IXODIDAE</b> ARGASIDAE; NUTALLIELLIDAE

---

**Figura 7. Posição sistemática dos vectores de rickettsias no filo Arthropoda.**

Adaptado de Arthur, 1962, Oliver, 1989; Sonenshine, 1991; Varma, 1993.

Os argasídeos só foram referenciados, esporadicamente, como tendo importância como vectores ou como reservatórios de rickettsias (Hoogstraal, 1981; Philip *et al*, 1983; Oliver, 1989) pelo que apenas os ixodídeos serão abordados neste capítulo.

## 2. BIOLOGIA DOS IXODÍDEOS

Nesta parte da dissertação procura-se apresentar uma descrição sumária de alguns aspectos relacionados com a biologia da família Ixodidae. Muitos dos dados aqui apresentados foram generalizados a partir dos estudos feitos com o género *Dermacentor*, na América do Norte.

Os ixodídeos têm um ciclo de vida que compreende as fases de ovo, larva, ninfa e adulto. Os três últimos estadios alimentam-se em um hospedeiro vertebrado apenas uma vez, durante vários dias (7-9 dias), em grandes quantidades, até ingurgitarem. Após cada refeição, soltam-se do hospedeiro, sofrem uma muda ou ecdise, passando ao estadio seguinte. As fêmeas, da maior parte das espécies, necessitam de uma refeição de sangue para iniciar a cópula e a ovoposição, após a qual morrem (Arthur, 1962). Dos ovos eclodem as larvas. Os machos nunca absorvem uma quantidade de sangue igual à das fêmeas. O seu mecanismo de balanço hídrico não está estudado (Kaufman, 1989).

A digestão do sangue nestes artrópodos, especialmente nas fêmeas, é feita intracelularmente e processa-se em três fases:

- a) a fase preparatória, no início da ingestão, quando o pH do sangue ingerido inibe a acção das proteases do tracto intestinal do ixodídeo (cerca de 24 h. em *D. variabilis*);
- b) a digestão propriamente dita, que se inicia durante a fase de ingurgitação, quando ocorre a concentração dos nutrientes e a excreção pelas glândulas salivares do excesso de fluidos de volta à circulação do hospedeiro;
- c) a fase final, depois do ixodídeo se separar do hospedeiro, em que a digestão prossegue dentro de células digestivas fagocíticas, até a ovoposição.

A ausência de acção de enzimas proteolíticas no lúmen intestinal poderia ser uma das razões que permitiriam a sobrevivência dos agentes patogénicos, existentes no sangue ingerido do hospedeiro, e a sua disseminação pelo organismo do artrópodo. Cálculos realizados com *D. andersoni* indicaram que uma fêmea não ingurgitada com 7-10 mg de peso pode processar aproximadamente 4000 mg de sangue (Akov, 1982; Kaufman, 1989; Friedhoff, 1990; Sonenshine, 1993).

A maior parte dos ixodídeos ocupa nichos ecológicos abertos, estando sujeitos aos factores do ambiente, nomeadamente às condições climáticas. Devido a este facto, no decurso da evolução, desenvolveram a capacidade de entrar em diapausa para sobreviver às condições ambientais desfavoráveis e também, adaptações fisiológicas, que lhes permitem suportar a falta de humidade enquanto activos (Sonenshine, 1993). As glândulas salivares realizam várias funções vitais: segregam o cimento que fixa o ixodídeo à pele do hospedeiro, substâncias anticoagulantes e citotóxicas, são os órgãos da osmoregulação e têm um mecanismo de captura de vapor d'água que permitem às carraças manterem-se sem alimento por muitos meses/anos (Katz *et al*, 1994). Os ixodídeos, ainda desenvolveram adaptações a determinados sinais do ambiente, apropriados ao início da procura do hospedeiro (concentração de CO<sub>2</sub>), bem como para reconhecer os períodos sazonais óptimos para o início da postura e da ecdíse (fotoperiodismo). A sua longevidade e a elevada taxa de reprodução contribuem para manter as densidades populacionais elevadas, numa determinada área geográfica, garantindo assim a sua sobrevivência (Oliver, 1984; Friedhoff, 1990).

Os ixodídeos têm com os seus hospedeiros vertebrados uma especificidade mais ou menos restrita (Katz *et al*, 1994). A especificidade ixodídeo-hospedeiro não depende só das espécies animais envolvidas mas, principalmente, do estágio de desenvolvimento. Nos estádios larvares e ninfais a área geográfica de dispersão pelos próprios meios é restrita e a capacidade de picar é determinada pelas dimensões do aparelho bucal (Kaufman, 1989). Os adultos de algumas espécies têm a característica de se deslocarem à procura do hospedeiro, enquanto em outras ficam perto da área onde ocorreu a muda, subindo à vegetação à espera que o hospedeiro passe para se agarrarem a ele (Lane e Stubbs, 1990; Belan e Bull, 1991).

No que concerne ao Homem como hospedeiro, não se pode afirmar com base em dados experimentais que existam carraças mais ou menos antropofílicas, embora na natureza grande parte das espécies não o piquem e seja considerado um hospedeiro ocasional. Contudo, estão identificadas 11 géneros com espécies que parasitam o Homem (Gilot e Marjolet, 1982; Katz *et al*, 1994). A relativa antropofilia dos ixodídeos e a sua prevalência, numa dada área, têm um papel determinante na transmissão de agentes patogénicos. Em estudos epidemiológicos, nos E.U.A., 80% dos inquiridos que estiveram doentes com a febre das Montanhas Rochosas, referiram terem sido picados, enquanto que 56% de pessoas saudáveis, no grupo controlo, notaram um ixodídeo ligado a si. Já em Marselha, França, em inquéritos semelhantes, encontraram-se 7% e menos de 1% de respostas positivas, respectivamente (Goddard, 1989; Gilot *et al*, 1990; 1992; Raoult *et al*, 1993; Sonenshine, 1993). Alguns autores consideram ser muito comum que a presença da carraça não seja notada, não só devido às dimensões reduzidas dos estádios intermédios mas também porque a picada é indolor (Dupont e Raoult, 1993b). *Rhipicephalus sanguineus*, a



carraça do cão na área mediterrânica, vector e reservatório de *Rickettsia conorii*, agente da Febre escaro nodular, é referida a parasitar o Homem mais frequentemente no estadio ninfal do que como adulto (Herrero *et al*, 1989; Gilot *et al*, 1990). Este último facto é muito importante para a transmissão efectiva do agente infeccioso ao Homem. Estudos efectuados com *R. rickettsii* e *R. conorii* concluíram que para haver a transmissão do agente são necessárias, em média, 6-20 horas de parasitação pelo artrópodo (Gilot *et al*, 1990; Walker *et al*, 1989; Dupont e Raoult, 1993a). Os estadios intermediários devido a sua pequena dimensão, passam mais facilmente despercebidos durante mais tempo. A infecção humana pode ainda ocorrer por transmissão mecânica, por exemplo, por maceiração de um ixodídeo infectado e contaminação de mucosas com este material. A probabilidade desta ocorrência aumenta proporcionalmente com o tempo que o ixodídeo fica a parasitar o hospedeiro, seja o próprio Homem ou seja um animal, como o cão (Dupont e Raoult, 1993b; Drancourt e Raoult, 1993).

### 3. RELAÇÕES IXODÍDEOS – RICKETTSIAS

Em geral, o conhecimento das relações vector-parasita ainda é limitado para a maior parte dos grupos; os dados encontrados são descritivos e não experimentais e apenas algumas associações têm sido estudadas extensivamente (Bertran, 1962; Marchette, 1982). Dentro do binómio ixodídeo-rickettsia a relação mais bem estudada é a de *Dermacentor andersoni* e *Rickettsia rickettsii* e é com base nos trabalhos com estas espécies que aqui se apresentam algumas considerações.

Uma carraça fica infectada com rickettsias de dois modos: ou as ingere durante uma refeição num hospedeiro vertebrado infectado e rickettsiémico ou as adquirem por via transovárica ou transtadial (Burgdorfer *et al*, 1975; Rehacek, 1989; 1991). Em laboratório, também foi conseguido a co-infecção de ixodídeos por via alimentar, quando se colocaram artrópodos infectados a alimentarem-se, simultaneamente, com outros não infectados, sobre um mesmo hospedeiro saudável (Price *et al*, 1954; Price, 1954). Por outro lado, foi comprovado que a infecção primária de um ixodídeo por via alimentar depende da quantidade de rickettsias que ingere juntamente com o sangue. Segundo alguns autores, quando ingeridas em quantidades suficientes as rickettsias ultrapassam a barreira intestinal e penetram no hemocélio onde são fagocitadas pelos hemócitos (Burgdorfer *et al*, 1966; Burgdorfer, 1975; Burgdorfer e Brinton, 1975).

As rickettsias causam uma infecção sistémica nos ixodídeos, multiplicando-se no citoplasma das células de todos os órgãos do artrópodo (Zupancicova e Kovacova, 1972; Rehacek,

1989). Apesar da infecção maciça das células com rickettsias, não se observaram efeitos citopatogénicos nos artrópodos (Rehacek, 1984). A infecção sistémica do ixodídeo explicaria a transmissão transtadial e a infecção dos ovários, a transmissão transovárica (Friedhoff, 1990; Smith e Dunn, 1991). A maior parte das espécies de rickettsia são capazes de sobreviver por longos períodos, a infecção na carraça não é influenciada pelo jejum, nem por refeições sanguíneas em vertebrados com anticorpos contra rickettsias (Hoogstraal, 1967). Este fenómeno de invasão celular permitiu que as carraças se tornassem não só vectores das rickettsias mas, também, o seu reservatório na natureza, pela transmissão vertical e sexual, eliminando, teoricamente, a necessidade de um hospedeiro vertebrado no ciclo de vida destas bactérias. Os estudos com *R. rickettsii* e *R. slovaca* apontam a transmissão transovárica como sendo o mecanismo de manutenção das rickettsias na natureza. Em laboratório conseguiu-se 100% de infecção dos descendentes de um ixodídeo infectado (Rehacek, 1984; Burgdorfer e Brinton, 1975; Hayes e Burgdorfer, 1982) embora, na natureza, não tenha sido comprovada esta possibilidade. A transmissão transovárica foi demonstrada em *Haemaphysalis leachi* até a quarta geração (Hoogstraal, 1967).

Um outro facto decorrente da relação ixodídeo-rickettsia é o denominado fenómeno de interferência. Alguns autores citam que a taxa de ixodídeos infectados com estirpes de rickettsias patogénicas para o Homem deve ser regulada pela existência de infecção com rickettsias não patogénicas que entrariam em competição na colonização sistémica dos artrópodos (Price, 1954; Loving *et al.*, 1978; Burgdorfer *et al.*, 1981; Ricketts, 1991). Outro facto é o fenómeno da reativação (referido a propósito da fisiologia das rickettsias). Observações da ultraestrutura de *R. rickettsii*, antes e depois de reactivadas, revelaram um aumento nas camadas externas (“*slime layer*” e microcapsula) após a refeição do hospedeiro artrópodo (Hayes e Burgdorfer, 1982, Todd *et al.*, 1983). Como cada estadio de desenvolvimento de um ixodídeo se alimenta apenas uma vez é possível que a refeição (ou uma substância ingerida, como o ferro da hemoglobina) seja um sinal do fim do período de “dormência celular”, que ocorre durante a diapausa. Após a refeição de sangue, se inicia um processo de grande actividade celular no ixodídeo, tanto com o desenvolvimento dos ovos e antes da eclosão da larva, como com os fenómenos de muda da larva à ninfa e da ninfa à adulto. Para que as rickettsias sejam transmitidas com sucesso à geração ou estadio seguinte elas deverão proliferar nesta altura, quando o metabolismo das células hospedeiras é elevado (Rehacek, 1989). Para estudar este fenómeno têm sido utilizados alguns modelos experimentais de reactivação “*in vitro*”, com a análise dos produtos da lise do sangue que actuariam na reactivação da patogenicidade da rickettsia. Actualmente, sabe-se que os mecanismos de transporte através de membrana nas rickettsias estão implicados neste fenómeno, embora ainda não se tenha determinado todo o seu processo (Weiss, 1973; Winkler e Daugerthy, 1986).



#### 4. IXODÍDEOS RESERVATÓRIOS DE RICKETTSIA EM PORTUGAL

As espécies de Ixodidae mencionadas na Figura 8 são as existentes em Portugal, susceptíveis de terem um papel (real ou provável) na manutenção de rickettsias na natureza e sua transmissão ao Homem.

Família Ixodidae					
Sub-família					
<i>Ixodinae</i>	<i>Rhipicephalinae</i>			<i>Amblyominae</i>	
Género					
<i>Ixodes</i>	<i>Hyalomma</i>	<i>Rhipicephalus</i>	<i>Boophilus</i>	<i>Dermacentor</i>	<i>Haemaphysalis</i>
Espécie					
<i>I. ricinus</i>	<i>H. lusitanicum</i>	<i>R. sanguineus</i>	<i>B. annulatus</i>	<i>D. marginatus</i>	<i>H. punctata</i>
<i>I. hexagonus</i>	<i>H. marginatum</i>	<i>R. turanicus</i>		<i>D. pictus</i>	<i>H. inermis</i>
<i>I. vespertilionis</i>		<i>R. pusillus</i>			<i>H. hispanica</i>
<i>I. ventralloii</i>		<i>R. bursa</i>			
<i>I. bivari</i>					
<i>I. canisuga</i>					
<i>I. simplex</i>					
<i>I. frontalis</i>					

Figura 8. Sistemática das espécies de Ixodidae existentes em Portugal.

Dias, 1994, Caeiro *et al*, 1996

Em Portugal continental os acarologistas Leitão (1950), Tendeiro (1962), Dias e colaboradores (1990; 1993; 1994), Caeiro e Simões (1987; 1996b) dedicaram-se a estudos ixodológicos, especialmente, à sistemática com base em caracteres morfológicos. Ainda Caeiro e colaboradores, nesta década, fizeram uma inventariação da distribuição da ixodofauna no País, tendo em conta os hospedeiros domésticos e silváticos e as suas preferências ecológicas, com relêvo para as espécies com maior área de distribuição e com interesse na transmissão de agentes patogénicos ao Homem e animais domésticos (Caeiro *et al*, 1987; 1991a; 1996a; Caeiro e Simões, 1987; 1990a; 1990b; 1991a; 1991b; Caeiro, 1992).

A partir dos anos 70, com Filipe a dedicar-se ao estudo de arbovírus e ao esclarecimento do papel dos ixodídeos como vectores de agentes de doença, o incentivo ao estudo deste grupo de artrópodos renovou-se (Filipe e Casals, 1979; Filipe, 1980; Filipe e Calisher,

1984). Em 1987, foi formado um núcleo no Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge, para estudar as doenças transmitidas por estes e outros artrópodos, o Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI), localizado no Distrito de Setúbal, junto à Marateca, próximo da divisão da Estremadura com o Alentejo.

Neste Centro tem sido feita a inventariação sistemática das espécies de ixodídeos (Dias *et al*, 1993; Dias e Nuncio, env. publ.; Papadopoulos *et al*, 1992; Caeiro *et al*, env. publ.) e de seus hospedeiros (Dias *et al*, 1994) e também o estudo dos factores ecológicos mais propícios à sua sobrevivência na natureza e da dinâmica de populações (Julio, 1991). Outros aspectos abordados têm sido os estudos da distribuição e prevalência dos ixodídeos, bem como da contribuição dos micromamíferos para a sobrevivência dos artrópodos e para manutenção dos agentes patogénicos, na região da Marateca e em áreas próximas do estuário do Tejo, de Montemor-o-Velho e nas ilhas dos Açores (Santos-Reis *et al*, 1993; Nuncio *et al*, 1994; Caeiro *et al*, 1996). A reprodução do ciclo de vida, em laboratório, também tem permitido a utilização de ixodídeos criados em biotério para diversos estudos em curso (Santos-Silva, CEVDI-INSA, com. pessoal). Ainda, várias espécies de ixodídeos foram encontradas infectadas com rickettsias pelo teste dos hemócitos (Bacellar *et al*, 1991; Filipe *et al*, 1992) e foram isoladas várias estirpes (Bacellar *et al*, 1995a; 1995b). Foram ainda encontrados protozoários (Bacellar *et al*, 1990); bórrelias (Nuncio *et al*, 1993), vírus (Filipe *et al*, 1994) e outras Rickettsiales (Filipe *et al*, 1990). Porém, o objectivo principal de todos os estudos realizados no CEVDI incide na determinação do papel que estes artrópodos desempenham como vectores efectivos dos agentes microbianos que albergam e que são, potencialmente, patogénicos para o Homem.

"... beware of comprehensive tables that formally separate vectors and reservoirs (meaning vertebrate hosts) into two columns..."

Philip e Burgdorfer, *Arthropod vectors as reservoirs of microbial agents*, 1961

## 5. CONSIDERAÇÕES

Na literatura especializada as definições de vector e de reservatório têm sido motivo de controvérsia. No geral, considera-se como vector os hospedeiros intermediários, enquanto que um reservatório seria o hospedeiro onde o parasita teria uma fase do ciclo de vida essencial para sua manutenção na natureza. No caso das rickettsias, os ixodídeos desempenham os dois papéis: são vectores ao transmiti-las ao hospedeiro vertebrado e são reservatórios, ao mantê-las na natureza por transmissão transovárica e transtadial.

A relação rickettsia-ixodídeo demonstra um elevado nível de adaptação entre organismos e parece ser muito antiga filogeneticamente, em comparação com outros grupos de microrganismos da Ordem Rickettsiales, como é o caso do género *Wolbachia* (Marchette, 1982). Porém, não pode ser considerada uma relação de comensalismo já que as carraças infectadas experimentalmente com rickettsias apresentam uma ovoposição diminuída, os ovos desenvolvem-se mal e há uma alta taxa de mortalidade entre os descendentes, em comparação com as carraças não infectadas. Aparentemente, as rickettsias são mais beneficiadas do que os ixodídeos nesta relação (Rehacek, 1989).

De qualquer maneira, o desenvolvimento e dispersão dos ixodídeos tiveram um efeito profundo na evolução e especiação das rickettsias. Um dado que aponta nesta direcção é o facto de certas espécies de rickettsias se encontrarem, frequentemente, associadas a uma determinada espécie de carraça. Por exemplo, *Rickettsia slovaca* é encontrada associada a *Dermacentor marginatus*, tendo sido raramente isolada de outras espécies de ixodídeos (e mesmo estes isolamentos não estão claramente identificados). Esta espécie de rickettsia acompanha a distribuição geográfica do ixodídeo pelo que, nas regiões onde este artrópodo está presente, ter-se-á que levar em conta tanto a existência desta rickettsia não patogénica nos estudos de seroprevalência, como avaliar se ela é capaz de induzir uma patologia no Homem cujos sintomas não seriam reconhecidos como os de uma rickettsiose.

Em *Rhipicephalus sanguineus* foram descritas várias rickettsias consideradas não patogénicas (*R. rhipicephali* e *R. massilae*; as estirpes S, Mtu5, Bar e GS) e ainda toda a

gama de genoespécies patogénicas do “complexo – *R. conorii*”. Neste caso, como já foram referidos, temos dois factos a considerar: por um lado, os estudos de seroprevalência vão ter resultados alterados devido as rickettsias consideradas não patogénicas serem capazes de induzir anticorpos no vertebrado, por outro, sabe-se que nos locais onde *R. montana* parasita *D. andersoni* a incidência da febre das Montanhas Rochosas é menor do que onde só existe *R. rickettsii*. Se este último facto acontecer no género *Rhipicephalus*, a presença de tantas rickettsias não patogénicas a parasitar estes artrópodos poderia exercer uma acção profilática e actuar como um factor positivo na redução do poder reservatório e vector destes ixodídeos de rickettsias patogénicas.

Pensa-se que é indispensável delimitar cartograficamente as zonas de distribuição das diferentes estirpes de rickettsias e de estabelecer, definitivamente, se existe ou não uma inter-relação específica entre uma espécie de ixodídeo e uma determinada espécie de rickettsia. Assim com estes estudos contribuir-se-ia para esclarecer as relações ixodídeo-rickettsia e determinar as áreas de maior risco de infecção para o Homem. Deste modo, os custos das medidas profiláticas (uso de vestuário adequado, repelentes, vacinas, banheiros para o gado) poderiam ser reduzidos, de modo a tornarem-se aceitáveis, e as possíveis infecções seriam detectadas atempadamente, com a redução dos custos medicamentosos e em horas/Homem que as rickettsioses implicam.



## **VII**

### **Reservatórios Vertebrados de Rickettsias Transmitidas por Ixodídeos**





*"... les mammifères, hôtes des tiques, jouent également un rôle important, ne serait-ce que pour la dissémination des tiques contaminés par le germe..."*

Gilot, Quenin et Joubert, Recherche de Foyers Naturels de Fièvre Boutonneuse dans la Basse Vallée du Rhône, Lyon, 1981

## 1. INTRODUÇÃO

Na história natural das rickettsias do grupo das febres exantemáticas, transmitidas por ixodídeos, são de considerar dois aspectos fundamentais da biologia destes artrópodos:

- a) o espectro de hospedeiros vertebrados das diferentes espécies de carraças;
- b) os vertebrados nos quais se alimentam os estádios imaturos e os adultos de uma espécie em particular (Bertran, 1962).

Como foi referido no capítulo anterior, a maior parte das espécies de ixodídeos têm um ciclo trifásico, com um hospedeiro diferente em cada estadio e, estes hospedeiros, não são necessariamente da mesma espécie. Se bem que alguns ixodídeos tenham uma preferência alimentar restrita, a maior parte parasita o vertebrado pela oportunidade de encontro. O ciclo natural das rickettsias, numa determinada área, é caracterizado, primeiramente, pela espécie e pelo número de vectores prováveis e, secundariamente, pela fauna de vertebrados domésticos e silváticos (Traub e Jellinson, 1981). Numa rickettsiose, geralmente, o foco primário envolve os pequenos mamíferos, hospedeiros dos artrópodos vectores e, secundariamente, actuam as influências de animais domésticos e de animais sinantrópicos, os quais se vão tornar fonte de infecção para o Homem (Rehacek e Tarasevich, 1988).

Os mamíferos são referidos como hospedeiros da maior parte das espécies de ixodídeos e, dentro deste grupo de vertebrados, a classe Rodentia é a mais parasitada. Alimentam-se em roedores os estádios imaturos de cerca de 300 das 600 espécies de ixodídeos, com um ciclo trifásico. Encontram-se menos frequentemente como hospedeiros destes artrópodos as aves e os répteis (Oliver, 1989). Os estudos experimentais realizados com pequenos roedores confirmaram que estes animais são sensíveis à infecção e desenvolvem rickettsiemia suficiente para infectar os ectoparasitas durante a sua refeição de sangue, embora apenas num curto período de tempo. Estes micromamíferos têm uma área de dispersão limitada e um tempo de vida curto, sendo considerados bons indicadores da existência de rickettsias numa dada área, se forem encontrados infectados naturalmente (Rehacek e Urvolgyi, 1978; Rehacek, 1992a).

Entre os animais domésticos, apenas os cães são considerados importantes tanto na epidemiologia da febre das Montanhas Rochosas como na da febre escaro nodular, já que:

- a) o seu número aumentou muito como animal de estimação;
- b) acompanham os proprietários em deslocações a zonas endémicas e trazem ixodídeos infectados para áreas não endémicas (Edlinger, 1985);
- c) muitos tornam-se cães vadios e assilvestrados quando são abandonados, aumentando o contacto com os reservatórios silváticos e com os vectores e agindo como portadores dos vectores infectados para o meio humano (Burgdorfer, 1975; Rhodes e Norment, 1979).

Adicionalmente, alguns animais de laboratório (murganho, coelho) foram utilizados como sentinelas para detectar rickettsias em zonas específicas. Também é bom lembrar que, frequentemente, tanto a fauna silvática como os animais domésticos, não manifestam os efeitos patogénicos das infecções por rickettsias e, como portadores assintomáticos, são descurados como fontes de agentes patogénicos. Aqueles, bem como os animais sinantrópicos, têm sido estudados por métodos indirectos, especialmente pelo teste de fixação do complemento. O isolamento do agente a partir do sangue, tecidos e órgãos implica o abate do animal (Rehacek e Urvolgyi, 1978). Os pássaros migradores também são considerados como tomando parte na circulação de rickettsias, por transportarem os ectoparasitas infectados a grandes distâncias, causando focos pontuais de infecção em zonas não endémicas e podendo estabelecer novos focos se os ixodídeos se adaptarem nessas áreas geográficas (Burgdorfer, 1975; Rehacek *et al*, 1984; Rehacek e Tarasevich, 1991; Nice, 1994).

Dado terem sido referidos os dados sobre os reservatórios para cada espécie de rickettsia nos capítulos anteriores, apresentam-se aqui apenas de uma forma resumida os achados mais relevantes sobre os animais vertebrados que se incluem no ciclo biológico das rickettsias.

## 2. RESERVATÓRIOS ANIMAIS DE RICKETTSIAS PATOGÉNICAS

Na América do Norte foram isoladas *Rickettsia rickettsii* dos roedores *Microtus pennsylvanicus* (Gould e Miesse, 1954), *Peromyscus leucopus* e *Pitymys pinetorum* e do lagomorfo *Sylvilagus floridanus*. Todos eles animais juvenis, sem anticorpos detectáveis pelas técnicas utilizadas (Burgdorfer *et al*, 1966). Com serologia positiva, encontraram-se os roedores dos géneros *Dipodomys* e *Citellus* e o género *Lepus*, entre outros.

Ainda foram detectados anticorpos em alguns pássaros do género *Amphispiza* e em *Eremophila alpestris* (Vest *et al*, 1965; McDade e Newhouse, 1986). O cão é susceptível à infecção experimental com *R. rickettsii* e desenvolve uma patologia semelhante à humana (Keenan *et al*, 1977; Breitschwerdt *et al*, 1987; 1988). Este animal foi encontrado com serologia positiva em todos os locais da América do Norte onde foi pesquisado (Sexton *et al*, 1976; Kelly *et al*, 1982; Magnarelli *et al*, 1982; Gordon *et al*, 1984).

Na Europa, na região mediterrânica, não foram isoladas rickettsias de animais vertebrados. Três grupos de animais foram considerados, por provas serológicas, como prováveis reservatórios de *R. conorii*:

- a) no grupo dos animais silváticos encontram-se os membros das famílias Muridae (*Apodemus sylvaticus*), Insectivora (*Erinaceus erinaceus*) e Lagomorpha (*Oryctolagus cuniculus*) e algumas aves (Rehacek e Tarasevich, 1988);
- b) num segundo grupo encontram-se as espécies cinegéticas de grandes mamíferos tais como o veado, o gamo, o javali (Rehacek e Tarasevich, 1988);
- c) o terceiro grupo compreende os animais domésticos como ovinos, caprinos, bovinos, cães e gatos (Gilot *et al*, 1981; Mansueto *et al*, 1984; Raoult *et al*, 1985; Punda-Polic *et al*, 1995a; 1995b). Provou-se que o cão era susceptível à infecção com *R. conorii*, apesar da infecção decorrer inaparente (Durand, 1930; Kelly *et al*, 1992).

Na Península Ibérica, apenas o cão e os lagomorfos (coelhos e lebres) foram estudados serologicamente (Espejo-Arenas *et al*, 1990; Herrero *et al*, 1992; Bacellar *et al*, 1995c). Em Barcelona, Espanha, foi feito um estudo com oito cães do qual se concluiu que estes animais apenas mantêm os anticorpos contra *R. conorii* por curto tempo, não sendo importantes como indicadores de infecção (Espejo *et al*, 1993), ao contrário do que foi encontrado nas Américas com *R. rickettsii* (Keenan *et al*, 1977).

Em África encontraram-se anticorpos contra *R. conorii* em *Rattus rattus* no Egipto (Soliman *et al*, 1989), no cão no Zimbabué (Kelly e Mason, 1991a) e em vários roedores no Quénia (Heisch *et al*, 1962). Neste último país, ainda foram isoladas várias estirpes de rickettsia a partir de *R. rattus* e de espécies de roedores silváticos dos géneros *Arvicanthis*, *Maastomys*, *Otomys*, *Lophuromys*, *Lemniscomys* e *Aethomys* (Heisch *et al*, 1962).

Na Ásia, alguns primatas (*Macaca* sp. e *Presbytis* sp.) e pequenos mamíferos (*Rattus rajah*, *Suncus murinus*) foram implicados no ciclo de *R. conorii* (Marchette, 1966).

Com anticorpos contra *R. sibirica* encontram-se citados mamíferos silváticos dos géneros *Sorex*, *Citellus*, *Marmota*, *Lepus*, *Mus*, *Microtus*, *Apodemus*, *Rattus*, *Cricetus*, *Meriones*, *Microtus*, *Clethrionomys*, *Vulpes* e *Cervus*, entre outros. Também foram demonstrados anticorpos contra esta rickettsia em equinos, ovinos, bovinos e em dromedários (Rehacek e Tarasevich, 1988). No Japão foi isolada uma estirpe de rickettsia, ainda não caracterizada, dos roedores *Apodemus speciosus* e *Rattus* sp. e os cães têm sido encontrados com serologia positiva contra *R. japonica* (Uchida, 1993; Yamamoto *et al*, 1992).

Na Austrália os cães foram encontrados com anticorpos contra *R. australis*, mas não se mostraram susceptíveis à infecção com esta rickettsia (Sexton *et al*, 1991).

### **3. RESERVATÓRIOS ANIMAIS DE RICKETTSIAS CONSIDERADAS NÃO PATOGÉNICAS**

Não se encontraram referências de isolamentos de rickettsias consideradas não patogénicas a partir de animais silváticos ou domésticos. Nas áreas geográficas onde são os únicos agentes rickettsianos conhecidos a maior parte dos géneros de animais estudados, já citados para as rickettsias patogénicas, foram encontrados com anticorpos (Rehacek, 1984; Péter, 1985; Norment e Burgdorfer, 1985). Os estudos de infecção experimental implicaram os roedores do género *Apodemus* como susceptíveis à infecção com *R. slovacica* (Rehacek e Tarasevich, 1988).

*" to discover the course of an zoonosis all fundamental factors have to be taken into consideration, i.e. fauna of local domestic and free living vertebrates, species and number of probable vectors and the environmental conditions ."*

J. Reháček, Rickettsiosis as zoonosis, 1992b

#### 4. CONSIDERAÇÕES

Embora os vertebrados não sejam considerados essenciais ao ciclo natural das rickettsias têm um papel primordial na manutenção e dispersão dos vectores infectados. Talvez devido ao curto período de rickettsiemia não se encontram muitos resultados sobre isolamentos de rickettsias a partir dos animais naturalmente infectados. As evidências do contacto entre bactéria/vertebrado são, na maior parte, serológicas e epidemiológicas. Um facto que sugere a importância dos vertebrados no ciclo natural das rickettsioses ocorreu na costa mediterrânica francesa. Em 1952, a mixomatose eliminou a maioria dos coelhos-bravos (*Oryctolagus cuniculus*) e foi notada uma diminuição dos casos de febre escarotuberculosa nesta região, associando-se o número destes animais como factor limitante do número de ixodídeos infectados, provavelmente por servirem de hospedeiros dos estádios intermédios (Gac, 1966).

Adicionalmente à existência de hospedeiros mamíferos, a actividade humana, especialmente, sobre a vegetação, tem tido um importante papel no aparecimento, aumento ou erradicação das rickettsioses. Dois dos factores mais citados como responsáveis pelo aumento de rickettsioses são a florestação, particularmente quando feita com arbustos, e a prática agrícola de criação de pequenos bosques, intercalados nas monoculturas de gramíneas. Estas actuações fornecem condições favoráveis à proliferação de artrópodos, devido não só a formação de microclimas favoráveis, como pela abundância de cobertura do solo, a qual vai gerar habitats excelentes para os micromamíferos, hospedeiros dos estádios intermediários. Um caso concreto aconteceu no Estado da Virgínia, E.U.A., onde o aumento de áreas florestadas, com espécies arbóreas de folhas caducas, originou um aumento de casos de febre das Montanhas Rochosas, já que estas árvores produzem mais humidade do que as pináceas, favorecendo a sobrevivência dos ixodídeos e dos hospedeiros (Atwood *et al*, 1965; Sonenshine *et al*, 1972).



## **VIII**

### **A Febre Escaro Nodular e outras Rickettsioses em Portugal**





*"Aux bons croyants d'Allah le Coran impose de faire au moins une fois dans la vie le pèlerinage à Mecque: pour nous, fidèles d'Hippocrate, il devient presque un commandement et un rite la pérégrination répétée aux Congrès internationaux".*

Ricardo Jorge, Congrès International d'Histoire de la Médecine à Bucarest. Allocution dans la séance solennelle d'inauguration, 1932

## 1. A OBRA DE RICARDO JORGE NO ESTUDO DAS RICKETTSIOSES

Ricardo Jorge, com a sua formação de médico sanitário, foi um pioneiro no estudo da prevenção das doenças transmissíveis e lançou as bases da Saúde Pública e da Epidemiologia em Portugal. Muitas foram as patologias por ele estudadas e divulgadas aos Portugueses, dado a sua constante actualização sobre o que ocorria no mundo da Ciência (Correia, 1960).

No que concerne às rickettsioses, entre os anos de 1917-1919, dedicou-se ao estudo do tifo epidémico, principalmente da epidemia que grassou na cidade do Porto. Nessa época, nos artigos e conferências, chamou a atenção dos seus colegas para esta entidade clínica, a qual denominava "um fóssil patológico", alertando para que não lhes passasse despercebida a sintomatologia. Enfatizou também, a necessidade da desinfecção e higiene do doente contra os piolhos, vectores da doença (facto recém descoberto por Nicolle em Túnis), como a única forma de controlar a disseminação do agente. Além de instruções para combater o tifo exantemático, distribuídas aos técnicos de saúde, instalou, nas vilas e cidades, locais para a desinfecção das pessoas (serviços públicos de banhos e despiolhamento) e criou as guias sanitárias para os viajantes, como medidas para combater e interromper a dispersão da infecção. Realizou trabalhos experimentais e descreveu as características epidemiológicas da doença, bem como as técnicas de diagnóstico por inoculação do sangue do doente no cobaio e por serologia, recorrendo ao teste de Weil Felix (Jorge, 1918; 1919). Embora hoje pareça normal esta atitude, na época foram estudos e técnicas consideradas de ponta, muitas vezes aplicadas contra as vontades dominantes.

Em 1930, reformado desde 1928, Ricardo Jorge era o Presidente técnico do Conselho Superior de Higiene da Sociedade das Nações, organismo precursor da Organização Mundial de Saúde, como delegado de Portugal. É nessa altura que publica, no "*Office International d'Hygiène Publique*" e no jornal científico "*Lisboa Médica*", o artigo "*La fièvre exanthématique (fièvre escaro-nodulaire) et son apparition au Portugal*". Neste trabalho assinala o aparecimento discreto e benigno de uma nova patologia, com

afinidades com o tifo exantemático. Refere os casos ocorridos, um pouco por toda a região mediterrânica e, em especial, os casos ocorridos em Portugal e Espanha. Descreve as características nosológicas, epidemiológicas e experimentais da nova patologia e propõe que seja denominada febre escaro-nodular. Escolheu esta terminologia por considerar que a designação de “*fièvre exanthématique de Marseille*”, nome por que era conhecida na altura a doença, não se justificava geograficamente. Escreveu: “*Nous l'appellerions volontiers fièvre escarro-nodulaire: nodulaire, pour marquer le type papuleux, lenticulaire, noueux de l'exanthème; escarro, à cause de l'escarre initiale, dont la présence, tout en n'étant pas constante, imprime son cachet caractéristique à l'affection.*” Ainda em 1930, é publicado um artigo, no jornal “*Presse Medicale*”, com o título “*A propôs de la denomination de la fièvre exanthématique (fièvre escarro-nodulaire)*”, em resposta aos comentários de Olmer (1930) que defendia a denominação francesa que havia dado à doença, em Marselha. Neste artigo, apesar de considerar que o termo escaro nodular era nosologicamente válido e útil, Olmer apenas se inclinava a aceitar a designação de “febre exantemática nodular”. A polémica sobre a denominação da patologia só foi resolvida em 1932, no I Congresso de Higiene Mediterrânico, em que a designação de Conor e Bruch, “febre botonosa”, foi escolhida por ter prioridade temporal sobre todas as outras (Jorge, 1930a; 1930b; 1932; Lemaire, 1932). Os autores e clínicos portugueses continuam porém a denominar a patologia de Febre escaro nodular que, popularmente, é conhecida por “febre da carraça”. Ricardo Jorge fez, ainda, uma revisão dos conhecimentos sobre as diversas rickettsioses que ocorriam pelo mundo: tifo epidémico, doença de Brill-Zinsser, tifo murino, Febre escaro nodular e outras febres exantemáticas. Refere-se aos agentes patogénicos como “*protozoaires du genre Rickettsia*” e estabelece uma classificação sucinta das rickettsioses. O trabalho denominou-se “*La famille typho-exanthématique*” e foi publicado no “*Office International d'Hygiène Publique*” (Jorge, 1933).

Ricardo Jorge morreu em 1939, com 81 anos, porém a obra que desenvolveu foi continuada por outros médicos seus contemporâneos e inspirou muitos dos que se lhe seguiram.

## 2. OUTROS INVESTIGADORES PORTUGUESES DA FEBRE ESCARO NODULAR

Em 1932, Neves descreve sucintamente um caso clínico de Febre escaro nodular e, como mera curiosidade, refere-se aqui, o tratamento prescrito: clisteres de soro glucosado, adrenalina, azeite canforado e salol com urotropina (Neves, 1932). Em 1937, Azevedo faz uma revisão sobre “A febre botonosa de Conor e Bruch (febre escaro-nodular de Ricardo Jorge) em Coimbra”. Além dos casos que observou na sua clínica e de outros, de

que lhe deram conhecimento colegas seus, traz à luz a informação de que já em 1917, Delfim Pinheiro tinha descrito a doença, num ofício enviado ao delegado de saúde de Coimbra de então. Nesse ofício este último médico descreve primorosamente os casos clínicos observados em Soure, entre Agosto de 1917 e Setembro do ano seguinte e distingue-os do tifo epidémico que grassava na altura. Pergunta: “*Mas que doença é esta? Qual é o seu lugar no quadro nosológico?*” e conclui: “*Confesso o meu embaraço, filho da minha ignorância*”. Baptizou-a de pintador ou pintadeira (Azevedo, 1937).

Com o trabalho de Azevedo (1948), “Tratamento da Febre escaro nodular pelo ácido para-aminobenzóico”, iniciou-se uma série de publicações dedicadas à terapêutica farmacológica da doença. Cutileiro, Madeira, Nina, Sampaio são alguns dos clínicos que se interessaram por este assunto nos anos subsequentes (Cutileiro *et al*, 1949a; Cutileiro, 1950; Nina, 1951). Nos anos 50 foi dada grande atenção ao estudo das reacções serológicas para o diagnóstico das rickettsioses. Sampaio e Faia no Instituto Ricardo Jorge e Pinto, no Instituto de Medicina Tropical, foram alguns dos que publicaram artigos sobre esta matéria (Sampaio e Faia, 1951; 1953; Pinto, 1951; Motta, 1953).

Em 1970 e 1974, encontram-se dois trabalhos de revisão sucinta que relembram a existência desta patologia mediterrânica entre os Portugueses. Foram publicados no “*Concours Medical*” e traduzidos para português pelo “*Jornal do Médico*” (Payet, 1970; Aubertin e Lepoutre, 1974). Em 1971, Gustavo Nobre, no Instituto Bacteriológico Câmara Pestana, apresenta como tese de doutoramento, o trabalho intitulado “A cultura de *Rickettsia conorii* e a sua utilização em provas de imunofluorescência”. Neste trabalho descreve isolamentos deste microrganismo, a partir de ixodídeos – *Rhipicephalus sanguineus* – retirados de cães, e sua posterior utilização como antigénio para diagnóstico imunológico (Nobre, 1971). Ainda na década de 70, Porto, Proença, Vieira e Dias, entre outros, também se dedicaram a estudar diferentes aspectos relacionados com a clínica da Febre escaro nodular (Proença *et al*, 1974; Porto *et al*, 1977).

Em 1981, Carmo, Uva, Paiva e outros médicos do Hospital de Santa Maria, em Lisboa, realizaram diversos estudos sobre a Febre escaro nodular; para além da actualização teórica e análise retrospectiva dos casos observados no hospital, descreveram casos com invulgar porta de entrada ou cujo diagnóstico diferencial de leptospirose foi feito por imunofluorescência (Carmo *et al*, 1981a; 1981b; 1981c). Ainda no mesmo hospital, Tavares, Botas, Antunes e Araújo apresentaram o estudo de 116 observações ocorridas na região de Lisboa, entre 1975 e 1984 e uma análise estatístico-epidemiológica da Febre escaro nodular declarada aos serviços da Direcção Geral dos Cuidados de Saúde Primários (DGCSP), durante os anos de notificação obrigatória (1955-1984). Este estudo chamou a atenção para dois factos: a alta taxa de mortalidade em indivíduos com idades superiores a 60 anos e a notória subnotificação, tendo os cálculos estatísticos realizados apontado para uma incidência vinte vezes maior do que a declarada (Tavares *et al*, 1985).

Nos anos 90, os clínicos continuaram atentos aos casos de Febre escaro nodular e a sua importância em saúde pública. Nas sessões clínicas hospitalares e nas jornadas e reuniões de Infeciologia este assunto tem sido alvo de várias intervenções por parte dos internos de medicina (Gaspar *et al*, 1993; Martins, 1993; Paiva, 1993). Foram publicados: uma revisão dos casos registados no Porto, onde se assinala que *R. conorii* é a bactéria responsável por 1% e 5,3% dos internamentos nas idades entre os 11-20 anos e acima dos 50 anos, respectivamente (Castro *et al*, 1993) e um estudo retrospectivo dos casos ocorridos em Coimbra e sobre a alta mortalidade que induz no doente idoso (Valente *et al*, 1994a;1994b) .

Com estas referências não se considera esgotada a pesquisa da literatura portuguesa sobre este assunto. Muito deve ter passado despercebido e muito não chegou ao prelo. A informatização dos trabalhos de investigação feitos em Portugal ainda não existe, tornando-se difícil a pesquisa bibliográfica dos trabalhos realizados.

### 3. OUTRAS RICKETTSIOSES

Apesar de a presente dissertação se referir essencialmente ao estudo das rickettsias do grupo das febres exantemáticas transmitidas por ixodídeos, não se pode deixar de referir os trabalhos realizados com outros agentes de rickettsioses de notificação obrigatória.

Desde a primeira metade do século que o tifo epidémico e o tifo murino estão controlados, deixando de ser um problema de saúde pública pelo que, embora referidos na literatura, não se encontraram casos notificados (Cutileiro; 1940; Fonseca *et al*, 1942; Fonseca e Pinto, 1942; 1951; Pinto,1945; Cutileiro e Sampaio,1949; Sampaio e Soares, 1950). Recentemente, no CEVDI, foram encontrados alguns soros com anticorpos contra *R. typhi*. Um dos casos confirmou-se como sendo tifo murino agudo (André *et al*, env. publicação).

Como já foi referido no capítulo dedicado às rickettsias patogénicas, quando se descreveu os trabalhos com *R. africae*, já em 1912, Sant'Anna publicava "*On a disease in man following tick bites and occurring in Lourenço Marques*" no jornal "*Parasitology*" e, em 1923, Prates apresenta no Congresso de Luanda o trabalho "Febre de carraças não recorrente endémica em Lourenço Marques" (Sant'Anna, 1912; Prates, 1923). Estas duas publicações são frequentemente citadas na literatura internacional quando se fala do grupo das febres exantemáticas em África, como uma das primeiras descrições da patologia, dos vectores e dos dados epidemiológicos de rickettsioses neste continente.

*"Os estudos de entomologia médica e veterinária efectuados no nosso País, estão muito longe de estar terminados....., existem aqui vectores com responsabilidade conhecida em outros países pela transmissão de diversos vírus."*

A.R.Filipe, Vírus transmitidos por Ixodoidea. Alguns aspectos ecológicos e relações vírus-vector vertebrado, 1980.

#### 4. CONSIDERAÇÕES

Em 1954, Portugal ainda constava do "*Rapport Epidemiologique e Demographique*" da WHO, com 535 casos notificados de morbidade e mereceu o comentário de "*les chiffres sont impressionants...*" (Olmer, 1956). Nas duas últimas décadas, a Organização Mundial de Saúde realizou, periodicamente, reuniões sobre as rickettsias e rickettsioses. Formaram-se diversos grupos de trabalho para estudos de diagnóstico, de vacinas ou tratamento e criou-se um grupo denominado "*Mediterranean zoonoses control programme*", onde Portugal foi representado pela Escola Nacional de Saúde Pública. Entretanto aquela organização estabeleceu quatro centros de referência, responsáveis pelo controlo e prevenção de rickettsioses (em Atlanta, E.U.A; em Marselha, França; em Bratislava, Slováquia e em Moscovo, Rússia) (WHO, 1981; 1982a; 1982b; 1987; 1988). As conclusões e recomendações resultantes destas reuniões referiram sempre a necessidade do controlo epidemiológico das rickettsioses, bem como a necessidade da sua maior divulgação entre o pessoal médico, para um diagnóstico correcto e precoce. Contudo, na última reunião, ocorrida em 1991, denominada "*Global surveillance of rickettsial diseases*", apenas a antiga República da Checoslováquia, a Federação Russa, França, Grécia, Itália e Suíça, na Europa, foram os países considerados como integrantes deste grupo, tendo um espanhol participado na reunião como observador convidado (WHO, 1993).

Portugal, por suas características climáticas, é considerado como um país mediterrânico e as condições naturais para a existência de ixodídeos são excelentes. Estes podem manter os agentes patogénicos (vírus, borrelíias, rickettsias) em focos enzoóticos, por muito tempo. No que concerne às rickettsias, nos últimos 10 anos, tem havido uma média de 1000 casos/ano de febre escaro-nodular, notificados à DGCS. A mortalidade nas idades superiores aos 50 anos tem ocorrido sistematicamente. Em 1992 foram notificados 15 óbitos, distribuídos por todo o país. A subnotificação da morbidade é reconhecida implicitamente por todos os agentes de saúde e, como já foi referido, segundo alguns autores os casos mortais notificados e ainda aqueles não reconhecidos como sendo causados por rickettsioses seriam no mínimo 20 vezes mais

numerosos (Tavares *et al*, 1985). Afasta-se assim, completamente, a ideia de que a febre da carraça seja benigna e sem grande importância em Saúde Pública humana no nosso País; a emergência de novas patologias (Borreliose de Lyme, Ehrlichioses) vêm confirmar a necessidade de manter uma vigilância epidemiológica acerca dos artrópodos vectores e dos agentes por eles transmitidos. Esta tem vindo a ser exercida no Instituto Nacional de Saúde, primeiro no Laboratório de Arbovírus e actualmente no CEVDI, sob a orientação do Prof. Dr. A. R. Filipe.

Como complemento do que foi escrito sobre os trabalhos realizados em Portugal, apresentam-se na figura 9 os dados sobre a incidência da Febre escaro nodular desde que se tornou doença de notificação obrigatória em 1955 (Tavares *et al*, 1985; DGCSP, 1986-1994) e na tabela VI os óbitos declarados nos últimos 10 anos (DGCSP, 1985-1994).

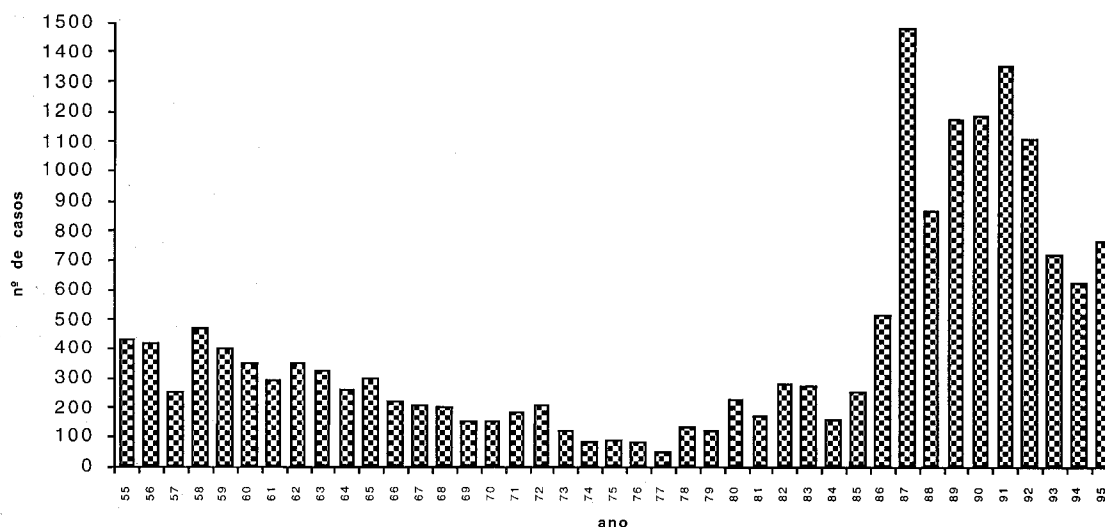


Figura 9. Casos declarados de Febre escaro nodular de 1955-1995.

**Tabela VI. Óbitos declarados causados pela Febre escaro nodular em Portugal**

ano	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995*
nº de casos	13	9	19	12	14	14	15	12	0	0	3

\* Dados provisórios

# **PROPOSIÇÃO**





## RICKETTSIAS ISOLADAS EM PORTUGAL

### Contribuição para a identificação e classificação de estirpes

As rickettsias são bactérias, parasitas obrigatórias de células de vertebrados e invertebrados, que ao serem transmitidas ao Homem pela picada de um artrópodo podem dar origem a diversas formas de doenças. Como foi referido, de acordo com os sintomas clínicos que produzem nos doentes e com as suas propriedades antigénicas, as rickettsias foram, tradicionalmente, classificadas em três grupos: o grupo do tifo, o grupo do tifo fluvial do Japão e o grupo das febres exantemáticas.

O nosso interesse está dirigido essencialmente para o estudo das rickettsias do grupo das febres exantemáticas. Em Portugal, desde 1917 que foi dado a conhecer, por descrições clínicas, a existência da febre escaro-nodular, cujo agente etiológico é *Rickettsia conorii*. Esta é uma febre exantemática benigna que, por vezes, tem uma evolução clínica grave podendo mesmo contribuir para a morte do doente. Ricardo Jorge foi um dos investigadores que dedicou grande parte da sua atenção a este grupo de agentes patogénicos. Desde 1955 que é uma doença de declaração obrigatória e nos últimos 5 anos foram declarados cerca de 1000 casos/ano, com uma mortalidade notificada que atingiu 15 casos, no ano de 1992.

As rickettsias do grupo das febres exantemáticas têm como vector e hospedeiro artrópodos pertencentes à família Ixodidae. Multiplicam-se em vários órgãos dos ixodídeos e são transmitidas transovária e transtadialmente, tornando desnecessária a presença de hospedeiros intermédios ou de reservatórios vertebrados. A sua transmissão ao Homem é considerada acidental.

As rickettsias são encontradas nas zonas temperadas e tropicais do globo, com uma distribuição geográfica que acompanha a dos ixodídeos. Aparentemente, não causam doença a estes artrópodos indicando que a relação parasita-vector é, do ponto de vista evolutivo, muito antiga e estável.

Estudos realizados um pouco por todo mundo tornaram evidente que o grupo das febres exantemáticas engloba várias espécies de rickettsias, além de *R. conorii*. Algumas delas são patogénicas para o Homem, enquanto que outras apenas têm sido isoladas de ixodídeos e o seu estatuto como agentes de doença está ainda por esclarecer. O objectivo final desta dissertação foi contribuir para obter uma melhor informação acerca da ecoepidemiologia das rickettsias existentes em Portugal.

Para obter este conjunto de conhecimentos utilizaram-se técnicas de isolamento “*in vitro*” em cultura de células, técnicas de estudo de imunidade cruzada em animais de laboratório e técnicas de biologia molecular empregues no estudo do material genético dos microrganismos isolados, prioritariamente, de ixodídeos. O isolamento e a identificação de rickettsias a partir do sangue, de doentes com Febre escaro nodular e de doentes com síndrome febril de origem desconhecida, foi também um dos aspectos a considerar neste estudo.

Assim, com o presente trabalho foi possível contribuir para delinear o quadro das espécies de rickettsias existentes em Portugal, e que em alguns domínios, serão objecto de trabalhos posteriores à preparação da tese de dissertação, porque a investigação sobre as rickettsias está ainda muito longe de ser dada como terminada no nosso país.

# **MATERIAL E MÉTODOS**



**I**

**Proveniência do Material de Estudo**



## 1. IXODÍDEOS



**Figura 10. Método da bandeira para recolha de ixodídeos na vegetação.**  
in Leitão, 1950

Os ixodídeos, estudados para isolamento de estirpes de rickettsias, foram capturados durante os anos de 1991 a 1995.

Os ixodídeos, em fase de vida livre, foram recolhidos pelo método da bandeira, que consiste em passar sobre a vegetação um pano turco com 1 m<sup>2</sup>, em áreas previamente seleccionadas (Figura 10) (Leitão, 1950). Nas colheitas realizadas neste estudo a bandeira foi passada sobre o extrato arbustivo e sobre a vegetação herbácea, num movimento constante, e a cada 5 metros foi verificado se havia ixodídeos agarrados ao tecido. Os critérios de selecção das áreas pesquisadas por este método foram os caminhos por onde passavam periodicamente animais domésticos e as áreas que fossem reconhecidas como habitat de animais silváticos.

A região da Marateca, a sul do rio Tejo e, sobretudo, a bacia do Rio Sado, nos Concelhos de Palmela e Alcácer do Sal, foram as áreas geográficas mais estudadas por este método. A flora desta área é caracterizada, maioritariamente, por extensos montados de sobre (*Quercus suber*), existentes na margem leste do estuário do rio Sado, bem como por arrozais. A vegetação arbustiva pertence a um biótopo do tipo carrascal (*Quercus coccifera*, *Cistus* sp, *Rubus* sp) e as herbáceas são gramíneas e angiospérmicas (Júlio, 1991). As temperaturas médias, nos últimos anos, variaram entre 28 °C em Agosto e 5° C em Janeiro; a precipitação anual média foi cerca de 600 mm e a humidade relativa do ar média, às 9 horas da manhã, foi de 78% (INMG, 1994).

Os animais domésticos (bovinos, ovinos, caprinos e equinos) pesquisados para ixodídeos em fase parasitária, pertenciam maioritariamente à zona de intervenção agrícola de Alcácer do Sal. Os animais estudados foram colocados em cercas de contenção (mangas) e imobilizados para colheita de sangue ou para vacinação, destinadas principalmente ao controlo da brucelose, sendo então permitido à equipa do Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas (CEVDI) retirar os ixodídeos que a eles se encontravam fixados. As zonas do corpo dos animais, sistematicamente pesquisadas,



foram: a ponta da cauda, a região anal, o úbere e partes interiores dos membros traseiros, as orelhas, à volta dos cornos e a barbela. Durante a época de vacinação anti-rábica (Março a Junho), na cidade de Setúbal e no Concelho de Palmela (freguesia de São Pedro da Marateca) foram retirados ixodídeos dos cães (*Canis familiaris*) levados aos locais de vacinação. Os veterinários municipais e os proprietários dos animais autorizaram a recolha de exemplares dos artrópodos. As zonas do corpo dos animais pesquisadas para ixodídeos foram: as orelhas, o pescoço, o dorso e as zonas interdigitais.

Os ixodídeos obtidos de animais silváticos tiveram uma proveniência mais diversificada: as raposas (*Vulpes vulpes*) foram abatidas, maioritariamente no barlavento algarvio, nos meses de Janeiro e Fevereiro; os javalis (*Sus scrofa*) foram abatidos em montarias, em Novembro, no Concelho de Alcacer do Sal; os coelhos-bravos (*Oryctolagus cuniculus*), as lebres (*Lepus capensis*), as ginetas (*Genetta genetta*), os sacarrabos (*Herpestes ichneumon*), entre outros, foram capturados em diferentes zonas protegidas do País por pessoal do Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências de Lisboa, sob orientação da Prof. Dr<sup>a</sup>. M. Santos Reis e Prof. Dr. F. Fonseca.

Todos os exemplares de ixodídeos colhidos foram colocados em tubos de plástico, com orifícios na tampa para permitir a passagem do ar, catalogados com a indicação do local, dia da captura e espécie de animal ou tipo de vegetação. No laboratório foram identificados, classificados a nível de espécie e separados por sexo e estadio de desenvolvimento. Apenas os que permaneceram vivos foram submetidos ao estudo apresentado nesta dissertação.

## 2. SANGUE HUMANO

### 2.1. Amostras para isolamento

No isolamento de estirpes de rickettsias foram utilizadas amostras de sangue total colhidas de indivíduos doentes ou suspeitos clinicamente de terem contraído uma Febre escaro nodular. Estas amostras foram obtidas nos Hospitais Distritais de Beja, Évora e Setúbal, colhidas directamente no CEVDI ou enviadas do Instituto Nacional de Saúde (INSA)-Lisboa.

Foi solicitado que o sangue fosse colhido com anticoagulante (heparina ou citrato de sódio), no período febril e, preferencialmente, antes do início da antibióticoterapia e ainda, que a amostra fosse mantida dentro da seringa, para evitar contaminações com microrganismos existentes no ambiente. Nos hospitais, o sangue foi mantido a 4 °C por

um período até 48 horas ou, após este tempo, congelado a -20 °C e enviado ao CEVDI em contentor de frio. No CEVDI, o coágulo foi separado do plasma e ambos divididos em alíquotas, em condições de assepsia total (operações realizadas em câmara de fluxo laminar). As amostras foram congeladas a -80 °C até serem processadas para isolamento.

## 2. 2. Amostras para estudo serológico

Os soros foram estudados no Laboratório de Rickettsias do CEVDI onde o diagnóstico serológico de rickettsiales, é efectuado pelo teste de imunofluorescência indirecta (IFA), técnica de referência da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1988).

As amostras de soro humano destinadas a pesquisa de anticorpos contra rickettsias tiveram a seguinte proveniência:

- 1) para o diagnóstico serológico de Febre escaro nodular foram recebidos soros provenientes de todo o continente e regiões autónomas dos Açores e Madeira, colhidos em várias instituições de saúde (hospitais, centros de saúde, laboratórios de análises clínicas), assim como amostras colhidas no INSA em Lisboa, na sua delegação do Porto e no CEVDI.
- 2) com o objectivo de determinar a prevalência de rickettsioses no nosso País foram realizados vários inquéritos seroepidemiológicos entre 1993 e 1995. A amostragem foi escolhida por conveniência, tendo sido estudadas as seguintes populações:
  - a) dadores de sangue do Serviço de Sangue do Hospital Distrital de Setúbal;
  - b) doentes com diagnóstico de febre de origem indeterminada;
  - c) utentes do serviço de colheitas do INSA, com diversas patologias, exceptuando febres exantemáticas.
  - d) indivíduos considerados em risco de contrair rickettsioses pela sua actividade profissional.

## 3. ANIMAIS DOMÉSTICOS

### 3.1. Amostras para estudo serológico

Sendo o cão doméstico o hospedeiro preferencial de *Rhipicephalus sanguineus*, o ixodídeo reservatório e vector de *R. conorii*, de 1991 a 1994, foram estudadas serologi-

camente algumas populações caninas, com o objectivo de determinar a importância destes animais no ciclo desta e de outras rickettsias:

- a) em duas épocas distintas, Inverno de 1991 (Outubro a princípios de Janeiro) e Verão de 1992 (Abril a Julho) foram estudadas amostras colhidas de cães vadios, capturados pelos Serviços da Câmara Municipal de Setúbal, e de animais levados pelos proprietários ao canil municipal para abate, geralmente por se encontrarem doentes.
- b) com o objectivo de determinar a cinética de anticorpos contra *R. conorii* em canídeos, estudaram-se três populações, tendo sido feita várias colheitas de sangue de cada animal, ao longo do ano de 1994. Uma população foi constituída com cães da Polícia de Segurança Pública de Lisboa (PSP), alojada no canil de Belas. A segunda população constituiu-se com cães de companhia, de uma zona urbana (cidade do Barreiro) e a terceira com cães considerados como de companhia ou de guarda de uma zona rural (aldeia de Águas de Moura e arredores).

## 4. MICROMAMÍFEROS

### 4.1. Amostras para estudo serológico

Nas capturas de micromamíferos foram utilizadas armadilhas tipo “Sherman”, “Uglann” e “Longworth”, próprias para animais de pequeno porte e tipo “Tomhawk” para animais de maiores dimensões. As armadilhas foram colocadas em transectos, com uma distância entre elas de aproximadamente 12 metros, ao longo de trajectos definidos, os quais foram mantidos em todas as sessões de captura. Os mesmos trajectos foram utilizados para a captura de ixodídeos pelo método da bandeira.

A proveniência dos micromamíferos estudados foi a seguinte:

- a) uma população de micromamíferos foi capturada, de Abril de 1994 a Abril de 1995, numa estrada rural entre a Herdade das Paulinas e a Herdade do Pinheiro, freguesia de São Pedro da Marateca, concelho de Palmela. Esta área foi também utilizada para captura de ixodídeos na vegetação. Durante esse ano, semanalmente, foram colocadas 20 armadilhas “Longworth”, durante 24 horas e depois levantadas. Os micromamíferos foram capturados para estudos da dinâmica de populações de ixodídeos existentes nesta região e determinação do seu papel como reservatórios de agentes de doenças (vírus, borrelíias e rickettsias).

b) outros micromamíferos foram capturados no âmbito de um projecto conjunto com o Departamento de Zoologia e Antropologia da Faculdade de Ciências de Lisboa, destinado a verificar o papel destes mamíferos como reservatórios de zoonoses. As áreas de captura foram estabelecidas no Monte de Pancas, Distrito de Santarém, concelho de Benavente (Ribatejo) e em duas herdades (Quinta da Boa Vista e Quinta do Castelo) perto de Montemor-o-Velho, Distrito de Coimbra (Beira Litoral). Na primeira área, utilizada para criação de gado bovino e equino, a vegetação consistia em pastagens e montados de sobro; a segunda área, fundamentalmente agrícola, tinha predominância de arrozais. A periodicidade de captura, entre os anos de 1993 e 1995, foi trimestral. Em cada sessão de capturas foram colocadas um total de 150 armadilhas, dos três tipos já mencionados, por um período de 3 noites. Em cada manhã os animais capturados foram retirados das armadilhas e estas mantidas no local.

#### **4.2. Amostras para isolamento**

O isolamento de estirpes de rickettsias, a partir de órgãos de micromamíferos, foi tentado, numa primeira fase, de animais escolhidos aleatoriamente e, numa segunda fase, apenas dos animais em que foram detectados anticorpos contra *R. conorii*. Os micromamíferos estudados foram capturados, maioritariamente, nos anos de 1994 e 1995.



## **II**

### **Pesquisa de Rickettsias em Ixodídeos**



## 1. TESTE DOS HEMÓCITOS

O teste dos hemócitos consiste na visualização das rickettsias na hemolinfa dos ixodídeos (Burgdorfer, 1970a; Rehacek *et al*, 1971). Como material para a execução do teste utilizaram-se lâminas de vidro para microscopia onde foram desenhadas linhas paralelas e círculos de 2 mm de diâmetro. Estas lâminas foram lavadas com uma solução de álcool e acetona (v/v) e secas. Os ixodídeos, classificados e separados por espécie, sexo e estadio, foram passados, sucessivamente, por álcool a 70°, por água destilada e depois secos com papel de filtro. Cada ixodídeo teve a parte distal do primeiro par de patas amputada e a gota de hemolinfa que emergiu do corte foi colocada no centro de um dos círculos feitos nas lâminas de vidro. O artrópodo recebeu o número correspondente ao círculo e foi mantido num frasco plástico com a tampa perfurada, em local húmido e frio. Depois de fixada pelo calor, as gotas de hemolinfa foram coradas pelo método de Giménez (1964). Posteriormente, as preparações foram observadas ao microscópio óptico (Olympus CH) com objectiva de imersão (10 x 100). Por este método as rickettsias ficam coradas de vermelho enquanto que a hemolinfa e os hemócitos de verde-azulado.

## 2. IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRECTA

Ocasionalmente, a hemolinfa colhida segundo o procedimento anterior foi analisada pelo teste de imunofluorescência indirecta (IFA) com um soro policlonal humano com título conhecido de anticorpos contra *R. conorii* (soro positivo controlo) (Burgdorfer, 1960).

O teste de IFA foi realizado de acordo com o protocolo descrito a seguir:

- a) as gotas de hemolinfa foram cobertas por 25 µl do soro positivo controlo;
- b) a lâmina foi incubada por 30 minutos, a 37 °C, em câmara húmida;
- c) a seguir lavou-se com tampão fosfato salino pH 7,4 (PBS-Sigma), por 2 vezes, durante 10 minutos cada, com agitação magnética e secou-se ao ar;
- d) sobre cada gota de hemolinfa colocaram-se 25 µl de conjugado fluoresceinado anti-imunoglobulinas IgA, IgG, IgM humana, fracções Kappa e Lambda, preparado em coelho (FICT Dako A/S Dinamarca), diluído com uma solução aquosa de Azul de Evans (1:800) conforme as indicações do fabricante e incubou-se como descrito no ponto b;



- e) após nova sequência de lavagem, a lâmina foi passada por água destilada e seca ao ar;
- f) colocaram-se algumas gotas de glicerina tamponada (Sigma) sobre a lâmina e recobriu-se com uma lamela.

A observação foi feita com uma ampliação de 10 x 40 (objectiva Olympus Splan 40 0,70/160/0,17) num microscópio de fluorescência (Olympus BH<sub>2</sub>). Por este teste, quando positivo, as rickettsias emitem fluorescência verde-amarelada e a hemolinfa e os hemócitos ficam vermelhos.

### **III**

## **Isolamento de Estirpes de Rickettsias**



## 1. IXODÍDEOS

O isolamento de estirpes de rickettsia foi efectuado apenas com ixodídeos considerados positivos no teste dos hemócitos. Para o isolamento dos microrganismos observados na hemolinfa foi aplicada a técnica denominada “*shell vial*”. Esta consiste na centrifugação da amostra sobre uma camada de células de crescimento contínuo em cultura (Péter *et al*, 1990). O fundamento da técnica consiste em obrigar pela força da centrifugação que os microrganismos parasitas intracelulares que estejam na amostra penetrem na camada celular. Os microrganismos extracelulares, bem como outro material da amostra, que fiquem no sobrenadante são decantados (Weiss e Dressler, 1960).

O procedimento utilizado foi o seguinte:

- a) a metodologia aplicada implica que antes seja iniciado o crescimento de uma cultura de células Vero E6 no fundo plano de frascos com 3 cm<sup>3</sup> de capacidade e 1,5 cm de diâmetro, de modo que no dia do isolamento se tenha uma camada celular contínua (anexo);
- b) trabalhando numa câmara de fluxo laminar tipo Biohazard II, cada ixodídeo foi desinfectado durante 10 minutos por imersão numa solução alcoólica de iodo (1g/l), passado por água destilada esterilizada e em seguida seco com papel de filtro esterilizado;
- c) a parte distal do primeiro par de patas foi cortada e a hemolinfa que saiu do corte foi diluída em 0,5 ml de meio de cultura de células (*Eagle's Minimum Essential Medium* – MEM – Gibco) adicionado de 1% de glutamina, 8% de soro bovino e sem antibióticos (este meio será referido nesta dissertação como MEM completo)
- d) esta mistura foi transferida para os frascos com a camada de células (ponto a);
- e) os frascos foram centrifugados a 5000 r.p.m., a 20°C, durante uma hora;
- f) o meio foi decantado e substituído por 1,5 ml de MEM completo;
- g) os frascos foram incubados, a 32°C durante 5-6 dias;
- h) após este período de tempo, nos frascos em que ao fim de 48 horas não se observou contaminação com bactérias e/ou fungos, as células foram suspensas no meio de cultura, pela acção de esferas de vidro esterilizadas de 0,5 mm de diâmetro;
- i) esta suspensão foi transferida para um frasco de plástico de cultura de células, de 25 ml de capacidade, onde foi cultivada uma camada de células Vero E6 (anexo). Deixou-se adsorver, durante 30 minutos, com agitação horizontal ocasional, à temperatura ambiente;
- j) foram adicionados 5 ml de MEM completo e os frascos colocados na estufa a 32°C, durante 5-6 dias.

Para controlo da infecção, ao fim deste período de tempo, com uma pipeta de Pasteur, raspou-se uma pequena quantidade de células as quais foram colocadas em lâminas de vidro de microscopia, para coloração pelo método de Giménez e/ou para IFA. Uma alíquota foi inoculada em meios de cultura bacteriológicos próprios para provas de esterilidade.

As culturas consideradas positivas para rickettsias foram submetidas a multiplicação dos microrganismos por repicagem, isto é, as células infectadas foram levantadas no MEM completo, com as esferas de vidro. Cerca de 1-2 ml da suspensão foram inoculados em outros frascos de 25 ml ou 150 ml de capacidade, de acordo com o estudo a realizar com as estirpes de rickettsias isoladas. De cada estirpe isolada foram colocados 2 ml de suspensão das células infectadas em tubos de criopreservação para armazenamento a -80 °C.

## 2. SANGUE HUMANO

A técnica do “*shell vial*” foi utilizada para isolamento de rickettsias a partir do plasma e do coágulo de sangue de doentes com diagnóstico clínico de febre escaro-nodular ou com sintomatologia suspeita, por uma metodologia semelhante a já descrita para isolamento de rickettsias a partir da hemolinfa dos ixodídeos (Marrero e Raoult, 1991).

O procedimento seguido foi o seguinte:

- a) emulsionaram-se cerca de 0,5 ml de plasma e/ou coágulo de sangue com 0,5 ml de MEM completo;
- b) esta emulsão foi depositada sobre a camada de células Vero E6 a crescer no fundo dos frascos, os quais foram a centrifugar, como descrito;
- c) após a centrifugação da amostra, os eritrócitos que ficaram depositados sobre as células, foram lavados com PBS pH 7,4, adicionado e retirado com pipeta de Pasteur, antes da colocação do meio de cultura novo e dos frascos serem postos em incubação;
- d) a comprovação da positividade, multiplicação e armazenamento das estirpes de rickettsia foram feitos utilizando o protocolo descrito.

## 3. ÓRGÃOS DE MICROMAMÍFEROS

Os micromamíferos capturados foram transportados para o laboratório onde foram anestesiados, pesquisados para ectoparasitas, sangrados e autopsiados. Para isolamento

de rickettsias foi utilizado numa primeira fase o cérebro e posteriormente o baço. Os órgãos, retirados durante a autópsia, foram passados por álcool a 70%, conservados a -20°C e, posteriormente, transferidos para -80 °C, até serem processados. Numa segunda fase, o baço foi estudado imediatamente a seguir à autópsia. O processamento dos órgãos consistiu na seguinte metodologia:

- a) descongelou-se o baço/cérebro, que foram macerados em um almofariz, com 2 ml de MEM completo (trabalho efectuado em câmara de fluxo laminar);
- b) o macerado foi passado por filtros de 5  $\mu$  de porosidade (Millipore) para retenção dos tecidos;
- c) cerca de 0,5 ml do filtrado foi utilizado para isolamento de rickettsias pela técnica do “*shell vial*”, tal como descrito.



## **IV**

### **Identificação e Classificação Imunológica de Estirpes de Rickettsias**





## 1. ESPÉCIES PADRÃO

Todas as estirpes de rickettsias isoladas em Portugal foram identificadas por métodos comparativos, utilizando como padrão de comparação estirpes de espécies de rickettsias de referência. Estas foram obtidas por doação do “Centers of Disease Control and Prevention” (CDC) em Atlanta, E.U.A. ou da “Unité des Rickettsies” em Marselha, França. Originariamente, estas estirpes foram obtidas do “American Type Culture Collection” (ATCC) ou por oferta de outros laboratórios (Regnery *et al*, 1991). As espécies utilizadas foram as seguintes:

- *Rickettsia conorii* estirpe marroquina ATCC VR-141
- *Rickettsia conorii* estirpe 7# ATCC VR-613
- *Rickettsia rhipicephali*
- *Rickettsia slovaca* #246
- *Rickettsia sibirica* ATCC VR-151
- *Rickettsia typhi* ATCC VR-144
- *Rickettsia helvetica* estirpe C3

## 2. MICROIMUNOFLUORESCÊNCIA COM SOROS DE MURGANHOS

Um dos métodos utilizados neste trabalho para a identificação e classificação das estirpes de rickettsias isoladas foi o teste de microimunofluorescência (MIF) segundo o protocolo descrito por Philip e colaboradores, em 1978. Como foi referido, este é o método recomendado pelo “Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics” para a identificação de um novo agente, isolado de humanos ou de reservatórios animais, que se pressupõe ser uma rickettsia pelas características microbiológicas. Os murganhos foram imunizados experimentalmente com as espécies padrão de rickettsia e com as estirpes de rickettsia a identificar.

O teste de MIF, recorrendo a um teste de imunofluorescência indirecta, baseia-se no facto de que animais imunizados com doses elevadas de rickettsias produzem anticorpos com um título elevado contra os antigénios proteicos de superfície, característicos das espécies, e um título baixo contra os antigénios lipolissacarídeos, característicos do grupo. Trata-se de um método comparativo e fundamenta-se no pressuposto de que

cada soro, embora apresente também reacções com os outros antigénios (reacções heterólogas), irá reagir mais fortemente com o agente que induziu a formação dos anticorpos policlonais no animal (reacções homólogas). Considera-se como título de cada reacção a maior diluição do soro que ainda reage com as rickettsias utilizadas como antigénio, originando emissão de fluorescência. Como todo o teste de imunofluorescência é subjectivo. A leitura das lâminas geralmente é feita, independentemente, por dois observadores e o título considerado é o maior valor que ambos consideram positivos. Os valores dos títulos das reacções de cada soro com as diferentes estirpes de rickettsia são utilizados em cálculos matemáticos para determinar as semelhanças e diferenças entre elas.

Os resultados obtidos com este método são analisados para determinação da denominada diferença específica ("*specific difference - SPD*") entre as diversas rickettsias que se utilizaram no estudo. A diferença específica é calculada com a seguinte fórmula:

$$SPD = (Aa + Bb) - (Ab + Ba)$$

onde:

**SPD** = diferença específica de cada estirpe

**Aa** é o título de anticorpos policlonais obtido na reacção entre o soro do murganho inoculado com a estirpe **A** e o antigénio homólogo **a** e **Bb** é o título de anticorpos policlonais obtido na reacção entre o soro do murganho inoculado com a estirpe **B** e o antigénio homólogo **b** ;

**Ab** é o título de anticorpos policlonais obtido na reacção entre o soro do murganho inoculado com a estirpe **A** e o antigénio heterólogo **b** e **Ba** é o título de anticorpos policlonais obtido na reacção entre o soro do murganho inoculado com a estirpe **B** e o antigénio heterólogo **a**.

Os valores dos títulos são convertidos em números absolutos, em progressão aritmética (p.ex. títulos de 1:16 = 1; 1:32 = 2, etc.) para facilitar os cálculos e ser melhor apreendida as relações entre as estirpes. Os soros com títulos iguais ou menores que 1:8 são considerados negativos e convertidos a zero.

Na comparação de duas estirpes antigenicamente relacionadas os títulos de anticorpos heterólogos são semelhantes aos títulos homólogos e a diferença específica tende para o zero. Na comparação de duas estirpes antigenicamente distintas os títulos heterólogos são mais baixos do que os títulos homólogos e a diferença específica será grande. No trabalho original convencionou-se que se a diferença específica obtida entre duas estir-

pes fosse maior ou igual a 3 considerava-se que eram espécies diferentes e se o valor da diferença específica fosse menor que 3 estas seriam consideradas uma mesma espécie. Os cálculos da diferença específica são apresentados em tabelas de duas entradas, cruzando o soro imune com o antigénio.

Para realizar esta técnica cada estirpe de rickettsia, padrão ou a identificar, foi cultivada em células Vero E6, em frascos plásticos de cultura de 25 ml de capacidade. Todo o procedimento foi realizado em câmara de fluxo laminar. O protocolo seguido foi o seguinte:

- a) 1 ml de células infectadas com rickettsias foi descongelado a 37°C e colocado sobre uma camada de células não infectadas, sem meio de cultura e deixado a adsorver, à temperatura ambiente, durante 30 minutos;
- b) adicionaram-se 5 ml de MEM completo e o frasco foi a incubar a 32°C;
- c) ao fim de 5 dias foi feito o controlo do grau de infecção pelo método de Giménez. Uma cultura celular excelente para os estudos a realizar deve ter um grau de infecção de cerca de 25 rickettsias/célula;
- d) as células infectadas foram suspensas no meio de cultura com esferas de vidro. Uma parte desta suspensão foi inoculada em lotes de murganhos para a produção de anticorpos policlonais e outra parte foi utilizada para produzir antigénio.

Para a produção de anticorpos policlonais procedeu-se do seguinte modo:

- a) cada suspensão foi inoculada intraperitonealmente em lotes de 6 murganhos machos, com aproximadamente 20 g de peso. Cada animal foi imunizado com 0,5 ml de células infectadas suspensas em MEM completo. Os animais receberam uma segunda dose ao fim do 7.º dia para estimular a imunização;
- b) como controlo negativo inoculou-se um lote de animais com células Vero E6 não infectadas;
- c) ao 10.º dia foram anestesiados, sangrados e o soro separado e conservado a -20 °C, até ser utilizado no teste de MIF.

A metodologia de preparação de cada antigénio foi a seguinte:

- a) a suspensão foi sujeita a 3 ciclos de congelamento a -80°C e descongelamento a 37°C, três vezes sucessivas, com o objectivo de romper as células hospedeiras;
- b) foi centrifugada a 500 r.p.m., durante 15 minutos, de modo a depositar os restos celulares;

- c) o sobrenadante foi recolhido para tubos de ultracentrífuga e centrifugado a 10 000 r.p.m., durante 45 minutos, a 4 °C;
- d) o depósito foi suspenso em formalina a 0,1% e a concentração de rickettsias ajustada de modo a obter uma densidade óptica entre 150-240 nm num espectrofotómetro de u.v. (Shimadzu U.V.1203, Kyoto, Japão) a 660 nm;
- e) cada antigénio, mantido em gelo fundente, foi colocado, com o recurso a um capilar de vidro de 1 mm de diâmetro, nos círculos de lâminas teflonadas próprias para IFA. Cada círculo da lâmina conteve tantas gotas de antigénio, colocados como os eixos de uma roda, como o número de soros preparados em murganhos. Isto é, 5 antigénios preparados com as espécies padrão e a estirpe de rickettsia a identificar;
- f) depois de secas ao ar, as lâminas foram fixadas com acetona gelada durante 10 minutos, secas novamente e embrulhadas em papel absorvente e papel de alumínio. Estas lâminas foram conservadas a -80°C até serem utilizadas no MIF.

O protocolo do teste de imunofluorescência foi realizado tal como referido para a detecção de rickettsias na hemolinfa de ixodídeos:

- a) cada soro foi diluído com PBS pH 7,4, na razão de um para dois, e testado a partir da diluição 1:8 até 1:2048;
- b) foram colocados cerca de 50 µl de soro diluído de modo que a gota cobrisse todos os antigénios que estavam no círculo; para cada soro foi preparada uma lâmina;
- c) as lâminas foram incubadas em câmara húmida a 37°C, durante 30 minutos, após este período de tempo o soro foi arrastado por lavagem com PBS pH 7,4, por 2 vezes, durante 10 minutos cada, com agitação magnética;
- d) depois de secas ao ar, foram colocados 50 µl de conjugado fluoresceinado ("*FICT rabbit immunoglobulin to mouse immunoglobulin*", DAKO A/S – Dinamarca) sobre cada círculo e as lâminas foram novamente incubadas;
- e) de seguida foram lavadas e novamente secas, montadas com lamela e glicerina tamponada e observadas, como já descrito.

A reacção das diluições de cada soro foi observada, individualmente, para cada gota de antigénio existente nos círculos da lâmina. O título de cada soro foi determinado para cada antigénio em particular, sendo considerado como a maior diluição que ainda reagiu com emissão de fluorescência com as rickettsias que se encontravam dentro de células intactas, após o processo de produção de antigénio. Os títulos foram convertidos em números absolutos, foram elaboradas as tabelas e realizados os cálculos e a SPD de cada estirpe analisada.

### 3. MICROIMUNOFLUORESCÊNCIA COM SOROS HUMANOS

O método de microimunofluorescência para diferenciar as espécies de rickettsia do grupo das febres exantemáticas pode ser realizado com soros humanos, com os mesmos objectivos descritos no ponto anterior. Considera-se que a infecção primária originaria um título de anticorpos maior com o antigénio que induziu a sua produção (reacção homóloga) do que os títulos detectados com antigénios de outras rickettsias do grupo (reacção heteróloga) existentes na área geográfica em questão (Philip *et al*, 1976).

Foram utilizados 24 soros considerados como positivos, isto é, com imunoglobulinas IgM e IgG contra *R. conorii* (títulos de IgM 1:4; IgG >1:40) e como controlo 10 soros considerados negativos.

Como possíveis agentes indutores da produção de anticorpos escolheram-se 5 estirpes de rickettsias isoladas de ixodídeos durante este estudo e uma espécie padrão, com as quais se produziram os antigénios. A preparação dos antigénios e o teste de IFA foram realizados da maneira descrita anteriormente. Os soros estudados foram diluídos na razão de 1:2 e testados a partir de 1:20. O título limiar de positividade considerado foi 1:40. Foi utilizado o conjugado fluoresceinado anti-imunoglobulinas IgA, IgG, IgM humana, fracções Kappa e Lambda, preparado em coelho (FICT, Dako A/S – Dinamarca). As estirpes estudadas foram as seguintes:

- a) *R. conorii* marroquina ATCC-VR 141
- b) PoTiR1, isolada de *Rhipicephalus sanguineus*
- c) PoTiR4, isolada de *Dermacentor marginatus*
- d) PoTiR8, isolada de *Hyalomma marginatum*
- e) PoTiR11, isolada de *Rhipicephalus turanicus*
- f) PoTiR12, isolada de *Rhipicephalus sanguineus*



V

**Identificação e Classificação Genética  
de Éstirpes de Rickettsias**





## 1. INTRODUÇÃO

A identificação e classificação de estirpes de rickettsias por análise genética é realizada por comparação com espécies padrão. No capítulo anterior foram discriminadas as espécies padrão utilizadas. No estudo para a identificação genética das diferentes estirpes de rickettsias isoladas em Portugal foi utilizada a análise de conjuntos de perfis de segmentos do ácido desoxirribonucleico (ADN), obtidos pela acção de diferentes enzimas de restrição. A obtenção destes conjuntos de perfis implica o seguinte procedimento:

- a) a multiplicação das rickettsias em cultura de células “*in vitro*” e a sua purificação dos componentes das células hospedeiras;
- b) a extracção do ADN das rickettsias;
- c) a amplificação “*in vitro*” de segmentos específicos deste ADN, por uma reacção de síntese em cadeia, mediada pela acção de uma polimerase (“*polimerase chain reaction*” – PCR);
- d) a digestão dos segmentos de ADN, pela acção de enzimas de restrição;
- e) a visualização da posição relativa dos fragmentos obtidos, após electroforese, num gel de agarose ou de poliacrilamida (“*restriction fragment length polymorphism*” – RFLP).

## 2. “PCR - RFLP” NA IDENTIFICAÇÃO DE RICKETTSIAS DO GRUPO DAS FEBRES EXANTEMÁTICAS

Nesta dissertação foi utilizada a metodologia estabelecida por Regnery e colaboradores (1991) com o objectivo de identificar e classificar as estirpes de rickettsias isoladas de ixodídeos ou de sangue humano e cultivadas “*in vitro*” em linhas celulares Vero E6. Esta metodologia compreende 4 passos:

- a) a extração das rickettsias do citoplasma das células hospedeiras e a separação dos componentes celulares;
- b) a extração do ADN total das rickettsias e sua purificação;
- c) a amplificação de um determinado segmento de ADN e a sua digestão com uma enzima de restrição, numa primeira fase ;
- d) a amplificação de outro segmento, numa segunda fase e nova digestão, com três enzimas, individualmente.
- e) obtêm-se assim, para cada estirpe de rickettsia analisada, um conjunto de 4 perfis característicos.

A utilização das técnicas de “PCR/RFLP” para a identificação das rickettsias é relativamente simples e reprodutível. Trabalhos anteriores fornecem padrões de comparação com estirpes de referência e em muitos laboratórios os perfis de restrição das espécies estão informatizados, facilitando a classificação de novas estirpes isoladas. A seguir se descreve o protocolo aplicado neste estudo.

## 2.1. Extração citoplasmática de rickettsias

As estirpes de rickettsia padrão e os microrganismos isolados foram cultivados em células Vero E6, em frascos de cultura de células de 150 ml de capacidade, com MEM completo, nas condições atrás descritas. Para cada estirpe foram cultivados um mínimo de 4 frascos. Quando, após controlo pelo método de Giménez, se verificou que a infecção correspondia a cerca de 25 microrganismos por célula, procedeu-se a separação das rickettsias dos componentes das células hospedeiras:

- a) substituiu-se o meio de cultura por 5 ml de tampão TNE (Tris, pH 7,6 10 mM; NaCl, 150 mM; EDTA, 2 mM);
- b) as células infectadas com rickettsias foram separadas das paredes dos frascos de culturas com esferas de vidro e a suspensão transferida para um tubo de centrifuga;
- c) as rickettsias foram então libertadas das células hospedeiras pela acção de um detergente de membranas, o Triton X-100 (10% v/v a uma concentração final de 0,25%);
- d) os restos celulares, especialmente os núcleos, foram retidos por filtração (filtros de 5  $\mu$  de porosidade, Millipore);
- e) os microrganismos foram inactivados, pela remoção dos lípidos membranares, com um detergente orgânico em solução aquosa (sódio duodecil sulfato-SDS 10% p/v) na concentração final de 0,5% do volume total e os complexos proteínas-ADN foram dissociados pela acção de uma enzima, Proteinase K, a 1% do volume total (0,5 mg/ml, Sigma P-2308) em banho-maria a 50 °C, durante 2 horas, com agitação ocasional;
- f) esta suspensão foi utilizada para extração do ADN.

## 2.2. Extração do ADN de rickettsias

Procedeu-se a seguir à extracção fraccionada do ADN, pelo princípio da dissolução diferenciada dos ácidos em fase aquosa e das proteínas em solventes orgânicos (Sambrook *et al*, 1989):

- a) à suspensão foi adicionado um volume igual de fenol saturado em tampão Tris pH 7,0 e corado com hidroquinona (Sigma);

- b) por agitação constante durante 10 minutos, obteve-se uma emulsão que foi centrifugada a 3000 r.p.m., à temperatura ambiente, durante 15 minutos;
- c) retirou-se a fase aquosa, distinta da fase fenólica de cor amarelada;
- d) adicionou-se a este volume aquoso uma quantidade igual de uma mistura 1:1 de fenol saturado e clorofórmio/álcool isoamílico (4% v/v). Repetiu-se o ciclo de agitação e centrifugação e retirou-se novamente a fase aquosa;
- e) a esta foi adicionado um volume igual de clorofórmio/álcool isoamílico (4% v/v), repetindo-se a agitação por 5 minutos e centrifugação por 10 minutos (o clorofórmio aumenta a eficiência da extração proteica, a sua densidade elevada aumenta a separação das fases, remove os lípidos e o álcool isoamílico é um agente anti-saponificação);
- f) ao último volume recolhido de fase aquosa, foram adicionados dois volumes de álcool etílico absoluto gelado, que vai precipitar o ADN dissolvido na fase aquosa. Esta mistura foi deixada reagir durante pelo menos uma noite, a 4°C;
- g) o ADN precipitado foi separado do álcool por centrifugação a 3000 r.p.m., durante 10 minutos, a 4°C;
- h) o ADN depositado foi lavado, uma primeira vez, com 1 ml de álcool etílico a 70% e outra com o mesmo volume de álcool etílico absoluto;
- i) depois de remover o etanol, o depósito onde se encontrava o ADN foi colocado a secar por evaporação a 37°C, durante uma noite;
- j) o ADN, assim extraído, foi suspenso em 50 µl de tampão Tris 10 mM, pH 8,0 e guardado a 4°C. Este ADN é considerado como tendo uma pureza elevada e pode-se conservar estável durante vários anos.

### 2.3. Amplificação de segmentos do ADN de rickettsias por PCR

A mistura da reacção, para a amplificação do ADN pelo método do PCR, foi feita segundo as instruções dos fornecedores do “*GeneAmp DNA Amplification Kit*” utilizado (Perkin Elmer Cetus). Em resumo, em condições de trabalho estéril (câmara de fluxo laminar) e em banho de gelo, foram colocadas num tubo (Eppendorf 0,5 ml) as quantidades de reagentes necessárias para amplificar uma amostra de ADN alvo:

- a) 53,5 µl de água esterilizada;
- b) 5 µl de cada “*primer*” (concentração final 1,0 mM);
- c) 16 µl de uma mistura das quatro bases nucleotídicas, dATP, dTTP, dCTP, dGTP, (concentração final de 200 mM cada);
- d) 10 µl de tampão (10x concentrado) da enzima;
- e) 0,5 µl da enzima *Ampli Taq* ADN polimerase (2,5 unidades/100ml).

Por último adicionou-se 10 µl do ADN em estudo, obtendo-se um volume total de 100 µl da mistura de reacção. Sobre esta mistura aquosa colocaram-se 2 gotas de óleo mineral para evitar a evaporação. Os tubos foram colocados no aparelho termociclador onde ocorreu a reacção de amplificação (Hyabaid Thermal Reactor 3.15 A A/S).

Neste termociclador a amplificação foi realizada durante 35 ciclos sucessivos compostos de:

- a) desnaturação do ADN à temperatura de 90°C, durante 20 segundos;
- b) emparelhamento dos “*primers*” à temperatura de 48°C, durante 30 segundos;
- c) extensão do segmento de ADN à temperatura de 60°C, processo mediado pela acção da *Taq* polimerase, durante 2 minutos.

O último ciclo (o 35.º) mantém a temperatura de extensão durante 10 minutos, antes de retornar à temperatura ambiente. O tempo total da amplificação, no referido termociclador, foi de cerca de 4 horas.

O par de “*primers*” utilizados na primeira amplificação deriva de duas regiões do gene que codifica a enzima citrato sintetase, sequenciado a partir de *Rickettsia prowazekii*. O par utilizado na segunda amplificação, foi desenhado a partir de regiões do gene que codifica a proteína antigénica de 190 kDa, sequenciado de *R.rickettsii*. A descrição destas regiões do genoma destas rickettsias foram referidas no capítulo sobre a classificação genética de rickettsias. A sequência nucleotídica dos referidos “*primers*” pode ser observada na tabela VII.

Após o fim da reacção de “PCR” a existência de ADN amplificado foi verificada por electroforese, em gel de agarose (1,5% p/v), em tampão TBE pH 8,0 (Tris-Borato 0,045 M, EDTA 0,001 M), num aparelho de electroforese horizontal (Hyabaid). Os poços de aplicação da amostra foram feitos com um pente de dentes de 2 mm ou 4 mm de largura. O gel foi submerso no tampão TBE contendo 50 µl/l de brometo de etídeo (10 mg/ml).

De cada ADN amplificado retiraram-se 8 µl da mistura de reacção do “PCR” e adicionou-se 1 µl de uma substância corante com densidade maior que a da água (Sambrook *et al*, 1989). Esta mistura foi colocada no poço do gel. A electroforese processou-se a 50 V e 300 mA, durante 20 minutos, e depois a 100 V até completar cerca de uma hora, com uma fonte de alimentação EPS 600 (“*Electrophoresis power supply*” – Pharmacia). O gel foi colocado num aparelho transiluminador (“*Ultraviolet Transilluminator*” UVP, model TM-15 E, 220-240 V, 50Hz, 80 Amps) e a presença de ADN foi verificada e fotografada (filme Polaroid 665, câmara Polaroid D534, montada num cone Polaroid 0,7X, 1700D).

**Tabela VII. Sequência das bases dos oligonucleotídeos sintéticos (“primers”) utilizados para a multiplicação do ADN de rickettsias**

Primer	Espécie	Gene	Sequência nucleotídica (5'-3')	Produto (bp)
RpCS.877p	<i>R. prowazekii</i>	citrate sintetase	GGGGGCCTGCTCACGGCGG	381
RpCS.1258n	<i>R. prowazekii</i>	citrate sintetase	ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	
Rr190.70p	<i>R. rickettsii</i>	190-kDa	ATGGCGAATATTTCTCCAAA	532
Rr190.602n	<i>R. rickettsii</i>	190-kDa	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	

bp = pares de bases

#### 2.4. “RFLP” dos segmentos de ADN das rickettsias amplificados por “PCR”

O ADN amplificado com o par de “primers” derivado da citrate sintetase foi digerido com a enzima *Alu I*. Os perfis de restrição obtidos permitiram confirmar a inclusão dos microrganismos no género *Rickettsia*.

Apenas as rickettsias do grupo das febres exantemáticas têm o seu ADN amplificado pelo par de “primers” derivado do gene “190 kDa”. Para cada ADN amplificado foram obtidos três perfis de restrição:

- a) um com a enzima *Alu I*;
- b) o segundo com *Pst I*;
- c) e outro, com *Rsa I*.

A origem e local de actuação das enzimas utilizadas estão referidos na tabela VIII.

De cada ADN amplificado prepararam-se amostras de 8 µl a que se juntaram, individualmente, 1 µl de uma das enzimas e 1 µl do tampão específico. As amostras foram colocadas em banho-maria, a 37°C, durante uma hora, com agitação ocasional. Após a digestão do segmento do gene amplificado, adicionou-se 1 µl de RNase (Sigma) a fim de destruir os ácidos ribonucleicos existentes na mistura de reacção e 1-2 µl da substância corante.

**Tabela VIII. Endonucleases de restrição utilizadas para “RFLP” de rickettsias**

Enzima*	Microrganismo	Local de restrição <sup>1</sup>
<i>Alu</i> I	<i>Athrobacter luteus</i>	5' ...AG <sup>I</sup> CT... 3'
	(ATCC 21606)	3' ... TC <sup>I</sup> GA.... 5'
<i>Rsa</i> I	<i>Rhodopseudomonas sphaeroides</i>	5' ...GT <sup>I</sup> AC... 3'
	(S. Kaplan)	3' ...CA <sup>I</sup> TG... 5'
<i>Pst</i> I	<i>Providencia stuartii</i> clonada em	5'... CTGCA <sup>I</sup> G ... 3'
	<i>E. coli</i>	3' ... G <sup>I</sup> ACGTC... 5'

\* New England BioLabs®

Os produtos destas digestões foram separados por electroforese em gel de poliacrilamida (6% v/v, com 1,5 mm de espessura – Novex, USA), em tampão TBE, durante 1 hora, a 100 volts. Após este tempo o gel foi corado com brometo de etídeo, visualizado com luz ultra-violeta (365 nm) e fotografado. O tamanho dos fragmentos de ADN (número de pares de bases nucleotídicas ou “*base pairs*” – bp) foi calculado em relação a um ADN marcador,  $\phi$ X174, digerido com a enzima de restrição *Hinf* I (New England BioLabs).

As semelhanças encontradas entre os perfis de restrição dos diferentes microrganismos e das espécies padrão foram estimadas pelo número de segmentos co-migrantes. A fracção dos fragmentos co-migrantes para dois ADNs digeridos foi definido como o número de bandas dos dois ADNs que apresentam as mesmas características migratórias.

## **VI**

# **Microscopia Electrónica de Transmissão de Estirpes de Rickettsias Isoladas em Portugal**





Algumas estirpes de rickettsia foram estudadas por microscopia electrónica de transmissão (TME), com o objectivo de determinar a sua ultraestrutura e obter um melhor conhecimento do ciclo de infecção na célula hospedeira. Os estudos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Experimental do Instituto Nacional de Saúde, em Lisboa, sob a orientação da Dr<sup>a</sup>. Susana Franca.

As rickettsias foram cultivadas em células Vero E6 em frascos de 25ml de capacidade, da maneira mencionada anteriormente. Foram preparadas três séries de frascos com cada estirpe estudada. Para o estudo do ciclo de infecção celular as estirpes foram fixadas ao fim de 24 horas, 72 horas e 5 dias após a inoculação das células hospedeiras. Para observação da ultraestrutura das bactérias foram utilizadas células infectadas, há 5 ou mais dias. Como controlo foram utilizadas células Vero E6 não infectadas com o mesmo tempo de inoculação.

O procedimento de preparação do material a ser submetido a TME foi o seguinte:

- a) a camada de células infectadas com rickettsias foi lavada com PBS pH 7,4, por três vezes, após a remoção do MEM completo;
- b) a pré-fixação foi feita com glutaraldeído (GTA) a 1% em PBS pH 7,4, durante 10 minutos;
- c) as células foram raspadas cuidadosamente da parede do frasco e levantadas no GTA;
- d) a suspensão foi centrifugada a 3000 r.p.m., durante 15 minutos, a 4°C;
- e) o depósito foi fixado com GTA a 3% em PBS pH 7,4, com agitação ocasional, durante uma hora e a temperatura mantida a 4°C em gelo fundente;
- f) o fixador foi retirado por centrifugação a 3000 r.p.m., durante 2 segundos e as células lavadas com PBS pH 7,4 por duas vezes, 10 minutos cada, em gelo fundente;
- g) centrifugou-se novamente e o depósito foi post-fixado com tetróxido de ósmio (OsO<sub>4</sub>) a 1% em PBS pH 7,4, a 4°C, durante uma noite. Este fixador foi retirado por lavagens sucessivas com PBS e por fim com água bidestilada;
- h) o depósito foi então submetido à desidratação por métodos convencionais (série de álcoois: 30%, 50%, 70%, 95%), durante 20 minutos em cada passagem, à temperatura ambiente. Finalmente foi feita uma última passagem por álcool absoluto, três vezes, durante 15 minutos cada. De cada vez o álcool foi removido por centrifugação a 3000 r.p.m., durante 2 segundos;
- i) procedeu-se à fase de penetração com uma mistura de 2 volumes de álcool absoluto para um volume de resina Spurr (Spurr, 1969), durante uma hora. Em seguida juntou-se 1 volume de uma mistura 1:1 de álcool absoluto/Spurr, durante 2 horas e, por fim, foi feita a inclusão das células infectadas em Spurr a 100%, trocando-se a resina a cada 3 horas, por três vezes;

j) após este passo, colocou-se a amostra em moldes “cápsulas Beem” para polimerização da resina (24 horas, a 60°C).

As secções ultrafinas foram cortadas com um ultramicroscópio LKB, com faca de diamante. Prepararam-se os cortes com aproximadamente 700 Å de espessura que foram colocados em grelhas de cobre. O contraste das secções foi efectuado pelo método tradicional (acetato de uranilo durante 30 minutos/citrato de chumbo durante 3 minutos). A observação foi feita num microscópio electrónico de transmissão tipo Philips TEM 301.

## **VII**

### **Seroepidemiologia**



## 1. PESQUISA DE ANTICORPOS EM SOROS HUMANOS

Os soros humanos foram estudados pela técnica de imunofluorescência indirecta (IFA), tal como descrita. O limiar de positividade desta técnica, determinado para a população portuguesa, no Laboratório de Rickettsias do CEVDI, é o título de  $\geq 1:40$  para IgM e de  $\geq 1/64$  para IgA, M, G.

Todos os soros recebidos no CEVDI foram submetidos ao rastreio com antígenos de *R. conorii*, *R. typhi* e *Ehrlichia chaffensis* e o conjugado IgA,M,G anti-humano (FICT-DAKO A/S, Dinamarca). Os antígenos das rickettsias foram preparados no laboratório pela técnica descrita anteriormente. Os soros foram inactivados a 56°C durante 30 minutos e depois diluídos a 1:64 e 1:128 com PBS pH 7,4. Quando foi considerado necessário, pesquisou-se a presença de IgM com o conjugado “*rabbit anti-human IgM FITC*” (DAKO A/S Dinamarca).

Para diagnóstico, os critérios indicativos de doença activa são a presença de IgM numa única amostra de soro, ou um título de imunoglobulinas totais  $\geq 1/256$  em uma única amostra, ou a variação de título de pelo menos 4 vezes em pelo menos duas amostras de soro. O título de 1/128 indica uma infecção em tempo não determinado. Os valores abaixo deste título são sugestivos de uma possível infecção e é pedida uma nova amostra de soro para estudar a cinética dos anticorpos.

Nos estudos de seroepidemiologia e nos casos de isolamento de rickettsias a partir do sangue foi determinado o título final do soro. Os soros recebidos para diagnóstico também foram titulados quando tal foi solicitado.

## 2. ESTUDO SEROLÓGICO DE CÃES

Os cães foram sangrados na veia femural sendo retirados 5 ml de sangue. O soro foi separado e conservado a -20 °C até a realização da prova de IFA pelo protocolo referido. Os soros foram diluídos a 1:64 e os positivos a esta diluição foram titulados. O título de 1:64 foi escolhido como limiar por ser referido na literatura especializada e utilizado nos centros de referência da OMS para estudos de rickettsioses em canídeos. O conjugado fluorescente utilizado foi o “*anti-dog IgG FICT*” (Sigma Immunochemicals).

### 3. ESTUDO SEROLÓGICO DE MICROMAMÍFEROS

O sangue dos animais foi colhido ou por punção cardíaca ou com tubos capilares na veia do olho ou recorrendo ao uso de papel de filtro de 18 mm. de diâmetro (Schleicher & Schuell, Alemanha). Neste último caso considerou-se que cada disco absorveu cerca de 80 µl de sangue o que equivaleria a aproximadamente 50µl de soro. Os discos depois de secos foram mergulhados em PBS pH 7,4, pelo menos por 1 hora, e a diluição inicial foi considerada ser 1:10. As amostras foram conservadas a -20°C até à realização da prova.

Para o teste de IFA a diluição inicial dos soros foi 1:16 e só foram considerados positivos a partir da diluição de 1:32. Estes títulos foram escolhidos pelas mesmas razões apontadas para os canídeos. Os conjugados fluoresceinados utilizados foram “*sheep anti-rat IgG (Fc) FICT*” (Serotec, Oxford, Inglaterra) para estudar os soros das ratazanas e “*fluorescein- conjugated rabbit immunoglobulin to mouse immunoglobulin*” (DAKO A/S Dinamarca) para os outros roedores.

# **RESULTADOS**





# **I**

## **Resultados de Análise dos Ixodídeos Capturados**



Nesta dissertação são apresentados os resultados dos estudos efectuados com os ixodídeos capturados entre os anos de 1991 e 1995. Como pode ser observado na tabela IX, foram capturados 6276 exemplares, pertencendo a 6 géneros e a 17 espécies de Ixodidae. A classificação específica foi realizada no Laboratório de Parasitologia do CEVDI pela Dr.<sup>a</sup> M. Sofia Núncio. O número de ixodídeos capturados, por ano de estudo, não sofreu grande variação e o sexo dos exemplares não foi apresentado por não ter havido grandes diferenças no total estudado. Os estudos foram realizados, maioritariamente, com artrópodos adultos, embora durante o período de tempo em que decorreu este trabalho também tivessem sido capturados ixodídeos nos estadios larval e ninfal. Apenas foram utilizados os exemplares de estadios intermédios capturados em roedores por, nestes possíveis reservatórios de rickettsias, não terem sido encontrados espécimes adultos. A utilização de exemplares adultos é preferível porque quando sofrem a amputação da parte distal da pata, fornecem hemolinfa em quantidade suficiente para a visualização de microrganismos e ainda para utilização no isolamento por "shell-vial". A mortalidade dos estadios imaturos é maior e o manuseamento é mais delicado pois, quando pressionados pela pinça, facilmente se rompem alguns órgãos, tais como as glândulas salivares, traqueias e intestino, contaminando a hemolinfa. A espécie de ixodídeo melhor representada neste estudo foi *Rhipicephalus sanguineus* com uma percentagem de aproximadamente 50% do total da amostra dos ixodídeos capturados.

**Tabela IX. Ixodídeos capturados para pesquisa de rickettsias**

Espécie	1991	1992	1993	1994	1995	Total	
	n	n	n	n	n	Σn	%
<i>Boophilus annulatus</i>	0	36	0	0	0	36	0,57
<i>Dermacentor marginatus</i>	232	303	80	308	55	978	15,60
<i>D. pictus</i>	0	0	10	0	7	17	0,27
<i>Haemaphysalis inermis</i>	0	0	1	0	0	1	0,01
<i>H. punctata</i>	119	23	0	4	0	146	2,33
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	80	1	52	2	22	157	2,50
<i>H. marginatum</i>	40	167	81	6	1	295	4,70
<i>Ixodes bivari</i>	0	0	19	1	2	22	0,35
<i>I. hexagonus</i>	0	0	4	13	0	17	0,27
<i>I. ricinus</i>	11	22	43	44	29	149	2,37
<i>I. simplex</i>	4	2	0	0	0	6	0,09
<i>I. ventalloi</i>	0	0	1	2	4	7	0,11
<i>I. vespertilionis</i>	1	13	0	0	0	14	0,22
<i>Rhipicephalus bursa</i>	322	65	59	22	0	468	7,46
<i>R. pusillus</i>	51	111	132	192	326	812	12,95
<i>R. sanguineus</i>	723	764	390	520	268	2665	42,50
<i>R. turanicus</i>	185	103	67	55	76	486	7,75
<b>Σ Total</b>	<b>1768</b>	<b>1610</b>	<b>939</b>	<b>1169</b>	<b>790</b>	<b>6276</b>	<b>100</b>

Para o estudo dos ixodídeos em hospedeiros vertebrados foi estabelecido um programa, de modo que os animais domésticos foram mais pesquisados nos dois primeiros anos de amostragem, os animais silváticos nos dois anos a seguir e no último ano as capturas foram aleatórias. Os dados referentes a estes estudos podem ser observados na tabela X. Embora não sejam considerados hospedeiros, no sentido estrito do termo, com o objetivo de facilitar a leitura dos resultados, nesta tabela foram incluídos os ixodídeos capturados na vegetação e em habitações. Na generalidade, os resultados encontraram-se de acordo com o que é conhecido para a ixodofauna portuguesa, embora algumas das espécies de ixodídeos fossem capturadas pela primeira vez em determinados hospedeiros (Santos-Silva *et al*, env. publicação). A leitura dos resultados deve ter em conta que as capturas foram orientadas para determinado hospedeiro, local e época; sempre que se encontrou um foco de ixodídeos com rickettsias, este foi explorado mais sistematicamente do que outros. Ainda foi comum a infestação por ixodídeos ocorrer “em mosaico”, isto é, apenas se encontrar um vertebrado parasitado entre vários na mesma área de captura ou no caso de um trilho, de um dos lados serem capturados ixodídeos na vegetação e do outro não se encontrarem exemplares.

O Homem foi encontrado, esporadicamente, como hospedeiro de ixodídeos. As espécies encontradas a parasitá-lo foram: *Ixodes ricinus* com 3 exemplares; *Rhipicephalus sanguineus* com 2 exemplares, *Hyalomma marginatum* e *Dermacentor marginatus*, com um exemplar cada.

Na vegetação, pelo método da bandeira, foram capturados 1375 ixodídeos, correspondendo a cerca de 22,0% do total da amostra estudada. As espécies capturadas com maior frequência foram *D. marginatus*, com 642 exemplares (46,5%) e *R. sanguineus*, com 550 exemplares (40%). Também *Hyalomma lusitanicum*, conhecida por parasitar grandes mamíferos, foi recolhida da vegetação com maior frequência. Foram capturados em fase de vida livre 70% do total dos exemplares estudados desta espécie (n = 157). Por outro lado, alguns exemplares de *R. sanguineus* (n = 64) e de *H. marginatum* (n = 2) foram capturados, em habitações, por debaixo da tinta das paredes quando em diapausa e em áreas cimentadas, deslocando-se activamente. *R. sanguineus*, algumas vezes foi capturada sob a casca de árvores, geralmente em locais próximos de abrigos de cães.

Quanto aos exemplares capturados sobre vertebrados observou-se a seguinte distribuição:

- a) em animais domésticos foram capturados 3910 ixodídeos (62% da amostra total) sendo que em cães e em bovinos, foram capturados 2443 e 1241 exemplares respectivamente. O restante foi capturado em ovinos, caprinos e equídeos;
- b) foram retirados 938 exemplares (15% da amostra total) de 14 espécies de animais silváticos: raposa (*Vulpes vulpes*), javali (*Sus scrofa*), lobo ibérico (*Canis lupus*),

lebre (*Lepus capensis*), toirão (*Mustela putorius*), gineta (*Genetta genetta*), coelho-bravo (*Oryctolagus cuniculus*), ouriço-caxeiro (*Erinaceus europaeus*), morcego-rato (*Myotis myotis*), sacarrabos (*Herpestis ichneumon*), morcego-lanudo (*Miniopterus schreibersii*), ratazana-castanha (*Rattus norvegicus*), doninha (*Mustela nivalis*) e furão (*Mustela furo*).

*R. sanguineus*, apesar de ter sido encontrada a parasitar a maior variedade de espécies de hospedeiros, é por excelência a carraça do cão (*Canis familiaris*), tendo sido capturados neste animal 1645 (62%) exemplares. Em seguida, como hospedeiros, encontraram-se a raposa e os bovinos (*Bos taurus*) com percentagens de 7,2% e 4,7%, respectivamente. Nesta amostragem, também *R. turanicus* e *R. pusillus* foram encontradas com grande frequência a parasitar o cão (64% e 54,5%, respectivamente), e esta última ainda foi capturada em grande percentagem (35,4%) em raposas.

*D. marginatus* confirmou-se como uma espécie da ixodofauna portuguesa que parasita, preferencialmente, os grandes mamíferos (bovinos, 19,80% e o javali, 11,25%). Os espécimens de *R. bursa*, *H. marginatum* e *H. punctata*, também foram capturados durante este estudo, essencialmente em bovinos, com percentagens de 98%, 94,5% e 83%, respectivamente.

*I. ricinus* foi capturada, preferencialmente, em carnívoros (88 exemplares – 59%). De raposas foram retirados 40,26% dos exemplares estudados, e do cão 19%. Ainda foi capturada com relativa frequência na vegetação (26%).

*I. hexagonus* foi encontrada exclusivamente a parasitar mamíferos silváticos (gineta, furão, toirão e raposa) e *D. pictus* foi capturado no cão e no lobo.

Segundo a literatura, algumas espécies de ixodídeos têm uma preferência restrita pelo hospedeiro, como é o caso dos que parasitam os morcegos, o que foi confirmado com *I. vespertilionis* e *I. simplex*. *I. ventalloi*, parasita da doninha, foi capturada nos estádios intermediários na ratazana castanha.

*B. annulatus* foi capturada unicamente nos seus hospedeiros preferenciais, os bovinos. Por último, *I. bivari*, espécie conhecida como parasita do coelho-bravo, foi encontrada também na vegetação e em outros mamíferos silváticos, nomeadamente a gineta e o sacarrabos.

**Tabela X. Distribuição anual por hospedeiro do total de ixodídeos capturados**

Espécie	Hospedeiro	1991	1992	1993	1994	1995	Total	
		n	n	n	n	n	Σn	Σespécie
<i>B. annulatus</i>	<i>Bos taurus</i>	0	36	0	0	0	36	<b>36</b>
<i>D. marginatus</i>	<i>Bos taurus</i>	65	127	1	0	0	193	
	<i>Canis lupus</i>	0	6	1	0	0	7	
	<i>Equus caballus</i>	0	18	4	0	0	22	
	<i>Homo sapiens</i>	0	0	0	1	0	1	
	<i>Sus scrofa</i>	1	0	15	94	0	110	
	<i>Vulpes vulpes</i>	0	0	3	0	0	3	
	Vegetação	166	152	56	213	55	642	<b>978</b>
<i>D. pictus</i>	<i>Canis familiaris</i>	0	0	3	0	4	7	
	<i>Canis lupus</i>	0	0	7	0	3	10	<b>17</b>
<i>H. inermis</i>	Vegetação	0	0	1	0	0	1	<b>1</b>
<i>H. punctata</i>	<i>Bos taurus</i>	119	0	0	0	0	119	
	<i>Lepus capensis</i>	0	23	0	0	0	23	
	<i>Vulpes vulpes</i>	0	0	0	3	0	3	
	Vegetação	0	0	0	1	0	1	<b>146</b>
<i>H. lusitanicum</i>	<i>Bos taurus</i>	0	0	17	0	0	17	
	<i>Ovies aries</i>	0	0	0	0	22	22	
	<i>Sus scrofa</i>	7	0	0	0	0	7	
	Vegetação	73	1	35	2	0	111	<b>157</b>
<i>H. marginatum</i>	<i>Bos taurus</i>	38	166	73	2	0	279	
	<i>Equus caballus</i>	0	0	0	2	0	2	
	Habituação	0	0	1	1	0	2	
	<i>Homo sapiens</i>	0	0	1	0	0	1	
	<i>Ovies aries</i>	0	1	0	0	0	1	
	<i>Sus scrofa</i>	0	0	5	0	0	5	
	Vegetação	2	0	1	1	1	5	<b>295</b>
<i>I. bivari</i>	<i>Genetta genetta</i>	0	0	5	1	0	6	
	<i>Herpestes ichneumon</i>	0	0	0	0	2	2	
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0	0	12	0	0	12	
	Vegetação	0	0	2	0	0	2	<b>22</b>
<i>I. hexagonus</i>	<i>Genetta genetta</i>	0	0	1	0	0	1	
	<i>Mustela furo</i>	0	0	1	0	0	1	
	<i>Mustela putorius</i>	0	0	0	12	0	12	
	<i>Vulpes vulpes</i>	0	0	2	1	0	3	<b>17</b>
<i>I. ricinus</i>	<i>Bos taurus</i>	0	5	0	0	0	5	
	<i>Canis familiaris</i>	0	0	0	3	25	28	
	<i>Homo sapiens</i>	2	1	0	0	0	3	
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0	0	0	2	0	2	
	<i>Sus scrofa</i>	0	0	8	4	0	12	
	<i>Vulpes vulpes</i>	0	0	32	28	0	60	
	Vegetação	9	16	3	7	4	39	<b>149</b>

continua...

...continuação

**Tabela X. Distribuição anual por hospedeiro do total de ixodídeos capturados**

Espécie	Hospedeiro	1991	1992	1993	1994	1995	Total	
		n	n	n	n	n	Σn	Σespécie
<i>I. simplex</i>	<i>Miniopterus schreibersi</i>	4	2	0	0	0	6	6
<i>I. ventalloi</i>	<i>Mustela nivalis</i>	0	0	1	2	0	3	
	<i>Rattus norvegicus</i>	0	0	0	0	4	4	7
<i>I. vespertilionis</i>	<i>Myotis myotis</i>	1	13	0	0	0	14	14
<i>R. bursa</i>	<i>Bos taurus</i>	322	65	50	20	0	457	
	<i>Canis familiaris</i>	0	0	8	0	0	8	
	<i>Canis lupus</i>	0	0	1	0	0	1	
	Vegetação	0	0	0	2	0	2	468
<i>R. pusillus</i>	<i>Canis familiaris</i>	50	69	0	2	323	444	
	<i>Canis lupus</i>	0	32	0	0	0	32	
	<i>Erinaceus europaeus</i>	0	2	0	1	0	3	
	<i>Genetta genetta</i>	0	0	6	11	2	19	
	<i>Herpestes ichneumon</i>	0	0	2	1	1	4	
	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	0	8	1	0	0	9	
	<i>Vulpes vulpes</i>	0	0	123	164	0	287	
	<i>Mustela putorius</i>	0	0	0	13	0	13	
	Vegetação	1	0	0	0	0	1	812
<i>R. sanguineus</i>	<i>Bos taurus</i>	8	64	53	0	1	126	
	<i>Canis familiaris</i>	435	561	7	435	207	1645	
	<i>Canis lupus</i>	0	1	0	0	8	9	
	<i>Erinaceus europaeus</i>	0	2	0	4	8	14	
	<i>Mustela furo</i>	0	0	1	0	0	1	
	<i>Genetta genetta</i>	0	0	1	0	0	1	
	Habituação	0	64	0	0	0	64	
	<i>Herpestes ichneumon</i>	0	0	2	0	0	2	
	<i>Homo sapiens</i>	1	0	0	0	1	2	
	<i>Lepus capensis</i>	0	0	19	0	0	19	
	<i>Ovis aries</i>	39	0	0	0	0	39	
	<i>Vulpes vulpes</i>	0	0	125	67	0	192	
	<i>Mustela putorius</i>	0	0	0	1	0	1	
	Vegetação	240	72	182	13	43	550	2665
<i>R. turanicus</i>	<i>Bos taurus</i>	1	4	4	0	0	9	
	<i>Capra hircus</i>	0	0	49	0	3	52	
	<i>Canis familiaris</i>	148	76	9	26	52	311	
	<i>Genetta genetta</i>	0	0	1	0	0	1	
	<i>Ovis aries</i>	31	15	0	4	18	68	
	<i>Vulpes vulpes</i>	0	0	4	8	0	12	
	<i>Mustela putorius</i>	0	0	0	12	0	12	
	Vegetação	5	8	0	5	3	21	486
<b>ΣTotal</b>		<b>1768</b>	<b>1160</b>	<b>939</b>	<b>1169</b>	<b>790</b>	<b>6276</b>	





## **II**

### **Resultados do Teste dos Hemócitos**



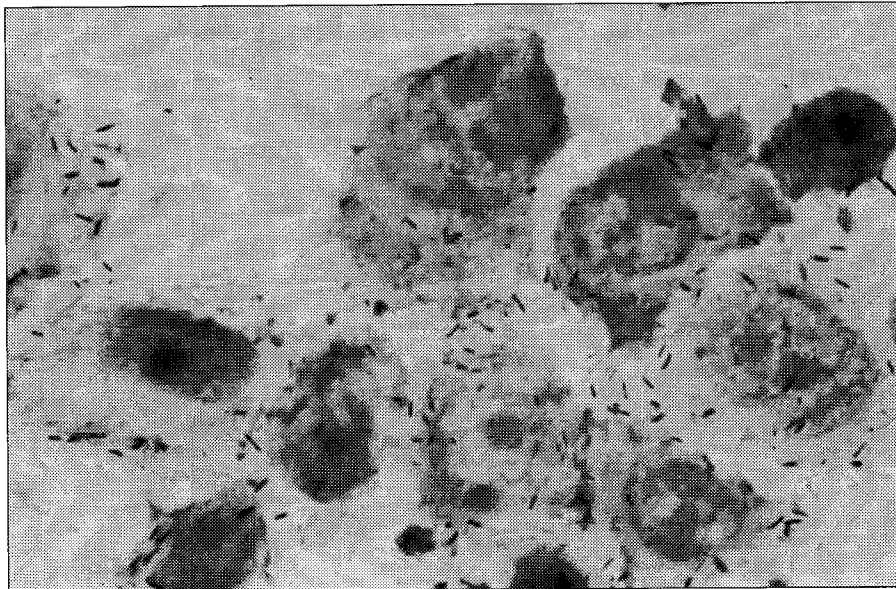
Do total de 6276 ixodídeos capturados, 4637 exemplares foram examinados pelo teste dos hemócitos, valor a que corresponde 74% da amostra. Os restantes artrópodos não foram incluídos no estudo por várias razões: alguns encontravam-se danificados, mortos ou, no entanto, morreram; outros foram utilizados para isolamentos de borrélias ou de vírus. Além disso, alguns exemplares foram conservados para a carraçoteca e outros foram utilizados para estabelecer o ciclo de vida da espécie em laboratório. Com exceção de *I. vespertilionis*, exemplares de todas as espécies foram analisadas pelo teste dos hemócitos.

Em 157 (3,4%) exemplares de ixodídeos foram observados microrganismos semelhantes à rickettsias na hemolinfa, tanto com a coloração de Gimenez como por IFA (Fig. 11). Na tabela XI encontram-se os dados relativos às espécies estudadas, o número de ixodídeos parasitados de cada espécie, a respectiva prevalência (apresentada como percentagem de positivos) e a taxa de parasitação. Esta foi calculada como sendo o número de exemplares positivos de uma dada espécie dividido pelo número total de ixodídeos positivos desta amostra e fornece uma estimativa da importância da espécie como reservatório de rickettsias, numa determinada amostragem (Rehacek e Urvolgyi, 1978). Refira-se que a prevalência de ixodídeos parasitados com rickettsias sofreu influências de vários factores, nomeadamente:

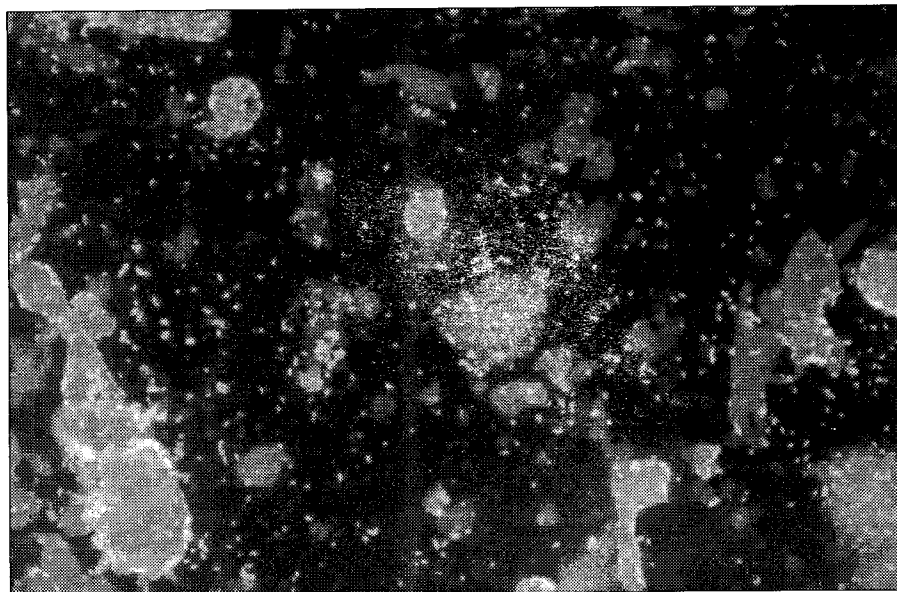
- a) a espécie de ixodídeo analisada (resistência, maneabilidade, tamanho);
- b) o biotopo onde foram capturados (tipo de vegetação, grau de humidade);
- c) o hospedeiro;
- d) o estado fisiológico do exemplar (ingurgitado ou não).

Nas espécies *B. annulatus*, *D. pictus*, *H. inermis*, *H. lusitanicum*, *I. bivari*, *I. simplex* e *R. bursa* não se observaram microrganismos semelhantes à rickettsias na hemolinfa. Porém, devido ao pequeno número de exemplares estudados não se pode concluir acerca da sua parasitação.

Neste estudo *D. marginatus* e *R. sanguineus* foram as espécies com maior taxa de parasitação (cerca de 25,0%), contudo a percentagem de exemplares positivos no total da amostragem foi de apenas 5,5% e 1,8%, respectivamente. *H. marginatum* foi encontrado com uma percentagem elevada de exemplares positivos (17%) e com uma alta taxa de parasitação (21%). *I. ricinus*, uma das espécies de ixodídeos conhecida pelo papel vectorial que desempenha em muitas patologias humanas e animais, ocupou o terceiro lugar em exemplares positivos (17%) com uma taxa de parasitação ainda importante (12,2%). *R. turanicus* resultou com uma taxa de parasitação considerável (8,3%). Por outro lado, embora os exemplares de *I. hexagonus*, tivessem uma das mais altas incidência de rickettsias na hemolinfa (29,5%) a taxa de parasitação da espécie foi apenas de 3,2%. A taxa de parasitação das outras espécies também foi desta ordem de grandeza.



*Figura 11a.* Rickettsias na hemolinfa de ixodídeo.  
Coloração de Giménez



*Figura 11b.* Rickettsias na hemolinfa de ixodídeo.  
IFA

**Tabela XI. Ixodídeos com microrganismos semelhantes à rickettsias na hemolinfa**

Espécie	Total estudado por HT	Total positivo		Taxa de parasitação
	n	n	%	%
<i>Boophilus annulatus</i>	36	0	-	-
<i>Dermacentor marginatus</i>	716	39	5,5	25,0
<i>D. pictus</i>	10	0	-	-
<i>Haemaphysalis inermis</i>	1	0	-	-
<i>H. punctata</i>	92	5	5,5	3,2
<i>Hyalomma lusitanicum</i>	130	0	-	-
<i>H. marginatum</i>	294	33	11,2	21,2
<i>Ixodes bivari</i>	20	0	-	-
<i>I. hexagonus</i>	17	5	29,5	3,2
<i>I. ricinus</i>	111	19	17,0	12,2
<i>I. simplex</i>	6	0	-	-
<i>I. ventraloi</i>	4	4	100	2,6
<i>Rhipicephalus bursa</i>	147	0	-	-
<i>R. pusillus</i>	485	1	0	0,6
<i>R. sanguineus</i>	2207	38	1,8	24,3
<i>R. turanicus</i>	361	13	3,6	8,3
<b>ΣTotal</b>	4637	157	3,4	

Quanto a *R. pusillus*, apenas 50% dos exemplares capturados foram estudados pelo teste dos hemócitos, devido ao tamanho reduzido da espécie e a alta mortalidade resultantes das manipulações. Desta espécie, apenas um exemplar foi considerado positivo. O grande número de exemplares negativos resultou, provavelmente, da contaminação da hemolinfa com conteúdo intestinal, facto que mascarou a existência de rickettsias.

Refira-se ainda que, ao longo dos anos de estudo, foi sempre possível capturar na vegetação, na área da Marateca, exemplares de *D. marginatus* parasitados com rickettsias.



### **III**

## **Resultados do Isolamento de Rickettsias por “Shell Vial”**





## 1. IXODÍDEOS

Os resultados apresentados na tabela XII foram os obtidos com os ixodídeos submetidos ao processo de isolamento dos microrganismos semelhantes à rickettsias pelo método do “shell vial”. Ainda se podem observar os dados referentes ao número de estirpes isoladas, de culturas negativas e contaminadas, bem como as respectivas percentagens em relação ao total dos artrópodos utilizado no estudo.

**Tabela XII. Isolamento de rickettsias pelo método de “shell vial”**

Espécie	Estirpes isoladas		Cultura negativa		Cultura contaminada*		Total positivo
	n	%	n	%	n	%n	
<i>Dermacentor marginatus</i>	21	13,5	15	9,7	3	1,9	39
<i>Haemaphysalis punctata</i>	0	0	4	2,5	1	0,6	5
<i>Hyalomma marginatum</i>	1	0,6	28	18,0	4	2,5	33
<i>Ixodes hexagonus</i>	0	0	5	3,2	0	0	5
<i>I. ricinus</i>	1	0,6	16	10,2	2	1,3	19
<i>I. ventalloi</i>	1	0,6	2	1,3	0	0	4
<i>Rhipicephalus pusillus</i>	0	0	1	0,6	0	0	1
<i>R. sanguineus</i>	10	7,0	18	11,5	9	5,7	38
<i>R. turanicus</i>	6	4,0	7	4,5	0	0	13
<b>ΣTotal</b>	<b>41</b>	<b>26,3</b>	<b>96</b>	<b>61,5</b>	<b>19</b>	<b>12,2</b>	<b>157</b>

\*cultura contaminada = crescimento de outras bactérias e/ou fungos

Dos 157 exemplares de ixodídeos submetidos ao método do “shell vial” foram isoladas de 41 estirpes de microrganismos. A taxa de sucesso desta técnica, neste estudo, foi de 26,3%. As estirpes isoladas foram denominadas PoTiR = “Portugal Tick Rickettsia”, com o número correspondente a ordem por que foram caracterizadas.

Os dados (espécie, sexo, hospedeiro, local e data de captura) referentes aos ixodídeos a partir dos quais foram isoladas as estirpes de rickettsia podem ser observados na tabela XIII. De *D. marginatus* parasitados isolaram-se 21 estirpes, o que corresponde a 55% de sucesso nas tentativas de isolamento. De *R. sanguineus* foram obtidas 11 estirpes (27,0%), de *R. turanicus* 6 (46,0%), e de *H. marginatum*, *I. ricinus* e *I. ventalloi* uma estirpe cada (3,0%, 5,2%, 33,3%, respectivamente).

Dos ixodídeos capturados na vegetação foram isoladas 16 estirpes (cerca de 40%), sendo 13 (81%) obtidas de *D. marginatus* capturados numa mesma área (Marateca), embora em épocas diferentes.

Dos animais silváticos, apesar de pesquisados em menor número do que o efectivo de animais domésticos e, por consequência, responsáveis por uma contribuição menor pelo total de exemplares de ixodídeos capturados, foram isoladas 10 estirpes (cerca de 25%).

Como foi referido foram obtidas 11 estirpes a partir de *R. sanguineus*. A maior parte foi isolada de ixodídeos ingurgitados (73%), tendo 5 estirpes sido obtidas de exemplares capturados em cães. De *H. marginatum*, embora com uma taxa de parasitação alta (21,2%) e percentagem de positivos de 11,2%, só foi possível isolar uma estirpe. O mesmo aconteceu com *I. ricinus* (12,2%/17%). A estirpe isolada de *I. ventralloii* foi obtida de uma ninfa ingurgitada retirada de uma ratazana, juntamente com outros 4 exemplares, todos positivos pelo teste dos hemócitos.

Ainda na tabela XIII pode se observar que as estirpes isoladas podem ser agrupadas por locais e por data de captura dos ixodídeos, revelando focos de artrópodos parasitados com estes microrganismos.

**Tabela XIII. Dados sobre os ixodídeos a partir dos quais foram isoladas estirpes de rickettsias**

Espécie/sexo*	Local de captura	Data da captura	Hospedeiro	Código da estirpe isolada*
<b><i>Dermacentor</i></b>				
<i>marginatus</i> /f	Marateca	Abr. 1991	vegetação	PoTiR10
<i>D. marginatus</i> /f	Pinheiro	Out. 1991	vegetação	PoTiR27
<i>D. marginatus</i> /m	Pinheiro	Out. 1991	vegetação	PoTiR13
<i>D. marginatus</i> /m	Pinheiro	Out. 1991	vegetação	PoTiR5
<i>D. marginatus</i> /m	Pinheiro	Out. 1991	vegetação	PoTiR6
<i>D. marginatus</i> /m	Pinheiro	Out. 1991	vegetação	PoTiR14
<i>D. marginatus</i> /m	Pinheiro	Out. 1991	vegetação	PoTiR4
<i>D. marginatus</i> /m	Palma	Out. 1991	<i>Bos taurus</i>	PoTiR28
<i>D. marginatus</i> /m	Palma	Out. 1991	<i>B. taurus</i>	PoTiR22
<i>D. marginatus</i> /m	Palma	Out. 1991	<i>B. taurus</i>	PoTiR26
<i>D. marginatus</i> /m	Alcácer do Sal	Out. 1991	<i>Sus scrofa</i>	PoTiR24
<i>D. marginatus</i> /m	Pinheiro	Nov. 1991	vegetação	PoTiR20
<i>D. marginatus</i> /m	Pinheiro	Nov. 1991	vegetação	PoTiR21
<i>D. marginatus</i> /f	Pinheiro	Jan. 1992	vegetação	PoTiR23
<i>D. marginatus</i> /f	Pinheiro	Jan. 1992	vegetação	PoTiR19
<i>D. marginatus</i> /m	Pegões	Jan. 1992	<i>Equus caballus</i>	PoTiR15
<i>D. marginatus</i> /m	Pegões	Jan. 1992	<i>E. caballus</i>	PoTiR35
<i>D. marginatus</i> /f	Pegões	Jan. 1992	<i>E. caballus</i>	PoTiR16
<i>D. marginatus</i> /m	Paulinas	Jan. 1993	vegetação	PoTiR7
<i>D. marginatus</i> /m	Pancas	Jan. 1993	vegetação	PoTiR30
<i>D. marginatus</i> /f	Alcácer do Sal	Fev. 1994	<i>S.scrofa</i>	PoTiR41
<b><i>Hyalomma</i></b>				
<i>marginatum</i> /f	Grandola	Abr. 1992	<i>B. taurus</i>	PoTiR8
<b><i>Ixodes</i></b>				
<i>ricinus</i> /m	Alcácer do Sal	Fev. 1993	<i>Vulpes vulpes</i>	PoTiR42
<i>ventalioi</i> /ni	Pancas	Fev. 1995	<i>R. rattus</i>	PoTiR43
<b><i>Rhipicephalus</i></b>				
<i>sanguineus</i> /f	Palhota	Ago. 1991	vegetação	PoTiR3
<i>R. sanguineus</i> /f	Palhota	Ago. 1991	vegetação	PoTiR25
<i>R. sanguineus</i> /m	Palhota	Ago. 1991	vegetação	PoTiR17
<i>R. sanguineus</i> /m	Setubal	Abr. 1992	<i>Canis familiaris</i>	PoTiR31
<i>R. sanguineus</i> /f	Setubal	Abr. 1992	<i>C. familiaris</i>	PoTiR1
<i>R. sanguineus</i> /m	Padeiras	Mai. 1992	<i>C. familiaris</i>	PoTiR33
<i>R. sanguineus</i> /m	Padeiras	Mai. 1992	<i>C. familiaris</i>	PoTiR32
<i>R. sanguineus</i> /m	Setubal	Mai. 1992	<i>C. familiaris</i>	PoTiR12
<i>R. sanguineus</i> /f	Pancas	Fev. 1993	<i>Lepus capensis</i>	PoTiR40
<i>R. sanguineus</i> /m	S.Brás Alportel	Fev. 1993	<i>V. vulpes</i>	PoTiR36
<i>R. sanguineus</i> /f	Pancas	Mar. 1993	<i>L. capensis</i>	PoTiR34
<b><i>Rhipicephalus</i></b>				
<i>turanicus</i> / f	Grandola	Abr. 1992	<i>B. taurus</i>	PoTiR9
<i>R. turanicus</i> / m	Grandola	Abr. 1992	<i>B. taurus</i>	PoTiR11
<i>R. turanicus</i> / f	Grandola	Abr. 1992	<i>B. taurus</i>	PoTiR29
<i>R. turanicus</i> /m	Algarve	Fev. 1994	<i>V. vulpes</i>	PoTiR37
<i>R. turanicus</i> /m	Algarve	Fev. 1994	<i>V. vulpes</i>	PoTiR38
<i>R. turanicus</i> /m	Algarve	Fev. 1994	<i>V. vulpes</i>	PoTiR39

\*PoTiR = Portugal Tick Rickettsia; f = femea; m = macho; ni = ninfa

## 2. SANGUE HUMANO

No período compreendido entre 1993 e 1995 foram recebidas no CEVDI 31 amostras de sangue humano destinadas ao isolamento de rickettsias de acordo com o protocolo referido. As amostras foram colhidas, na maior parte dos casos, durante o período febril, antes de antibióticoterapia específica para rickettsioses, embora os doentes tivessem tido outra medicação. Algumas amostras foram retiradas das seringas e enviadas ao CEVDI em tubos de vidro. A colheita e o processamento para isolamento tanto foram feitos no mesmo dia como foram utilizadas amostras congeladas durante algumas semanas.

Os dados sobre as amostras de sangue humano utilizadas para isolamento de rickettsias podem ser observados na Tabela XIV. Apenas duas estirpes foram isoladas (6,5% de positividade). Das outras culturas, 22,5% contaminaram com outras bactérias e 71% ficaram estéreis, isto é, não foi observado o crescimento de microrganismos de qualquer tipo.

As estirpes isoladas receberam o número de código de PoHuR915/94 e PoHuR1021/95 (PoHuR=*Portugal Human Rickettsia*). A primeira estirpe foi isolada em Julho de 1994, tendo o sangue sido colhido de uma mulher de 55 anos, internada na Unidade de Cuidados Intensivos do Hospital Distrital de Évora (enviada pelo Prof. Dr. David de Moraes). A doente faleceu na noite da colheita da amostra, não tendo desenvolvido os sintomas clássicos de uma rickettsiose. A segunda estirpe foi isolada em Agosto de 1995, a partir de uma amostra de sangue colhida de uma mulher de 52 anos, internada no Serviço de Medicina II do Hospital Distrital de Setúbal (enviada por Dr. J. Poças / / Dr.<sup>a</sup> Joana Sá) com um diagnóstico inicial de encefalite. A doente desenvolveu um quadro clínico de Febre escaro nodular e recuperou após tratamento, tendo sido observada uma seroconversão contra *R. conorii*.

**Tabela XIV. Dados sobre as amostras de sangue humano submetidas ao método de “shell vial” para isolamento de rickettsias**

Número de registo	Origem da amostra*	Data	Sexo*	Idade*	Local de residência declarado
777	CEVDI	Set. 93	m.	36	Setúbal
818	HDS	Out. 93	f.	11	Santiago do Cacém
146	HDS	Fev. 94	m	?	Setúbal
248	INSA	Mai. 94	f.	27	Almada
558	INSA	Mai. 94	f.	40	Cruz de Pau
560	INSA	Mai. 94	f	35	Seixal
576	HDS	Jun. 94	m.	7	Gâmbia
582	INSA	Jul. 94	f.	41	Setúbal
811	HDS	Jul. 94	m.	23	Setúbal
832	HDS	Ago. 94	f.	adulto	Setúbal
858	HDS	Ago. 94	f	adulto	Setúbal
859	HDS	Ago. 94	m.	adulto	Setúbal
860	HDS	Ago. 94	m.	criança	Setúbal
913	HDE	Jul. 94	m	34	Évora
915	HDE	Jul. 94	f.	55	Barrancos
916	HDE	Jul. 94	f.	48	Ciborro
948	HDE	Jul. 94	m	34	Évora
1078	HDS	Out. 94	f.	8	Setúbal
1100	HDB	Out. 94	m.	66	Beja
1157	HDB	Out. 94	m	51	Mértola
1338	HDB	Nov. 94	f.	47	Beja
202	CEVDI	Fev. 95	f.	33	Gâmbia
582	CEVDI	Mai. 95	f.	42	Herdade Zambujal
733	HDS	Jul. 95	m	4	Santana da Serra
762	HDE	Jul. 95	m.	25	?
764	HDS	Jul. 95	f.	criança	Setúbal
803	HDE	Jul. 95	f.	60	Évora
804	HDE	Jul. 95	f	adulto	Évora
966	HDE	Ago. 95	m.	adulto	Évora
1021	HDS	Ago. 95	f.	adulto	Grândola
1022	HDS	Ago. 95	m.	18	Setúbal

\*HDB = Hospital Distrital de Beja, HDE = Hospital Distrital de Évora, HDS = Hospital Distrital de Setúbal, INSA = Instituto Nacional de Saúde-Lisboa, CEVDI = Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas – Águas de Moura, m = masculino, f = feminino, ? = não especificado

### 3. ÓRGÃOS DE MICROMAMÍFEROS

As espécies e o número de micromamíferos cujos órgãos foram processados para isolamento de rickettsias podem ser observados na tabela XV. Não foi possível isolar estirpes de rickettsia a partir destes animais. Cerca de 80% das culturas apresentaram contaminações.

**Tabela XV. Órgãos de micromamíferos processados para isolamento de rickettsias**

Espécie	Baço	Cérebro	Positivos IFA contra <i>R. conorii</i> *
<i>Apodemus sylvaticus</i>	89	0	77
<i>Crocidura russula</i>	5	0	-
<i>Mus spretus</i>	54	12	3
<i>Rattus norvegicus</i>	19	35	35
<i>Microtus (Pitymis) duodecymcostatus</i>	8	0	6
<b>ΣTotal</b>	166	47	121

\*IFA= imunofluorescência indirecta, título 1:32,-= não realizado

Na primeira fase do trabalho, quando o processamento para isolamento de rickettsias foi feito sem conhecimento dos resultados da serologia, a maior parte dos animais estudados teve o baço utilizado em estudos de isolamento de borrelíias e leptospiras e, por esta razão, apenas se utilizou o cérebro. Apenas foram processados o baço e o cérebro de *Rattus norvegicus*. Contudo, as culturas contaminaram na sua totalidade dado a colheita de órgãos ter sido feita sem condições de assépsia durante a autópsia. Outros factores deletórios foram a conservação do material a -20°C durante vários dias e o transporte para o CEVDI em contentores de frio que, por vezes, não mantiveram o material congelado.

Numa segunda fase, devido ao custo elevado dos materiais necessários às técnicas de isolamento, apenas se utilizou o baço de animais com serologia positiva para *R. conorii*. Embora fosse conhecido que o período rickettsiémico nos micromamíferos é de curta duração, pretendeu-se comprovar a hipótese de que a presença de anticorpos, em níveis baixos, poderia ser uma indicação de uma infecção recente. Ainda nesta fase, foram utilizados para estudo os animais capturados, maioritariamente, na região da Marateca. Os órgãos foram processados no próprio dia e as operações realizadas em câmara de fluxo laminar. A contaminação das culturas foi reduzida, embora sem resultados positivos de isolamentos de rickettsias, como atrás referido.

## **IV**

### **Resultados da Identificação e Classificação por Microimunofluorescência das Estirpes Isoladas**





## 1. ESTIRPES ISOLADAS DE HUMANOS

Nas tabelas XVIa e XVIIb encontram-se os dados da identificação serológica feita por microimunofluorescência (MIF) das duas estirpes de rickettsia isoladas a partir de sangue humano. A diferença específica calculada está apresentada entre parêntesis.

**Tabela XVIa. Identificação por MIF de PotiHu915/94**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoHuR915/94
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:2 (10)	1:256 (2)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:8 (8)	1:2 (10)	1:64 (6)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (7)	1:512 (0)	1:8 (11)	1:2 (10)	1:64 (7)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:128 (8)	1:16 (11)	1:512 (0)	1:2 (10)	1:32 (7)
<i>R.typhi</i>	1:2 (10)	1:2 (10)	1:2 (10)	1:2 (10)	1:32 (0)	1:2 (10)
PoHuR915/94	1:256 (2)	1:64 (6)	1:32 (7)	1:64 (7)	1:2 (10)	1:512 (0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.

SPD<3: espécies iguais; SPD>=3: espécies diferentes

**Tabela XVIIb. Identificação por MIF de PoHu1021/95**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoHuR1021/95
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:2 (10)	1:512 (1)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:8 (8)	1:2 (10)	1:128 (5)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (7)	1:512 (0)	1:8 (11)	1:2 (10)	1:128 (5)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:128 (8)	1:16 (11)	1:512 (0)	1:2 (10)	1:128 (6)
<i>R.typhi</i>	1:2 (10)	1:2 (10)	1:2 (10)	1:2 (10)	1:32 (0)	1:2 (10)
PoHuR1021/95	1:512 (1)	1:128 (5)	1:128 (5)	1:64 (6)	1:2 (10)	1:1024 (0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.

SPD<3: espécies iguais; SPD>=3: espécies diferentes

Cada soro, produzido experimentalmente nos murganhos contra as espécies padrão do grupo das febres exantemáticas e contra as estirpes isoladas, reagiu com os antigénios homólogos e heterólogos, sendo no geral os títulos obtidos com antigénios homólogos sempre mais elevados, pelo menos duas diluições, do que os títulos heterólogos.

Os títulos finais homólogos das espécies a identificar foram uma diluição maior do que o título obtido com a espécie padrão *R. conorii* (títulos homólogos PoHu915/94 = 1:512 e PoHu1021/95 = 1:1024; títulos heterólogos PoHu915/94 = 1:256 e PoHu1021/95 = 1:512). Os soros contra as estirpes isoladas de humanos e contra *R. conorii* reagiram com os antigénios heterólogos com títulos semelhantes, com diferenças de uma diluição entre si.

Por outro lado, as reacções heterólogas mais fracas foram obtidas a partir do soro preparado contra *R. slovacica* com o antigénio de PoHu915/94 e a do soro contra *R. rhipicephali* com PoHu1021/95. Este último soro reagiu sempre com títulos baixos com todas as espécies padrão utilizadas.

O cálculo da diferença específica indicou que ambas as estirpes isoladas de sangue humano são muito próximas de *R. conorii* (SPD <3) e que diferem de todas as outras espécies padrão utilizadas neste estudo (10 ≥ SPD ≥3).

## 2. ESTIRPES ISOLADAS DE IXODÍDEOS

### 2.1. Estirpes isoladas de *D. marginatus*

Nas tabelas numeradas de XVIIa a XVIIu, que se apresentam a seguir, estão representados os resultados da identificação pelo teste de MIF das 21 estirpes de rickettsias isoladas de *D. marginatus*.

**Tabela XVIIa. Identificação por MIF de PoTiR4**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR4
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR4	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE≥3 espécies diferentes

**Tabela XVIIb. Identificação por MIF de PoTiR5**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR5
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR5	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIIc. Identificação por MIF de PoTiR6**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR6
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR6	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVII d. Identificação por MIF de PoTiR7**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR7
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR7	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; SPDE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIIe. Identificação por MIF de PoTiR10**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR10
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR10	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIIf. Identificação por MIF de PoTiR13**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR13
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR13	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIIg. Identificação por MIF de PoTiR14**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR14
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR14	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVIIh. Identificação por MIF de PoTiR15

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR15
<i>R.conorii</i>	1:256 (0)	1:128 (7)	1:32 (8)	1:32 (7)	1:8 (7)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:16 (7)	1:1024 (0)	1:256 (3)	1:8 (9)	1:4 (9)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:16 (8)	1:256 (3)	1:512 (0)	1:8 (11)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:128 (9)	1:16 (11)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (7)	1:4 (9)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR15	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVIIi. Identificação por MIF de PoTiR16

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR16
<i>R.conorii</i>	1:256 (0)	1:128 (7)	1:32 (8)	1:32 (7)	1:8 (7)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:16 (7)	1:1024 (0)	1:256 (3)	1:8 (9)	1:4 (9)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:16 (8)	1:256 (3)	1:512 (0)	1:8 (11)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:128 (9)	1:16 (11)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (7)	1:4 (9)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR16	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVIIj. Identificação por MIF de PoTiR19

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR19
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR19	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIII. Identificação por MIF de PoTiR20**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR4
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR20	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD=(Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIII. Identificação por MIF de PoTiR21**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR21
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR21	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD=(Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIII. Identificação por MIF de PoTiR22**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR22
<i>R.conorii</i>	1:1024 (0)	1:32 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (9)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:64 (10)	1:1024 (0)	1:128 (8)	1:16 (9)	1:4 (9)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:64 (8)	1:64 (8)	1:2048 (0)	1:16 (8)	1:2 (10)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (9)	1:4 (9)	1:8 (10)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR22	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD=(Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVII. Identificação por MIF de PoTiR23

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR23
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR23	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVIII. Identificação por MIF de PoTiR24

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR24
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:64 (8)	1:512 (0)	1:128 (7)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:64 (9)	1:64 (7)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR24	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XIX. Identificação por MIF de PoTiR26

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR26
<i>R.conorii</i>	1:1024 (0)	1:32 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (9)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:64 (10)	1:1024 (0)	1:128 (8)	1:16 (9)	1:4 (9)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:64 (8)	1:64 (8)	1:2048 (0)	1:16 (8)	1:2 (10)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (9)	1:4 (9)	1:8 (10)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR26	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes



Tabela XVIIq. Identificação por MIF de PoTiR27

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR27
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR27	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVIIr. Identificação por MIF de PoTiR28

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR28
<i>R.conorii</i>	1:1024 (0)	1:32 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (9)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:64 (10)	1:1024 (0)	1:128 (8)	1:16 (9)	1:4 (9)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:64 (8)	1:64 (8)	1:2048 (0)	1:16 (8)	1:2 (10)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (9)	1:4 (9)	1:8 (10)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR28	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVIIs. Identificação por MIF de PoTiR30

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR30
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (5)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (4)
<i>R.sibirica</i>	1:128 (5)	1:512 (0)	1:256 (3)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (2)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (8)	1:128 (3)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:64 (4)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (7)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (7)
PoTiR30	1:128 (5)	1:128 (3)	1:64 (5)	1:32 (7)	1:4 (7)	1:256 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVIII. Identificação por MIF de PoTiR35

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR35
<i>R.conorii</i>	1:256 (0)	1:128 (7)	1:32 (8)	1:32 (7)	1:8 (7)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:16 (7)	1:1024 (0)	1:256 (3)	1:8 (9)	1:4 (9)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:16 (8)	1:256 (3)	1:512 (0)	1:8 (11)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:128 (9)	1:16 (11)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (7)	1:4 (9)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR35	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Tabela XVIIu. Identificação por MIF de PoTiR41

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR41
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (9)	1:32 (8)	1:64 (8)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.sibirica</i>	1:64 (8)	1:512 (0)	1:128 (7)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:64 (9)	1:64 (7)	1:512 (0)	1:16 (8)	1:2 (8)	1:512 (1)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (8)	1:32 (9)	1:64 (8)	1:512 (0)	1:8 (8)	1:32 (9)
<i>R.typhi</i>	1:8 (8)	1:4 (8)	1:8 (8)	1:4 (8)	1:32 (0)	1:4 (8)
PoTiR41	1:16 (9)	1:128 (4)	1:256 (1)	1:16 (9)	1:4 (8)	1:512 (0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Todas as as estirpes de rickettsia isoladas de *D. marginatus* induziram a produção de anticorpos nos murganhos inoculados. Os anticorpos produzidos contra estas estipes reagiram com os antigénios das rickettsias do grupo das febres exantemáticas com títulos maiores do que com o antigénio de *R. typhi*.

Cada soro testado (das espécies padrão e das estirpes isoladas) reagiu com os antigénios homólogos e heterólogos sendo os títulos obtidos com antigénios homólogos sempre mais elevados, pelo menos duas diluições, que os títulos heterólogos. As estirpes isoladas de *D. marginatus* apresentaram títulos de anticorpos mais elevados com o antigénio de *R. slovacica* (1:256), com excepção de PoTiR30 que apresentou um título de 1:64. Esta última estirpe reagiu com títulos mais elevados (1:128) com *R.conorii* e *R. sibirica*.

Pela análise dos valores da diferença específica encontrada para estas estirpes, com excepção de PoTiR30, verificou-se que se assemelham a *R. slovacca* (SPD=1) estando mais próximas antigenicamente de *R. sibirica* e de *R. conorii* do que de *R. rhipicephali*. Por sua vez PoTiR30 encontra-se próxima de *R. sibirica* (SPD=3).

## 2.2. Estirpes isoladas de *R. sanguineus*

A identificação pela técnica de MIF das 11 estirpes de rickettsias isoladas de *R. sanguineus* está apresentada nas tabelas numeradas de XVIIIa a XVIIIk.

**Tabela XVIIIa. Identificação por MIF de PoTiR1**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR1
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (6)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (5)	1:64 (6)	1:2 (9)	1:32 (7)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:128 (6)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:64 (6)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:128 (7)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (9)
PoTiR1	1:256 (6)	1:64 (7)	1:32 (8)	1:32 (6)	1:2 (9)	1:512(0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIIIb. Identificação por MIF de PoTiR3**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR3
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (6)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (5)	1:64 (6)	1:2 (9)	1:32 (7)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:128 (6)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:64 (6)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:128 (7)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (9)
PoTiR3	1:256 (6)	1:64 (7)	1:32 (8)	1:32 (6)	1:2 (9)	1:512(0)

\* SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIIIc. Identificação por MIF de PoTiR12**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR12
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:256 (2)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:64 (6)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (7)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:64 (6)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:32 (7)
<i>R.typhi</i>	1:2 (11)	1:2 (13)	1:2 (13)	1:4 (11)	1:64 (0)	1:2 (9)
PoTiR12	1:256 (2)	1:64 (6)	1:64 (6)	1:64 (7)	1:4 (9)	1:512 (0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIII d. Identificação por MIF de PoTiR17**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR17
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (6)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (5)	1:64 (6)	1:2 (9)	1:32 (7)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:128 (6)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:64 (6)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:128 (7)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (9)
PoTiR17	1:256 (6)	1:64 (7)	1:32 (8)	1:32 (6)	1:2 (9)	1:512(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XVIII e. Identificação por MIF de PoTiR25**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR25
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (6)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (5)	1:64 (6)	1:2 (9)	1:32 (7)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:128 (6)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:64 (6)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:128 (7)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (9)
PoTiR25	1:256 (6)	1:64 (7)	1:32 (8)	1:32 (6)	1:2 (9)	1:512(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Todas as estirpes de rickettsia isoladas de *R. sanguineus* induziram anticorpos nos murghans inoculados. Os anticorpos reagiram com os antígenos das rickettsias do grupo das febres exantemáticas com títulos maiores do que com o antígeno preparado com *R. typhi*. Cada soro testado (espécies padrão e estirpes isoladas) reagiu com os antígenos homólogos e heterólogos, sendo os títulos obtidos com antígenos homólogos sempre mais elevados do que os títulos heterólogos.

Na maior parte dos casos as reacções entre o soro produzido contra *R. conorii* e o antígeno das diferentes estirpes a classificar deram origem a títulos mais elevados do que os obtidos com os soros das outras espécies padrão do grupo das febres exantemáticas. Porém o soro das estirpes a classificar reagiram com títulos baixos com todos os antígenos heterólogos, com excepção de PoTiR12, PoTiR31, PoTiR32 e PoTiR33 que reagiram com títulos elevados (1:256) com o antígeno de *R. conorii*.

Pela análise dos valores da diferença específica encontrados para estas estirpes verificou-se que PoTiR12, PotiR31, PoTir32 e PoTir33 são próxima antigenicamente de *R. conorii* (SPD=2). As restantes estirpes tem valores de diferença específica maiores que 3 com todas as espécies padrão utilizadas, isto é, antigenicamente são diferentes de todas as espécies utilizadas para comparação.

### 2.3. Estirpes isoladas de *R. turanicus*

A identificação pela técnica de MIF das 6 estirpes de rickettsias isoladas de *R. turanicus* está representada nas tabelas numeradas de XIXa a XIXf.

**Tabela XIXa. Identificação por MIF de PoTiR9**

Antígeno	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR9
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (11)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (8)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:16 (11)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:64 (8)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (10)
PoTiR9	1:16 (11)	1:64 (8)	1:16 (11)	1:32 (9)	1:2 (10)	1:1024(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antígeno e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XIXb. Identificação por MIF de PoTiR11**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR9
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (11)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (8)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:16 (11)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:64 (8)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (10)
PoTiR9	1:16 (11)	1:64 (8)	1:16 (11)	1:32 (9)	1:2 (10)	1:1024(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XIXc. Identificação por MIF de PoTiR29**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR9
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (11)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (8)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:16 (11)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:64 (8)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (10)
PoTiR9	1:16 (11)	1:64 (8)	1:16 (11)	1:32 (9)	1:2 (10)	1:1024(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XIXd. Identificação por MIF de PoTiR37**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR11
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (11)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (8)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:16 (11)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:64 (8)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (10)
PoTiR11	1:16 (11)	1:64 (8)	1:16 (11)	1:32 (9)	1:2 (10)	1:1024(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XIXe. Identificação por MIF de PoTiR38**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR11
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (11)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (8)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:16 (11)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:64 (8)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (10)
PoTiR11	1:16 (11)	1:64 (8)	1:16 (11)	1:32 (9)	1:2 (10)	1:1024(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

**Tabela XIXf. Identificação por MIF de PoTiR39**

Antigénio	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	PoTiR11
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:16 (11)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:32 (8)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (8)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:16 (11)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:64 (8)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (10)
PoTiR11	1:16 (11)	1:64 (8)	1:16 (11)	1:32 (9)	1:2 (10)	1:1024(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

Todas as estirpes de rickettsia isoladas de *R. turanicus* induziram anticorpos nos murganhos inoculados. Os soros reagiram com os antigénios das rickettsias do grupo das febres exantémicas com títulos maiores do que os títulos obtidos com *R. typhi*, embora os títulos fossem baixos. Cada soro testado (espécies padrão e estirpes a classificar) reagiu com os antigénios homólogos e heterólogos, sendo os títulos obtidos com antigénios homólogos sempre mais elevados, pelo menos quatro diluições, que os títulos heterólogos.

Pela análise dos valores da diferença específica encontrada para estas estirpes verificou-se que foram maiores que 3 com todas as espécies padrão utilizadas, isto é, antigenicamente são diferentes de todas as espécies utilizadas para comparação. Embora não apresentado em tabela foi realizado o estudo por MIF de PoTiR1 isolada de *R. sanguineus* e PoTiR11 isolada de *R. turanicus*, que resultou em valores de diferença específica maiores que 3, sendo, portanto, também estirpes diferentes antigenicamente.

## 2.4. Estirpe isolada de *I. ricinus*

A estirpe de rickettsia isolada de *I. ricinus* identificada por MIF tem o resultado apresentado na tabela XX. Para além das várias espécies padrão utilizadas para comparação incluiu-se no estudo *Rickettsia helvetica*, espécie padrão isolada de *I. ricinus* na Suíça.

**Tabela XX. Identificação por MIF de PoTiR42**

Antigénio	Soro						
	Título/(Diferença Específica)*						
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R. typhi</i>	<i>R.helvetica</i>	PoTiR42
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:128 (5)	1:128 (3)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:32 (8)	1:64 (5)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (8)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:64 (7)	1:128 (4)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:32 (8)	1:16 (5)
<i>R.helvetica</i>	1:128 (5)	1:64 (8)	1:64 (7)	1:64 (8)	1:8 (10)	1:1024 (0)	1:256 (1)
<i>R. typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:8 (10)	1:32 (4)
PoTiR42	1:128 (3)	1:64 (5)	1:64 (4)	1:16 (5)	1:32 (4)	1:512 (1)	1:256 (0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antigénio e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

A estirpe de rickettsia isolada de *I. ricinus* induziu anticorpos nos murganhos inoculados. Os soros das espécies padrão e de PotiR42 reagiram com os antigénios homólogos e heterólogos, sendo os títulos obtidos com antigénios homólogos sempre mais elevados, pelo menos uma diluição, do que os títulos heterólogos. Os títulos de anticorpos obtidos entre o soro das rickettsias do grupo das febres exantemáticas, com excepção de *R. rhipicephali*, e o antigénio da estirpe a classificar foram maiores do que o título obtido com o antigénio de *R. typhi*. Os maiores valores obtiveram-se nas reacções entre *R. helvetica* e PoTiR42.

Pela análise dos valores da diferença específica encontrada para esta estirpe verificou-se que é próxima antigenicamente de *R. helvetica* (SPD=1).

## 2.5. Estirpe isolada de *I. ventalloi*

A estirpe de rickettsia isolada de *I. ventalloi* identificada por MIF tem o resultado apresentado na tabela XXI. Também foi incluída na comparação imunológica a espécie *R. helvetica*.

A estirpe de rickettsia isolada de *I. ventalloi* induziu anticorpos nos murganhos inoculados. Os soros reagiram com os antigénios homólogos e heterólogos, sendo os títulos



obtidos com antígenos homólogos sempre mais elevados, pelo menos uma diluição, do que os títulos heterólogos.

Pela análise dos valores da diferença específica encontrada para esta estirpe verificou-se que é muito próxima antigenicamente de *R. helvetica* (SPD=0).

**Tabela XXI. Identificação por MIF de PoTiR43**

Antígeno	Soro						
	Título/(Diferença Específica)*						
	<i>R.conorii</i>	<i>R.sibirica</i>	<i>R.slovaca</i>	<i>R.rhipicephali</i>	<i>R.typhi</i>	<i>R.helvetica</i>	PoTiR43
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:128 (5)	1:32 (6)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:32 (8)	1:64 (6)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (8)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:64 (7)	1:16 (8)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:32 (8)	1:32 (6)
<i>R.helvetica</i>	1:128 (5)	1:64 (8)	1:64 (7)	1:64 (8)	1:8 (10)	1:1024 (0)	1:512(0)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:8 (10)	1:32 (6)
PoTiR43	1:64 (6)	1:32 (6)	1:32 (8)	1:64 (6)	1:8 (6)	1:256 (0)	1:256(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antígeno e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

## 2.6. Estirpe isolada de *H. marginatum*

A estirpe isolada de *H. marginatum* analisada pela técnica de MIF tem os resultados apresentados na tabela XXII.

**Tabela XXII. Identificação por MIF de PoTiR8**

Antígeno	Soro					
	Título/(Diferença Específica)*					
	<i>R. conorii</i>	<i>R. sibirica</i>	<i>R. slovacca</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. typhi</i>	PoTiR8
<i>R.conorii</i>	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:32 (9)	1:8 (9)	1:256 (3)
<i>R.sibirica</i>	1:32 (7)	1:512 (0)	1:64 (7)	1:64 (7)	1:2 (9)	1:128 (4)
<i>R.slovaca</i>	1:32 (7)	1:32 (7)	1:512 (0)	1:16 (9)	1:2 (9)	1:128 (3)
<i>R.rhipicephali</i>	1:16 (9)	1:32 (7)	1:32 (9)	1:512 (0)	1:4 (9)	1:64 (5)
<i>R.typhi</i>	1:2 (9)	1:2 (9)	1:2 (9)	1:4 (9)	1:64 (0)	1:2 (8)
PoTiR8	1:64 (3)	1:64 (4)	1:128 (3)	1:64 (5)	1:16 (8)	1:256(0)

\*SPD= (Aa+Bb)-(Ab+Ba) onde A (B) é o antígeno e a (b) é o soro homólogo.  
SPD<3 espécies iguais; DE>=3 espécies diferentes

As estirpe de rickettsia isolada de *H. marginatum* induziu anticorpos nos murganhos inoculados. Os anticorpos reagiram com os antígenos das rickettsias do grupo das febres exantemáticas com títulos maiores do que aqueles que foram obtidos com *R. typhi*.

Pela análise dos valores da diferença específica encontrada para esta estirpe verificou-se que foram iguais a 3 com *R. conorii* e *R. slovacca*, embora os títulos obtidos da reacção com cada uma variasse. O soro preparado com a estirpe PoTiR8 reagiu com um valor igual ao título homólogo com o antígeno de *R. conorii*. Os soros preparados com as espécies padrão reagiram com o antígeno de PoTiR8 com títulos pelo menos duas vezes inferiores aos títulos homólogos. Da análise destes resultados conclui-se que o antígeno desta estirpe, além dos epitopos comuns a todas as rickettsias do grupo das febres exantemáticas, tem epitopos antigénicos específicos semelhantes aos de *R. slovacca* e que os anticorpos que induz nos murganhos também são capazes de reconhecer epitopos específicos de *R. conorii*. Portanto, esta estirpe partilha características antigénicas específicas com estas duas espécies.

### 3. RESULTADO DO MIF COM SOROS HUMANOS

No teste de microimunofluorescência os soros humanos identificados como tendo anticorpos contra *R. conorii* reagiram com todos os antígenos utilizados, com emissão de fluorescência. Os soros da população controlo negativo (dadores de sangue) não deram origem a reacções com quaisquer dos antígenos.

Os resultados obtidos com o MIF com os 5 antígenos preparados com as estirpes isoladas em Portugal e com *R. conorii* marroquina, utilizada como padrão, podem ser observados na tabela XXIII. Sete soros apresentaram um título uma ou duas vezes mais elevado com apenas uma estirpe de rickettsia. Se for considerado que o título mais elevado é o título homólogo, 3 soros (b-92, 80.92, 108.92) tinham anticorpos homólogos contra-PoTiR8. Um soro (212.92) apresentou um título homólogo com PoTiR11, outro (180.92) com PoTiR12 e 3 soros (176.93, 181.93, 288.93) com a estirpe padrão. Os restantes soros tiveram títulos iguais com várias estirpes de rickettsia. As diferenças de título de uma ou duas diluições não foram suficientes para identificar o antígeno homólogo. A maior parte dos soros reagiu com títulos elevados com a estirpe padrão *R. conorii*. Foi interessante observar que as reacções cruzadas com títulos homólogos com PoTiR8 confirmam a existência de epitopos nesta estirpe semelhantes aos de *R. conorii*, já detectados no MIF com soros preparados em murganhos.

Tabela XXIII. MIF – Títulos obtidos com soros humanos

Soros		Antigénios				
CEVDI n.º	<i>R. conorii</i> marroquina	PoTiR1	PoTiR4	PoTiR8	PoTiR11	PoTiR12
b-92	1:2560	1:640	1:1280	1:5120	1:1280	1:2560
80.92	1:640	1:640	1:320	1:1280	1:640	1:640
108.92	1:640	1:640	1:320	1:1280	1:640	1:640
123.92	1:1280	1:1280	1:1280	1:5120	1:5120	1:5120
135.92	1:640	1:320	1:640	1:640	1:320	1:640
140.92	1:5120	1:2560	1:5120	1:640	1:5120	1:5120
180.92	1:80	1:40	1:80	1:80	1:40	1:320
108.92	1:5120	1:1280	1:1280	1:1280	1:5120	1:2560
212.92	1:160	1:80	1:80	1:160	1:640	1:320
213.92	1:2560	1:640	1:1280	1:2560	1:1280	1:2560
214.92	1:640	1:320	1:320	1:640	1:640	1:40
220.92	1:1280	1:640	1:640	1:1280	1:1280	1:640
232.92	1:80	1:80	1:80	1:160	1:160	1:160
181.93	1:640	1:160	1:160	1:320	1:320	1:320
174.93	1:1280	1:1280	1:1280	1:320	1:320	1:1280
176.93	1:1280	1:160	1:320	1:640	1:640	1:640
137.93	1:640	1:320	1:640	1:640	1:640	1:320
392.93	1:80	1:40	1:40	1:40	1:40	1:80
288.93	1:320	1:80	1:160	1:160	1:160	1:80
302.93	1:640	1:320	1:320	1:640	1:320	1:320
246.93	1:2560	1:2560	1:1280	1:280	1:1280	1:2560
210.93	1:640	1:320	1:320	1:640	1:320	1:640
394.93	1:1280	1:1280	1:160	1:320	1:1280	1:1280
395.93	1:40	1:40	<1:40	<1:40	1:40	1:40

V

**Resultados do Estudo  
por “PCR-RFLP” das Estirpes Isoladas**



## 1. ESPÉCIES PADRÃO

Para melhor compreensão dos resultados obtidos neste trabalho com a metodologia do “PCR-RFLP”, utilizada para classificação das estirpes de rickettsias isoladas em Portugal, os perfis de restrição dos segmentos dos genes estudados foram representados esquematicamente. Os esquemas dos perfis das espécies padrão foram elaborados com base em dados publicados (esquemas ou fotografias). Também está apresentado o perfil de restrição do ADN marcador  $\phi$ X174 digerido com a enzima *Hinf* I. Com esta enzima o  $\phi$ X174 é clivado em vários fragmentos, no entanto, são representados apenas os utilizados para calcular o número de pares de bases nucleotídicas dos fragmentos obtidos neste estudo (500, 311, 200, um duplo com 140, 100, 66 e 48 pares de bases – bp).

Assim, na figura 12a encontram-se representados os esquemas e na figura 12b as imagens fotográficas dos perfis de restrição do segmento do gene da citrato sintetase (CS-382 bp), obtidos por digestão com a enzima *Alu* I, das espécies padrão: *R. conorii* estirpe marroquina e estirpe 7#, *R. sibirica*, *R. slovacica* e *R. rhipicephali* (perfis elaborados com base nos dados obtidos por Regnery *et al*, 1991); *R. helvetica*, *R. massiliae* e estirpe Mtu5 (perfis obtidos por Beati *et al*, 1993a).

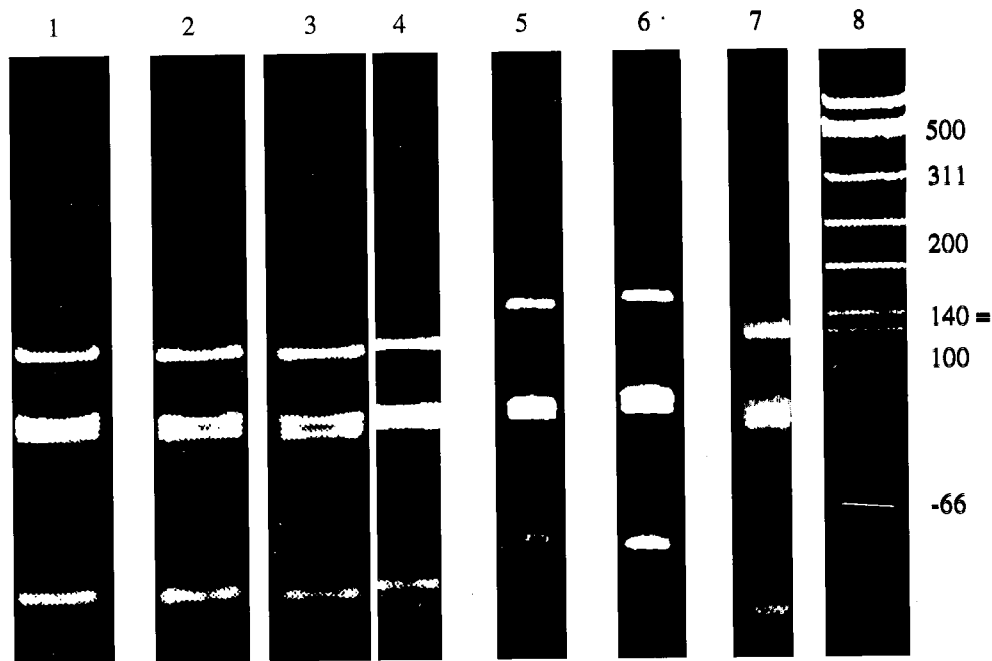
$\phi$ x174	morr	7#	sib	slo	rhp	mass	Mtu5	helv	$\phi$ x174
500									500
311									311
200									200
140*						178	178		140*
100	122-8	122-8	122-8	122-8	122-8	95-105	95-105	135	100
66	81-91*	81-91*	81-91*	81-91*	81-91*			95	66
48	40-44*	40-44*	40-44*	40-44*	40-44*	45	45	45	48
bp	385-392	385-392	385-392	385-392	385-392	423	423	380	bp

**Figura 12a.** Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene CS (primers RpCS.877p e RpCS.1258n) digeridos com *Alu* I.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

### Legenda:

morr = *R. conorii* marroquina; 7# = *R. conorii*; sib = *R. sibirica*; rhp = *R. rhipicephali*;  
mass = *R. massiliae*; Mtu5 = estirpe isolada de *R. sanguineus* e de *R. turanicus*; helv = *R. helvetica*

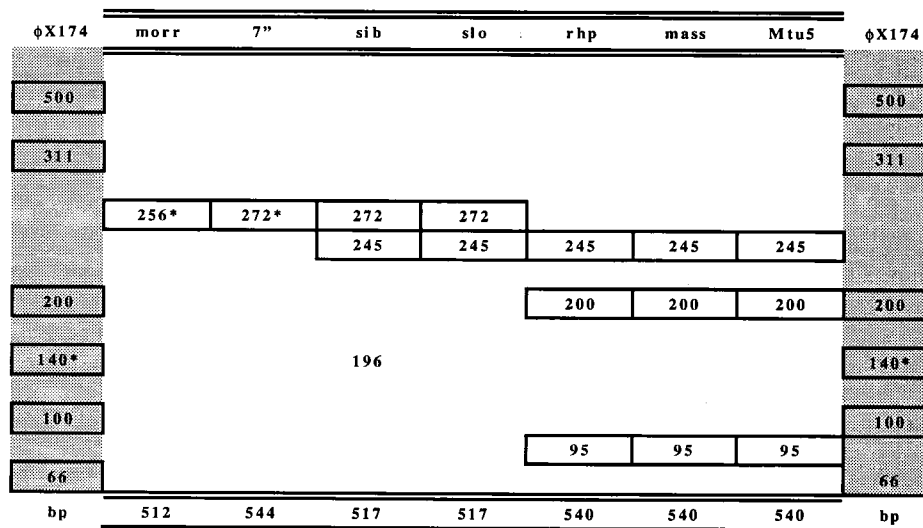


**Figura 12b.** Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene CS (*primers* RpCS.877p e RpCS.1258n) digeridos com *Alu I*.

**Legendas:**

1 = *R. conorii* marroquina; 2 = *R. sibirica*; 3 = *R. slovacica*; 4 = *R. rhipicephali*; 5 = *R. massiliae*; 6 = Mtu5; 7 = *R. helvetica*; 8 =  $\phi$ X174.

Nas figuras 13, 14 e 15 observam-se os perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (580 bp), obtidos pela digestão com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* (Figs.13a, 14a e 17a – representações esquemáticas e Figs. 13b, 14b e 15b – imagens fotográficas). Os perfis da digestão com *Pst I* e com *Rsa I* de *R. conorii* estirpe marroquina, *R. conorii* 7#, *R. sibirica*, *R. slovacica* e *R. rhipicephali* foram obtidos por Regnery e colaboradores (1991) e os perfis de *R. massiliae* e da estirpe Mtu5, foram obtidos por Beati e colaboradores (1993a). Os perfis com a enzima *Alu I* foram obtidos por Bacellar e colaboradores (1995a). O perfil de restrição do ADN marcador  $\phi$ X174 foi digerido com a enzima *Hinf I*. *R. helvetica* não tem o ADN amplificado com os “*primers*” do gene da proteína de 190 kDa (Beati et al, 1994a).

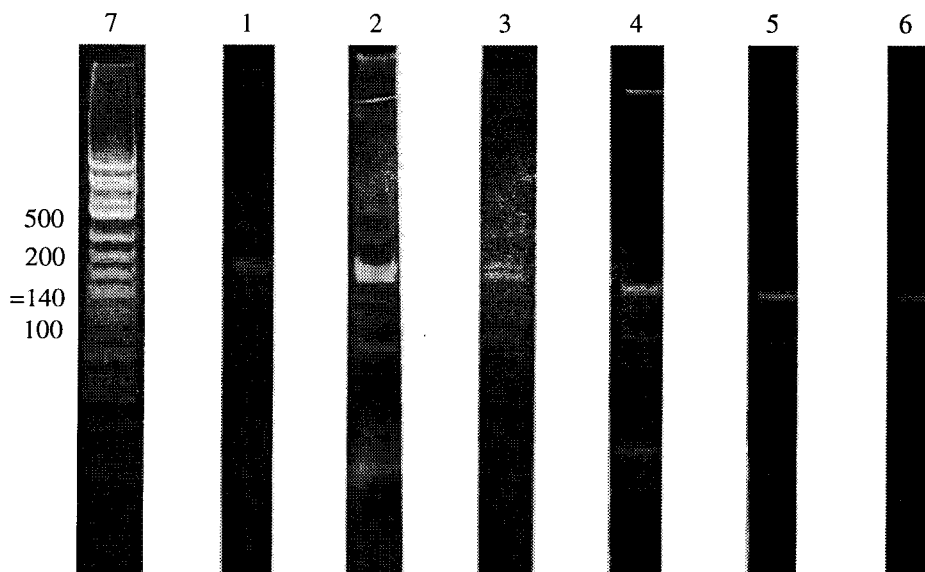


**Figura 13a.** Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (primers Rr190.70p e Rr190.602n) digerido com *Alu I*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

morr = *R. conorii* marroquina; 7# = *R. conorii*; sib = *R. sibirica*; slo = *R. slovacica*; rhp = *R. rhipicephali*; mass= *R. massiliae*; Mtu5.



**Figura 13b.** Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (primers Rr190.70p e Rr190.602n) digerido com *Alu I*.

**Legendas:**

1 = *R. conorii* marroquina; 2 = *R. sibirica*; 3 = *R. slovacica*; 4 = *R. rhipicephali*; 5 = *R. massiliae*; 6 = Mtu5; 7 = phiX174.



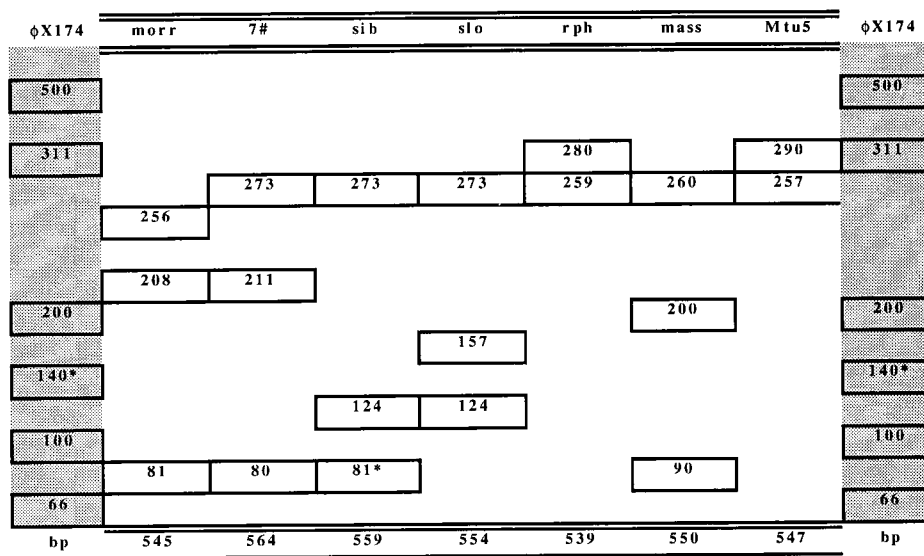


Figura 14a. Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (primers Rr190.70p e Rr190.602n) digerido com *Pst I*

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

morr = *R. conorii* marroquina; 7# = *R. conorii*; sib = *R. sibirica*; slo = *R. slovacica*; rph = *R. rhipicephali*; mass = *R. massiliae*; Mtu5.

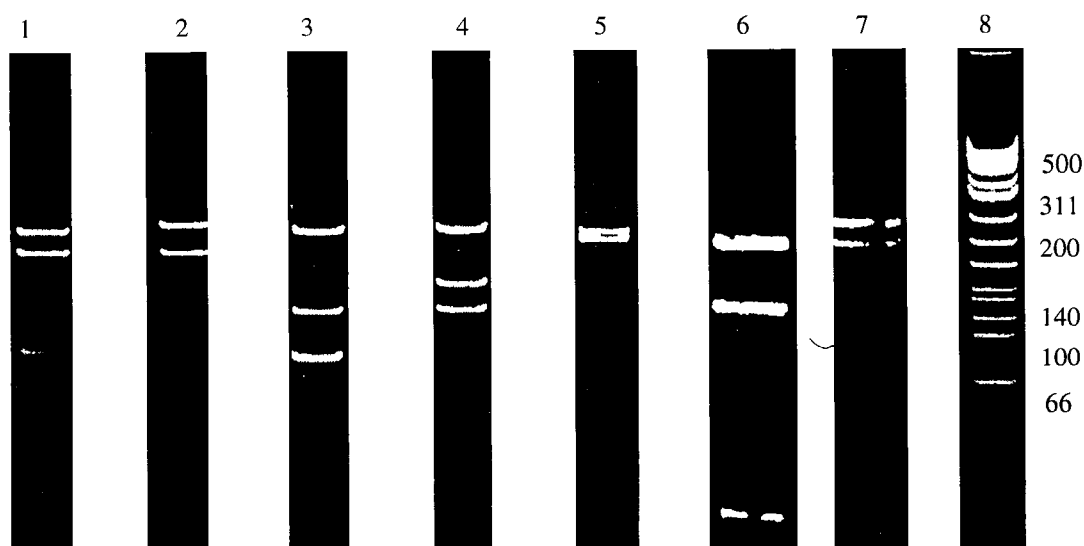


Figura 14b. Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (primers Rr190.70p e Rr190.602n) digerido com *Pst I*.

**Legendas:**

1 = *R. conorii* marroquina; 2 = *R. conorii* 7#; 3 = *R. sibirica*; 4 = *R. slovacica*; 5 = *R. rhipicephali*; 6 = *R. massiliae*; 7 = Mtu5; 8 =  $\phi$ X174.

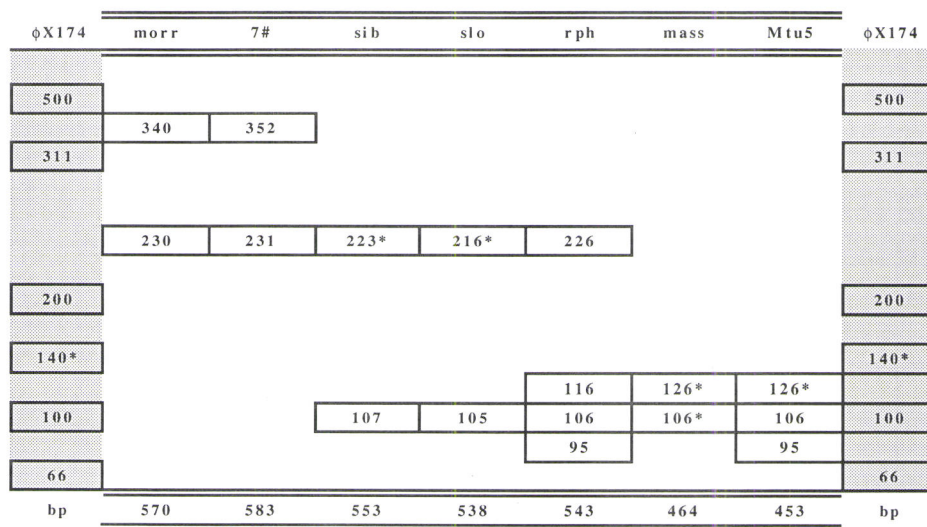


Figura 15a. Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (primers Rr190.70p e Rr190.602n) digerido com *Rsa I*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representadas com um asterisco.

**Legendas:**

morr = *R. conorii* marroquina; 7# = *R. conorii*; sib = *R. sibirica*; slo = *R. slovacica*; rph = *R. rhipicephali*; mass = *R. massiliae*; Mtu5.

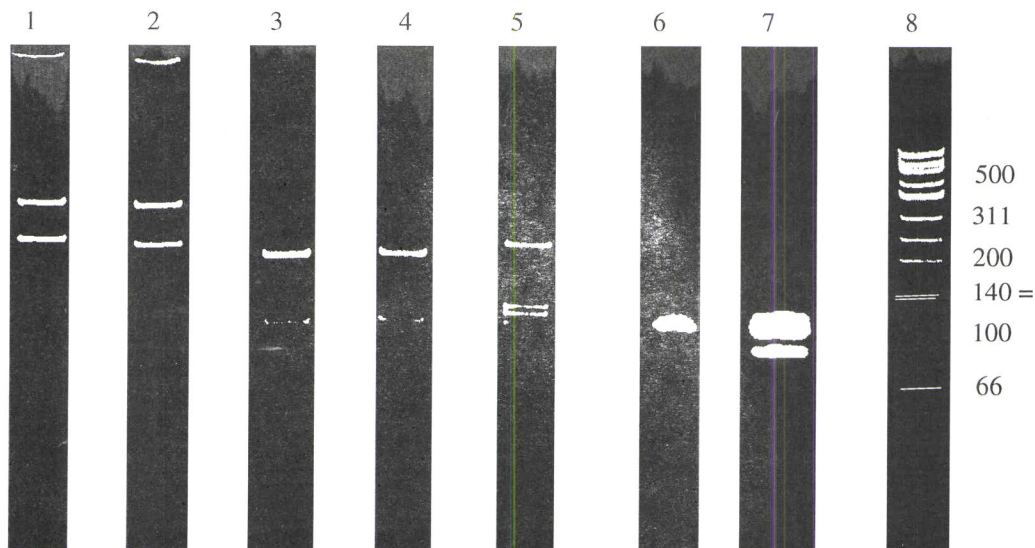


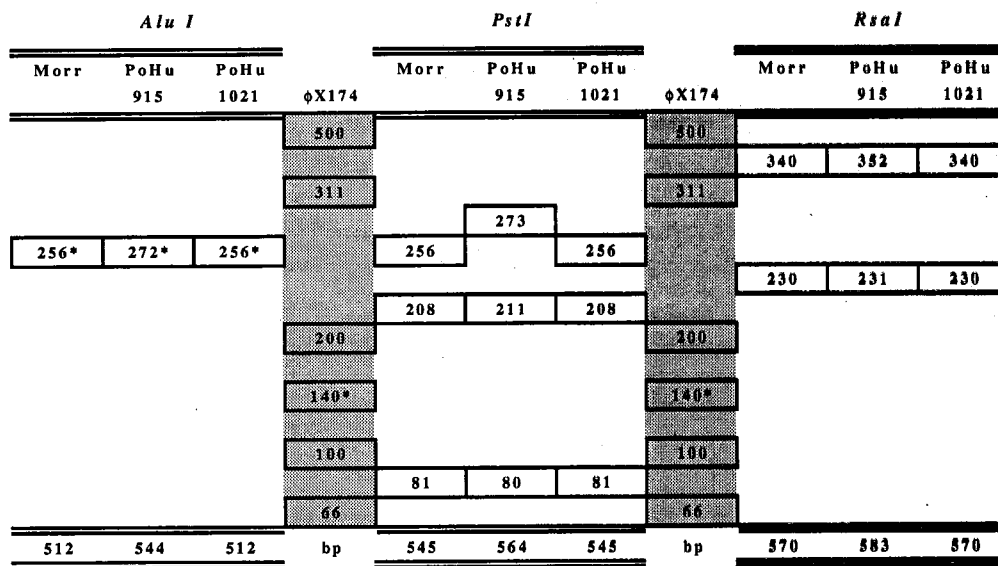
Figura 15b. Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (primers Rr190.70p e Rr190.602n) digerido com *Rsa I*.

**Legendas:**

1 = *R. conorii* marroquina; 2 = *R. conorii* 7#; 3 = *R. sibirica*; 4 = *R. slovacica*; 5 = *R. rhipicephali*; 6 = *R. massiliae*; 7 = Mtu5; 8 = phiX174.

## 2. ESTIRPES ISOLADAS DE SANGUE HUMANO

Na figura 16 estão apresentados os perfis de restrição do fragmento do gene "190 kDa" das duas estirpes de rickettsia isoladas a partir do sangue humano, PoHuR915/94 e PoHuR1021/95 e, ainda, da espécie padrão *R. conorii* marroquina. Na figura 16a observam-se a representação esquemática dos perfis obtidos com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Pst* I e *Rsa* I e em 16b as imagens fotográficas. Por comparação com os perfis das rickettsias utilizadas como padrão estas duas estirpes foram classificadas como *R. conorii*.

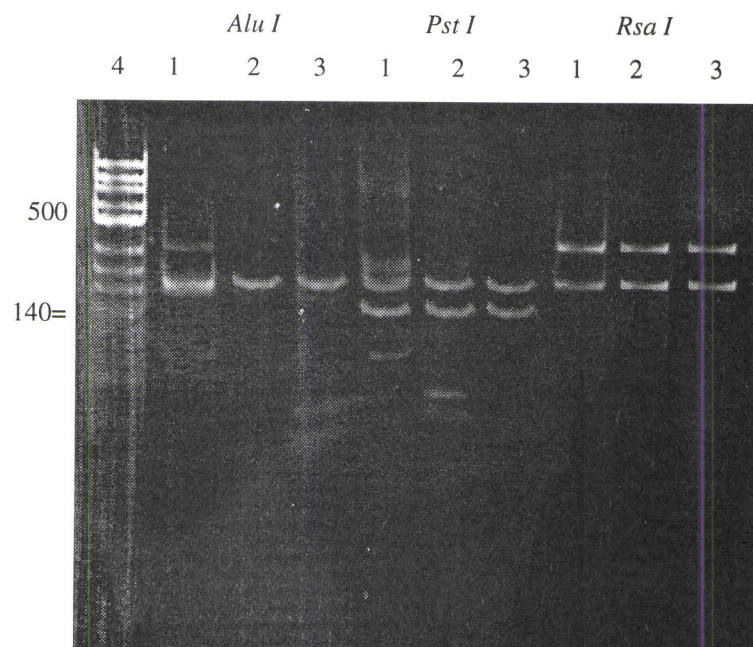


**Figura 16a.** Estirpes PoHuR915/94 e PoHuR1021/95. Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (*primers* Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu* I, *Pst* I e *Rsa* I.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

morr = *R. conorii* marroquina; PoHuR = *Portugal Human Rickettsia*, estirpes 915/94 e 1021/95.



**Figura 16b.** Estirpes PoHuR915/94 e PoHuR1021/95. Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (*primers* Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I*.

**Legendas:**

1 = *R. conorii* marroquina; 2 = PoHuR915/94; 3 = PoHuR1021/95; 4 =  $\phi$ X174.

### 3. ESTIRPES ISOLADAS DE IXODÍDEOS

#### 3.1. Estirpes isoladas de *Dermacentor marginatus*

Na figura 17 estão apresentados os perfis de restrição das 21 estirpes isoladas de *D. marginatus*. Por comparação com os perfis das rickettsias utilizadas como padrão estas estirpes foram classificadas como *R. slovacca*. Observam-se em 17a a representação esquemática dos perfis do fragmento do gene que codifica a proteína de 190kDa obtidos com as endonucleases de restrição *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I*. Representou-se, ainda, os perfis de restrição de *R. slovacca* obtidos com as mesmas enzimas e o do ADN marcador  $\phi$ X174 digerido com *Hinf I*. Em 17b encontram-se as imagens fotográficas.



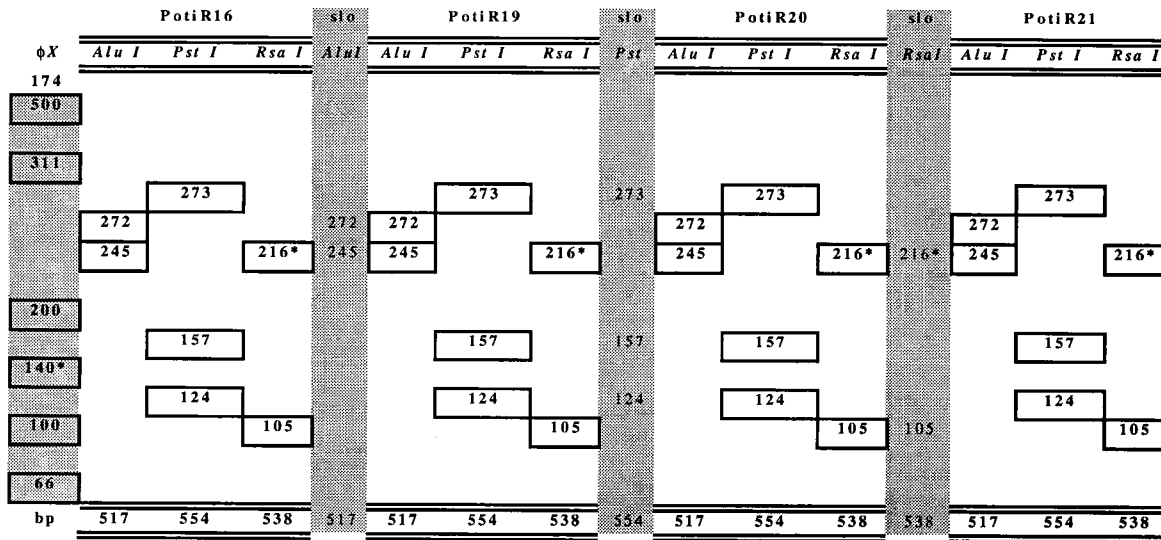


Figura 17a (cont). Representação esquemática dos perfis de restrição das estirpes de rickettsia isoladas de *D. marginatus*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

Legendas:  
PoTiR= Portugal Tick Rickettsia; slo = Rickettsia slovaca.

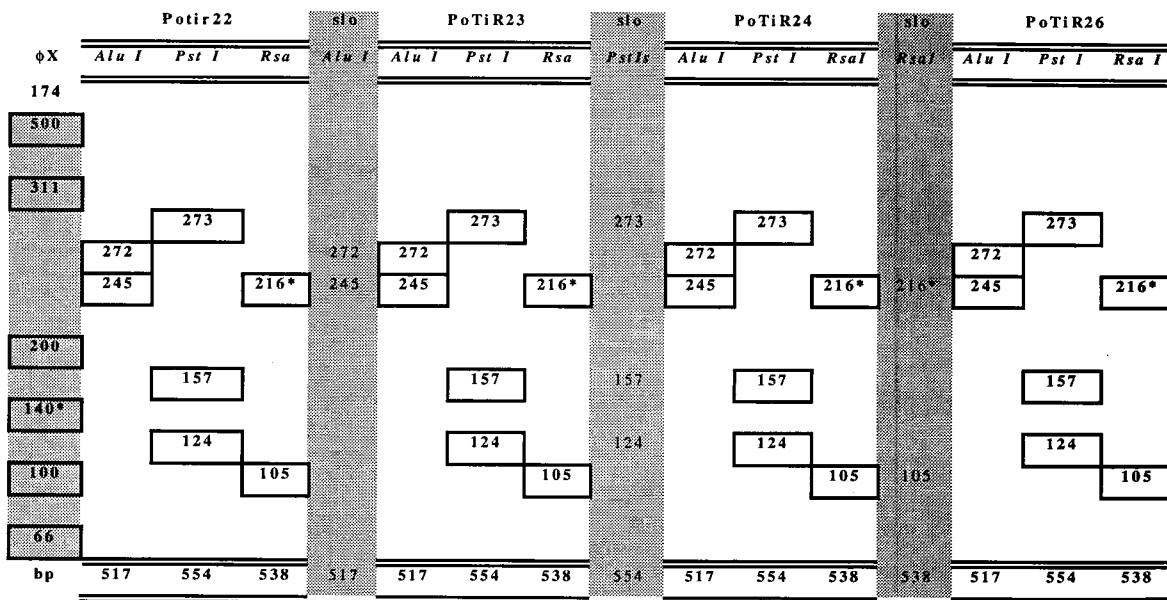


Figura 17a (cont). Representação esquemática dos perfis de restrição das estirpes de rickettsia isoladas de *D. marginatus*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

Legendas:  
PoTiR = Portugal Tick Rickettsia; slo = Rickettsia slovaca.

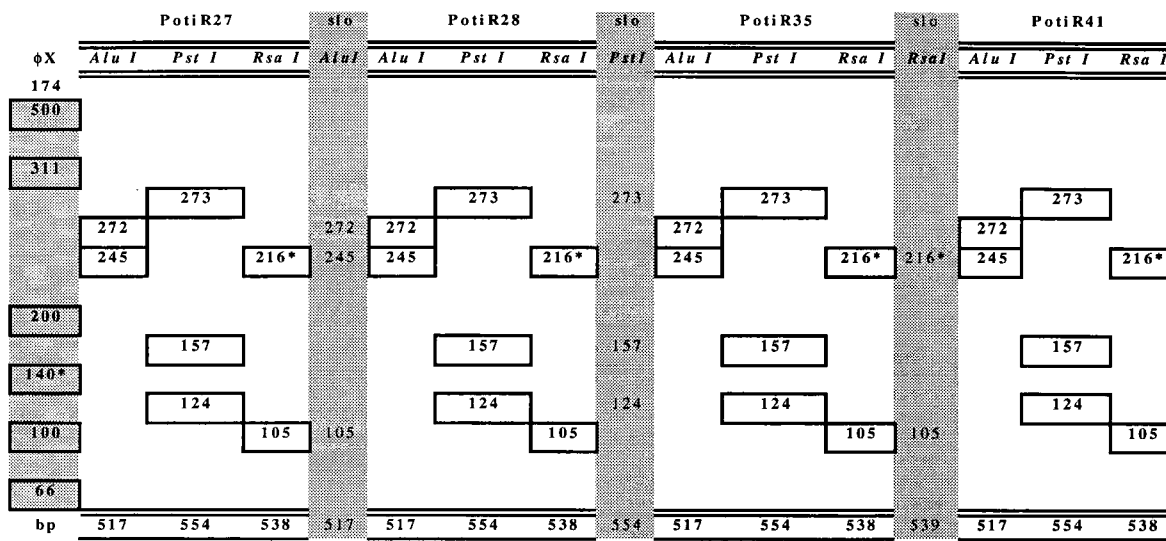


Figura 17a (cont). Representação esquemática dos perfis de restrição das estirpes de rickettsia isoladas de *D. marginatus*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*; slo = *Rickettsia slovaca*.

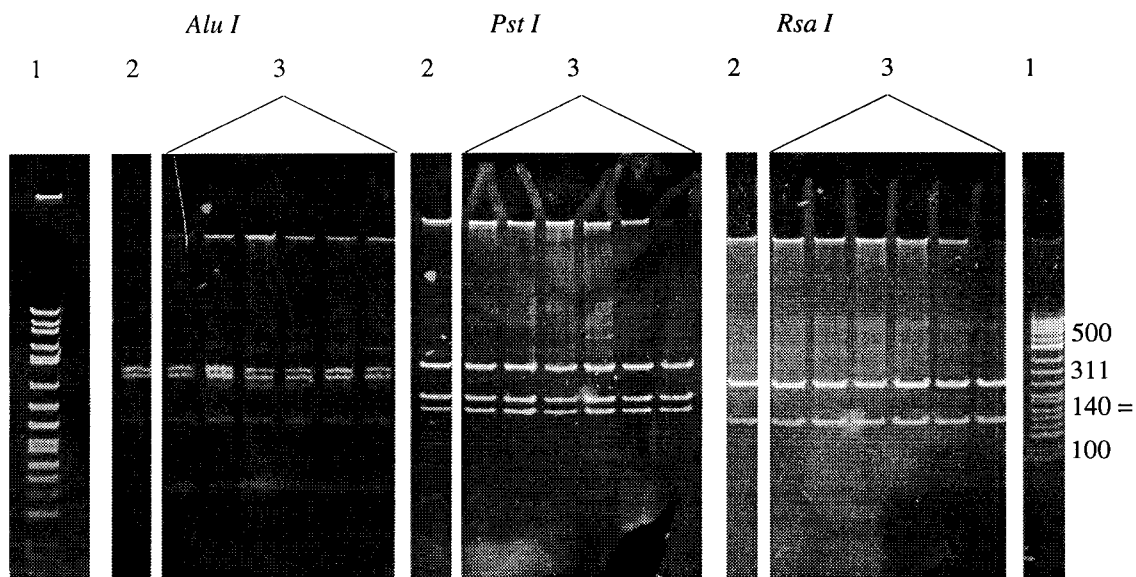
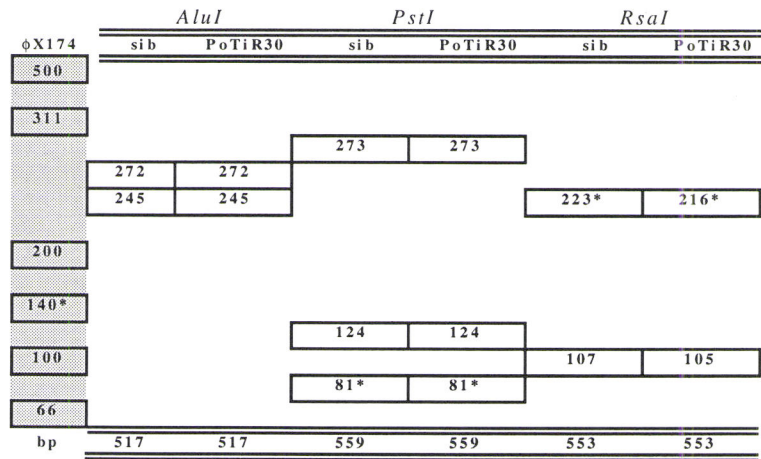


Figura 17b. Imagem fotográfica dos perfis de restrição do fragmento do ADN do gene que codifica a proteína de 190kDa (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* das estirpes de rickettsia isoladas de *D. marginatus*.

**Legendas:**

1 = φX174; 2 = *R. slovaca*; 3 = PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.

Na figura 18 estão representados os esquemas (18a) e as imagens fotográficas (18b) da estirpe PoTiR30, isolada de *D. marginatus*, que foi classificada como *R. sibirica*.

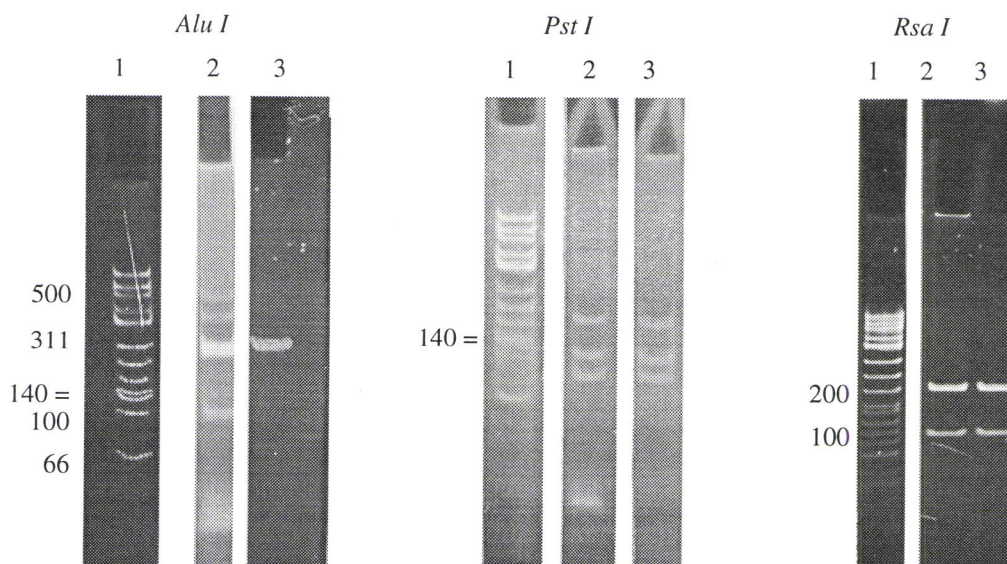


**Figura 18a.** Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (*primers* Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* da estirpe PoTiR30.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legenda:**

sib = *R. sibirica*; PoTiR30 = *Portugal Tick Rickettsia 30*.



**Figura 18b.** Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene que codifica a proteína de 190kDa (*primers* Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* da estirpe PoTiR30.

**Legenda:**

1 = φX174; 2 = PoTiR30 = *Portugal Tick Rickettsia 30*; 3 = *Rickettsia sibirica*.



### 3.2. Estirpes isoladas de *Rhipicephalus sanguineus*

Nas figuras 19, 20 e 21 estão representados os perfis de restrição do gene de "190kDa" das estirpes isoladas de *R. sanguineus*.

Na figura 19a observam-se os esquemas dos perfis do fragmento do gene CS obtidos por digestão com *Alu I*, de todas as estirpes, e em 19b as imagens fotográficas. Nas figuras 20a (esquema) e 20b (fotografia) estão representados os perfis de restrição do gene de "190kDa" das estirpes classificadas como *R. conorii*. Na figura 21 estão representados os perfis de restrição do gene de "190kDa" das estirpes classificadas como Mtu5 (fig.21a esquema e 21b fotografia). Apresentam-se, ainda, os perfis de *R. conori* marroquina e do ADN marcador  $\phi$ X174.

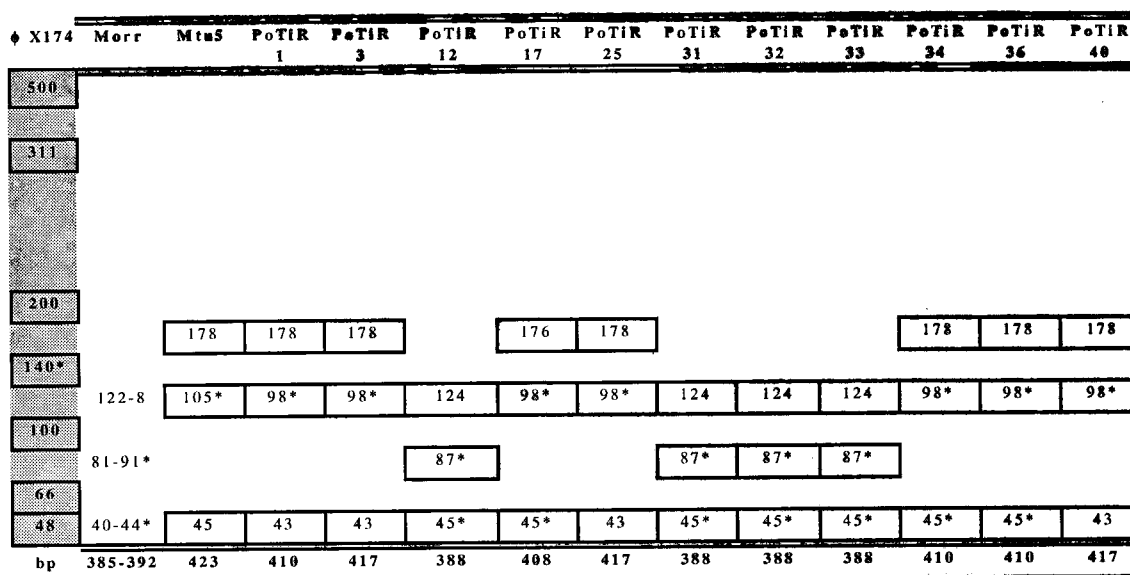


Figura 19a. Esquema dos perfis de restrição do segmento do gene CS (primers RpCs.877p e RpCS.1258n) digerido com a enzima *Alu I* das estirpes isoladas de *R. sanguineus*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legenda:**

morr = *R. conorii* marroquina; mass = *R. massiliae*; Mtu5; PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.

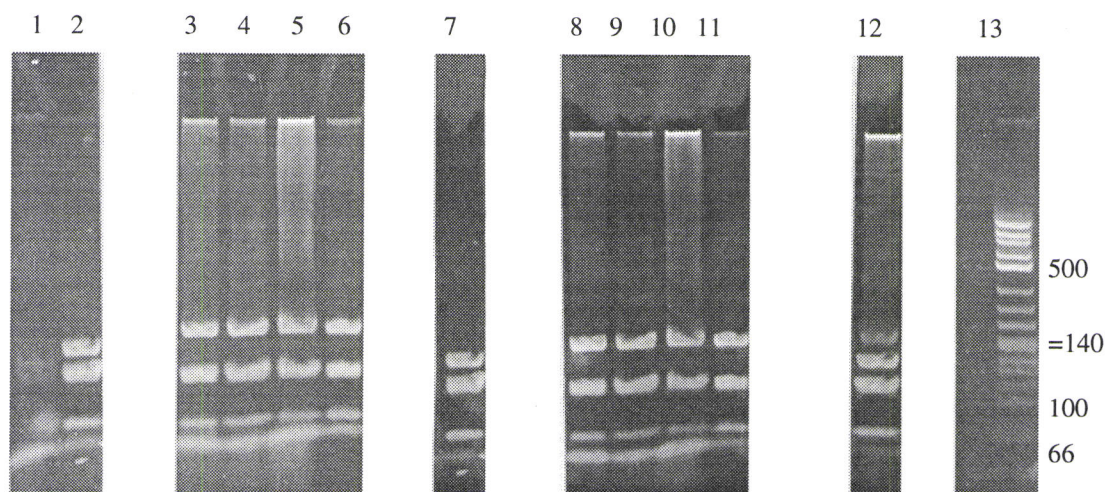


Figura 19b. Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene CS (primers RpCs.877p e RpCS.1258n) digerido com a enzima *Alu I* das estirpes isoladas de *R. sanguineus*.

**Legendas:**

1= *R. conorii marroquina*; 2, 7, 12 = PoTiR12; PoTiR32; PoTiR33, classificadas como *R. conorii*; 3 a 6 e 8 a 11 = PoTiR, classificadas como Mtu5; 13=  $\phi$ X174.

<i>Alu I</i>						<i>Pst I</i>						<i>Rsa I</i>					
7#	PoTiR 12	PoTiR 31	PoTiR 32	PoTiR 33	$\phi$ X 174	7#	PoTR 12	PoTiR 31	PoTiR 32	PoTiR 33	$\phi$ X 174	7#	PoTiR 12	PoTiR 31	PoTiR 32	PoTiR 33	
					500						500						
					311						311		362	362	362	362	
272*	272*	272*	272*	272*		273	273	273	273	273							
						211	211	211	211	211			231	231	231	231	
					200						200						
					140*						140*						
					100						100						
					80	80	80	80	80	80							
					66						66						
544	544	544	544	544	bp	564	564	564	564	564	bp	583	583	583	583	583	

Figura 20a. Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene de "190kDa" (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* das estirpes PoTiR isoladas de *R. sanguineus* classificadas como *R. conorii*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legenda:**

7"= *R. conorii*; PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.

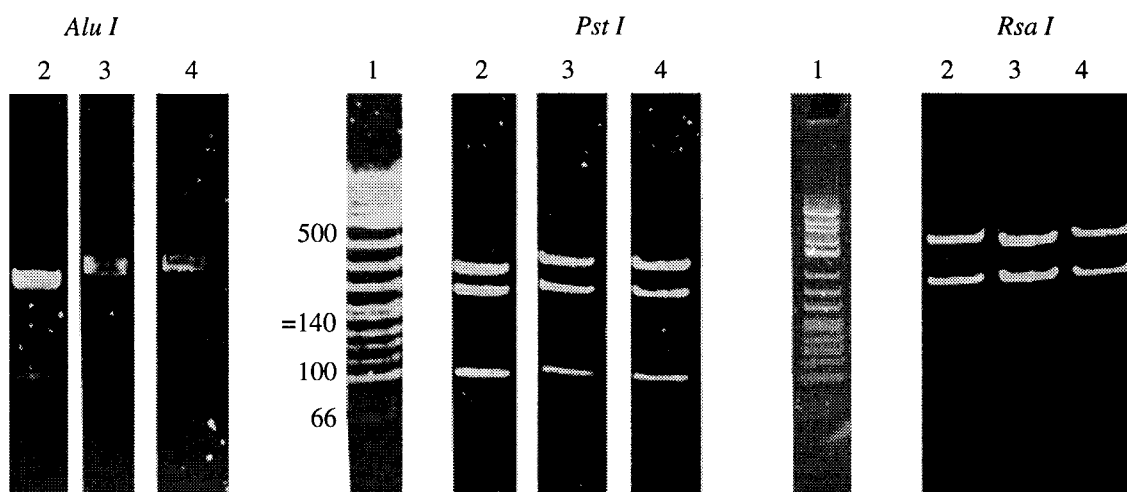


Figura 20b. Imagem fotográfica do segmento do gene de "190kDa" (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* das estirpes PoTiR isoladas de *R. sanguineus* classificadas como *R. conorii*.

**Abreviaturas:**

1 =  $\phi$ X 174; 2 = 7#; 3 = *R. conorii* marroquina; 4 = *Portugal Tick Rickettsia* classificadas como *R. conorii*.

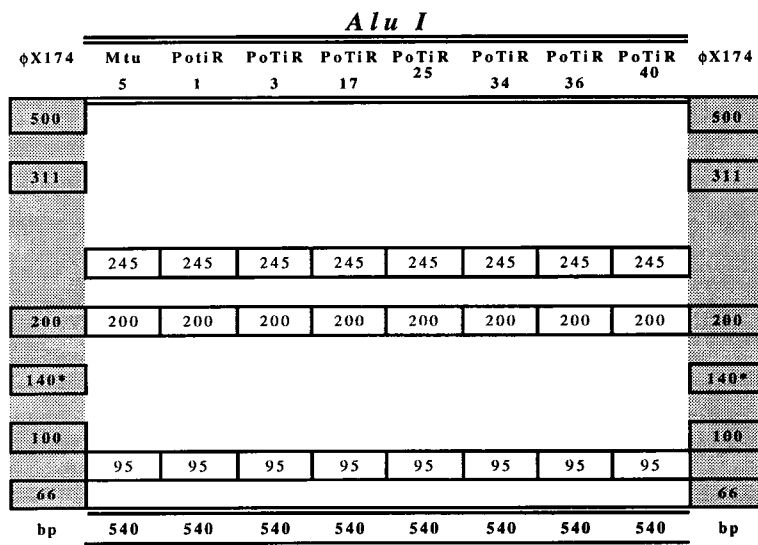
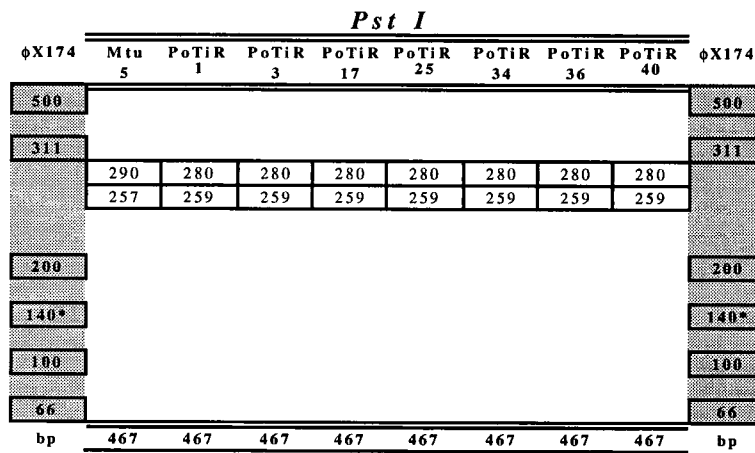


Figura 21a. Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene de "190kDa" (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* das estirpes PoTiR isoladas de *R. sanguineus* classificadas como Mtu5.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

Mtu5 = estirpe isolada de *R. sanguineus*, PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.

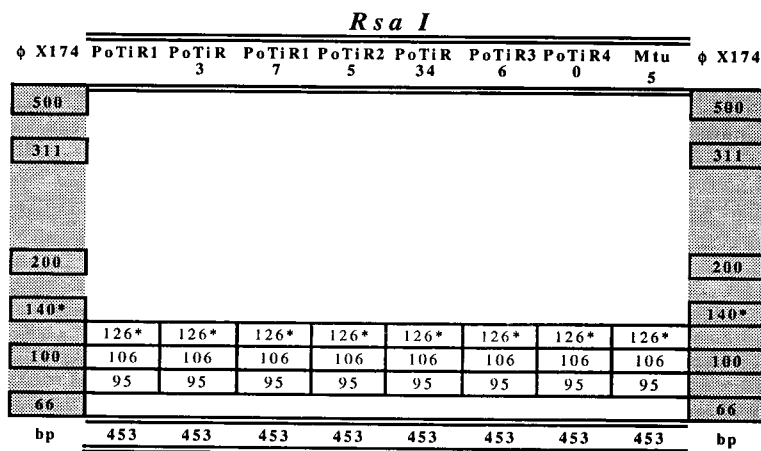


**Figura 21a (cont.).** Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene de “190kDa” (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu* I, *Pst* I e *Rsa* I das estirpes PoTiR isoladas de *R. sanguineus* classificadas como Mtu5.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

Mtu5 = estirpe isolada de *R. sanguineus*, PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.

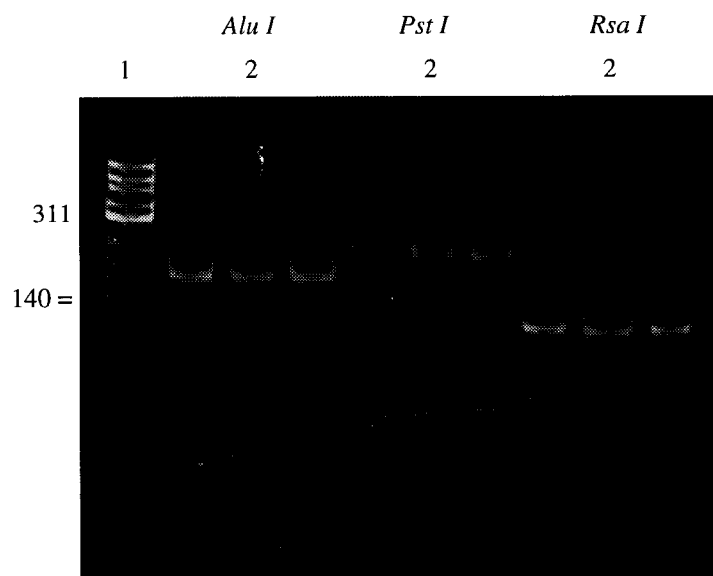


**Figura 21a (cont.).** Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene de “190kDa” (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu* I, *Pst* I e *Rsa* I das estirpes PoTiR isoladas de *R. sanguineus* classificadas como Mtu5.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

Mtu5 = estirpe isolada de *R. sanguineus*, PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.



**Figura 21b.** Imagens fotográficas dos perfis de restrição do segmento do gene de “190kDa” (*primers* Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* das estirpes PoTiR isoladas de *R. sanguineus* classificadas como Mtu5.

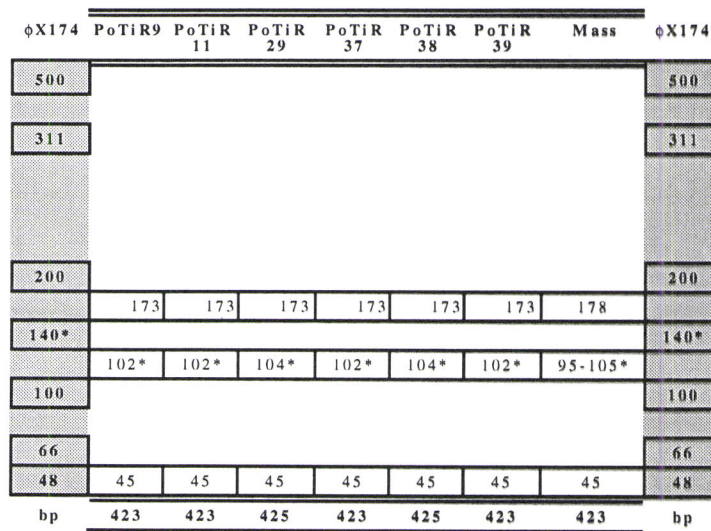
**Legendas:**

1=  $\phi$ X174; 2 = PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia* classificadas como Mtu5.

### 3.3. Estirpes isoladas de *Rhipicephalus turanicus*

Nas figuras 22 e 23 estão apresentados os perfis de restrição das estirpes isoladas de *R. turanicus*. As estirpes PotiR9, PotiR11, PotiR29, PoTiR37, PoTiR38 e PoTiR39 puderam ser classificadas por “PCR-RFLP” como *R. massiliae*.

Observam-se na figura 22 os perfis do segmento do gene CS obtidos por digestão com *Alu I* (Figs.22a- esquema e 22b- fotografia) e na figura 23 os perfis do segmento do gene “190 kDa” obtidos com as endonucleases de restrição *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* (Figs.23a – esquema e 23b – fotografia). Representou-se, ainda, o perfil de *R. massiliae* obtido com as mesmas enzimas e o ADN marcador  $\phi$ X174 digerido com *Hinf I*.

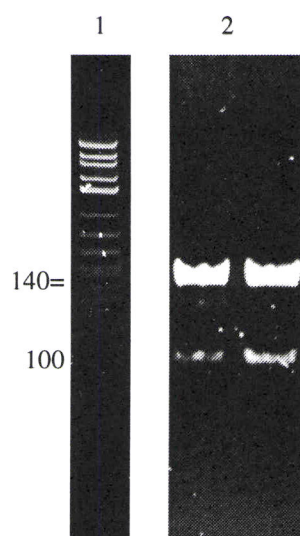


**Figura 22a.** Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene CS (primers RpCs.877p e RpCs.1258n) obtidos com a enzima *Alu I* das estirpes isoladas de *R. turanicus* classificadas como *R. massiliae*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

Mass = *R. massiliae*, PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.



**Figura 22b.** Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene CS (primers RpCs.877p e RpCs.1258n) obtidos com a enzima *Alu I* das estirpes isoladas de *R. turanicus* classificadas como *R. massiliae*.

**Legendas:**

1 =  $\phi$ X174; 2 = PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia* classificadas como *R. massiliae*.

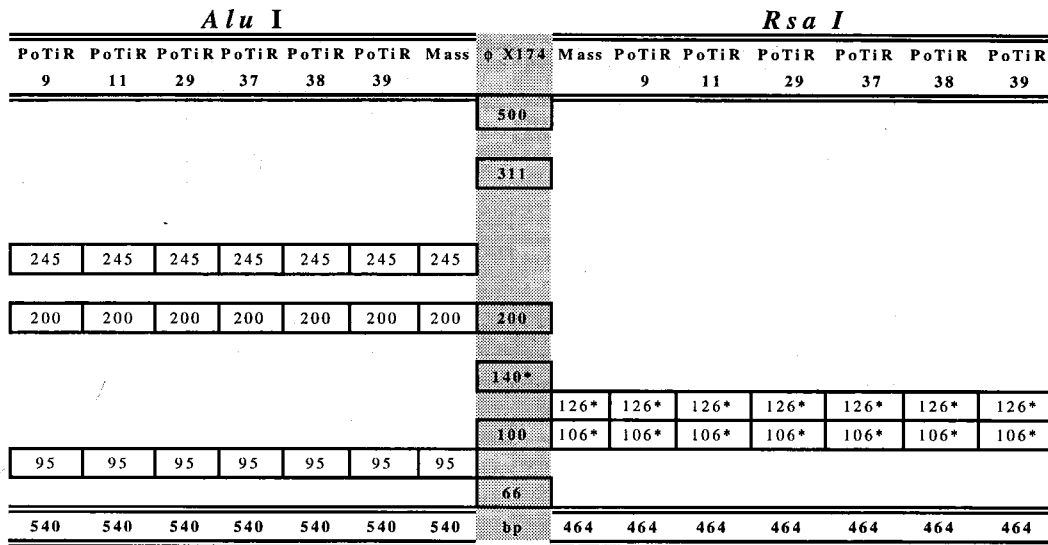


Figura 23a. Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene de “190kDa” (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Rsa I* e *Pst I* das estirpes PoTiR isoladas de *R. turanicus* classificadas como *R. massiliae*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legenda:**

Mass = *R. massiliae*, PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.

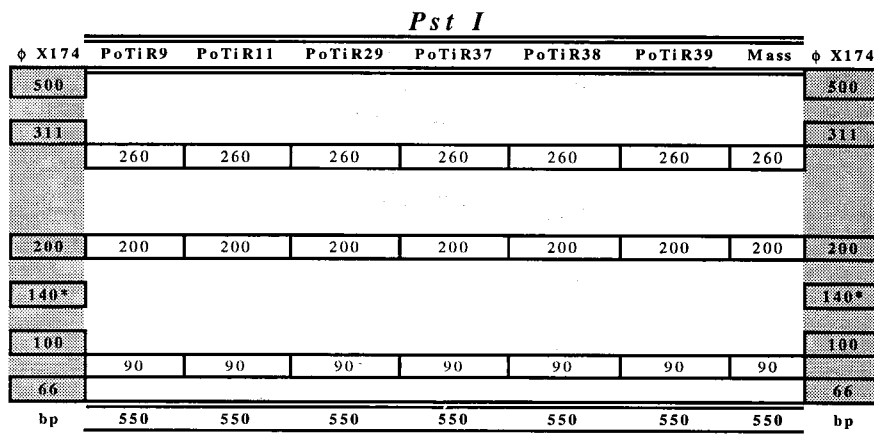


Figura 23a (cont.). Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene de “190kDa” (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* das estirpes PoTiR isoladas de *R. turanicus* classificadas como *R. massiliae*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

Mass = *R. massiliae*, PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.

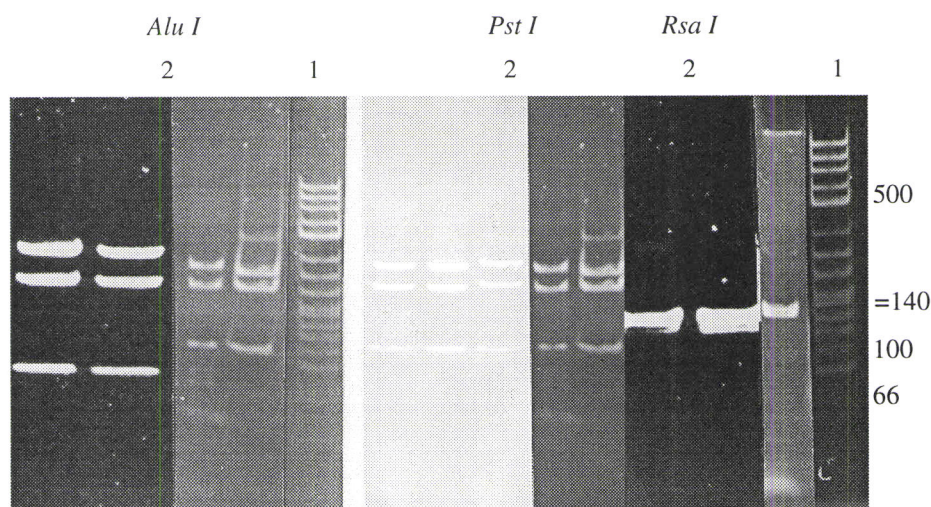


Figura 23b. Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene de “190kDa” (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* das estirpes PoTiR isoladas de *R. turanicus* classificadas como *R. massiliae*.

**Legendas:**

1 =  $\phi$ X174; 2 = PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia* classificadas como *R. massiliae*.

### 3.4. Estirpes isoladas de *Ixodes ricinus* e de *Ixodes ventalloi*

Na figura 24 estão apresentados os perfis de restrição do gene CS da estirpe isolada de *I. ricinus* e de *I. ventalloi* (PoTiR42 e PoTiR43) e, ainda, da espécie padrão *R. helvetica*, digeridos com a enzima *Alu I* (Figs. 24a- esquema e 24b- fotografia). Estas rickettsias não originaram produto quando amplificadas com os “primers” do gene de “190 kDa”.

$\phi$ X174	PoTiR 42	PoTiR 43	hel	$\phi$ X174
500				500
311				311
200				200
140*	135	135	135	140*
100	105	105	105	100
66	95	95	95	66
48	45	45	45	48
bp	390	390	390	bp

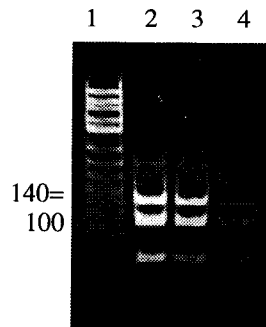
Figura 24a. Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene CS (primers RpCs.877p e RpCs.1258n) obtidos com a enzima *Alu I* das estirpes isoladas de *I. ricinus* e de *I. ventalloi* classificadas como *R. helvetica*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

hel = *R. helvetica*; PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*.





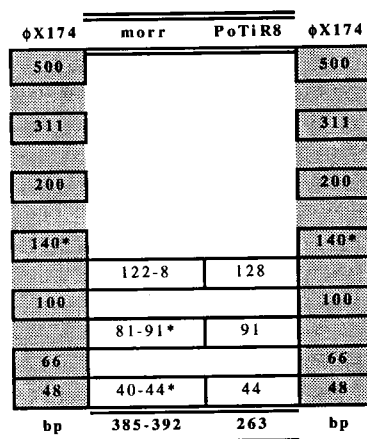
**Figura 24b.** Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene CS (*primers* RpCs.877p e RpCs.1258n) obtidos com a enzima *Alu* das estirpes isoladas de *I. ricinus* e de *I. ventralloi* classificadas como *R. helvetica*.

**Legendas:**

1 =  $\phi$ X174; 2 = *R. helvetica*; 3 = PoTiR 42 = *Portugal Tick Rickettsia* isolada de *I. ricinus*; 4 = PoTiR 43 = *Portugal Tick Rickettsia* isolada de *I. ventralloi*.

### 3.6. Estirpe isolada de *Hyalomma marginatum*

Nas figuras 25 e 26 estão apresentados os esquemas dos perfis de restrição da estirpe isolada de *H. marginatum*, PoTiR8. Observam-se os perfis de restrição do segmento do gene CS obtidos por digestão com *Alu* I nas figuras 25a (esquema) e 25b (fotografia). Nas figuras 26a (esquema) e 26b (fotografia) observam-se os perfis do segmento do gene “190 kDa” obtidos com as endonucleases de restrição *Alu* I, *Pst* I e *Rsa* I. Neste último caso representou-se, esquematicamente, os perfis de *R. conorii*, *R. rhipicephali*, *R. massiliae* e da estirpe Mtu5 digeridos com as mesmas enzimas e o ADN marcador  $\phi$ X174 digerido com *Hinf* I. PoTiR8 foi classificada, provisoriamente, como *R. aeschlimannii* e é semelhante a outras estirpes encontradas no Zimbabué e em Marrocos, na mesma espécie de ixodídeo (Beati *et al*, 1995).

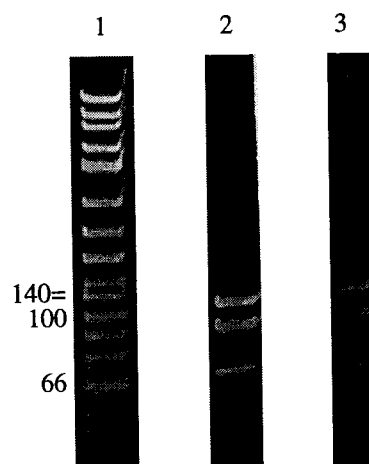


**Figura 25a.** Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene CS (primers RpCs.877p e RpCs.1258n) obtidos com a enzima *Alu I* da estirpe PoTiR8 isolada de *H. marginatum*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legendas:**

morr = *R. conorii marroquina*; PoTiR8 = *Portugal Tick Rickettsia*.



**Figura 25b.** Imagem fotográfica dos perfis de restrição do segmento do gene CS (primers RpCs.877p e RpCs.1258n) obtidos com a enzima *Alu I* da estirpe PoTiR8 isolada de *H. marginatum*.

**Legendas:**

1=  $\phi$ X174; 2= PoTiR = *Portugal Tick Rickettsia*; 3= *R. conorii marroquina*.

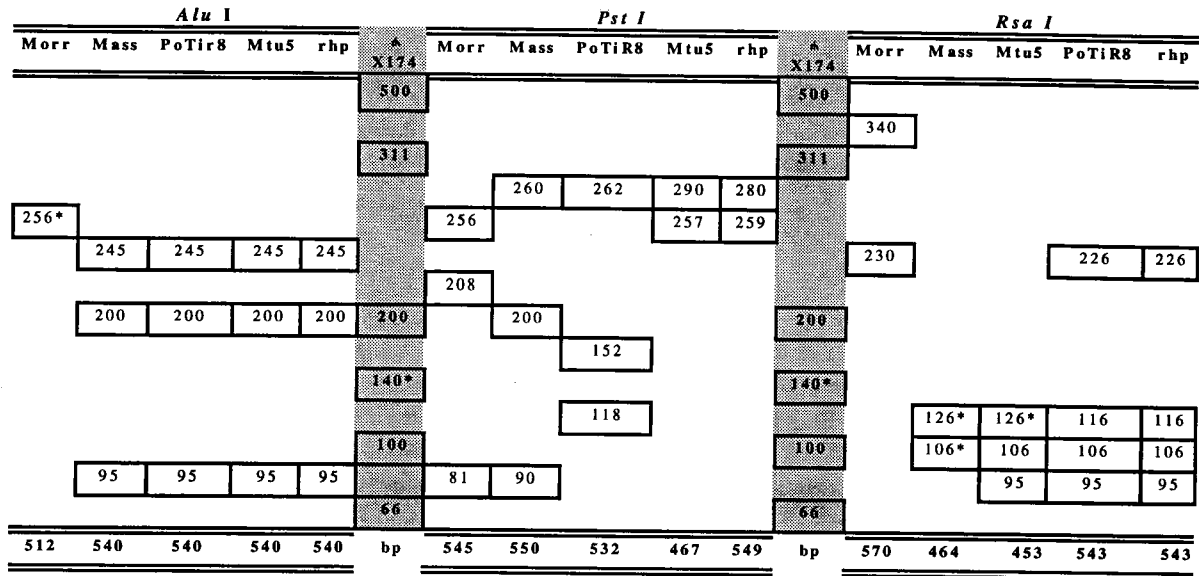


Figura 26a. Representação esquemática dos perfis de restrição do segmento do gene de "190kDa" (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* da estirpe PoTiR8 isolada de *H. marginatum*.

O esquema representa a migração dos fragmentos de ADN, após eletroforese, de cima para baixo. O comprimento dos fragmentos é medido em pares de bases (bp). Os fragmentos duplos estão representados com um asterisco.

**Legenda:**

morr = *R. conorii* marroquina; rph = *R. rhipicephali*; mass = *R. massiliae*; Mtu5; PoTiR8= estirpe isolada de *H. marginatum*.

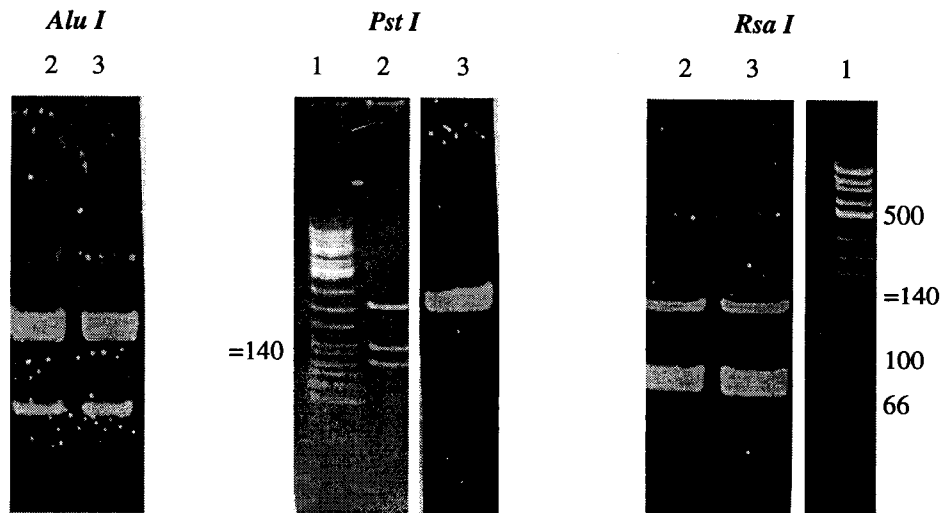


Figura 26b. Imagens fotográficas dos perfis de restrição do segmento do gene de "190kDa" (primers Rr190.70p e Rr190.602n) obtidos com as enzimas *Alu I*, *Pst I* e *Rsa I* da estirpe PoTiR8 isolada de *H. marginatum*.

**Legendas:**

1=  $\phi$ X174; 2 = *R. rhipicephali*; PoTiR8 = Portugal Tick Rickettsia isolada de *H. marginatum*.

## **VI**

### **Resultados do Estudo por Microscopia Electrónica de Transmissão de Algumas das Estirpes Isoladas**



Apresentam-se a seguir algumas das imagens obtidas em microscopia electrónica de transmissão de estirpes de rickettsias isoladas em Portugal. O estudo, ao 3.º e 5.º dia, foi realizado com *R. conorii* marroquina e com a estirpe PoTiR12, isolada de *R. sanguineus* e classificada como *R. conorii*. A espécie padrão foi utilizada para controlo e comparação. As estirpes PoHu915/94, isolada de sangue humano e classificada como *R. conorii*, PoTiR10, isolada de *D. marginatus* e classificada como *R. slovacica* e PoTiR8, isolada de *H. marginatum* e classificada como "*R. aeschlimanni*" foram estudadas apenas ao 5.º dia após a infecção.

As rickettsias, de todas as estirpes estudadas, apresentaram um formato cocóide ou bacilar, uma ultraestrutura de parede semelhante a das bactérias Gram negativas, membrana citoplasmática e muitos ribossomas no citoplasma.

Nas células hospedeiras os microrganismos localizaram-se ao 3.º dia, preferencialmente, à periferia da célula. No entanto, também foram observados dispersos no citoplasma, livres no citosol e, mais raramente, no núcleo. Ainda foram observadas algumas rickettsias extracelulares. Confirmou-se que a multiplicação faz-se por divisão binária e que o número de rickettsias por célula hospedeira não é elevado. Encontraram-se imagens de internalização no núcleo e no citoplasma. O processo de internalização no núcleo envolveu a invaginação da membrana nuclear e as imagens sugeriram que, no nucleoplasma, mantiveram-se envolvidas por esta membrana. Em alguns vacúolos celulares, presumivelmente organelos digestivos, observaram-se algumas rickettsias em processo de degeneração. A célula hospedeira não se rompeu com a multiplicação das bactérias, mas foi afectada. Foram observadas alterações a nível das mitocôndrias, muito numerosas, algumas com dimensões aumentadas; alterações no retículo endoplasmático; muitos vacúolos e desorganização geral do citoplasma e do núcleo, especialmente ao 5.º dia.

## 1. ESPÉCIE PADRÃO *R. CONORII* MARROQUINA

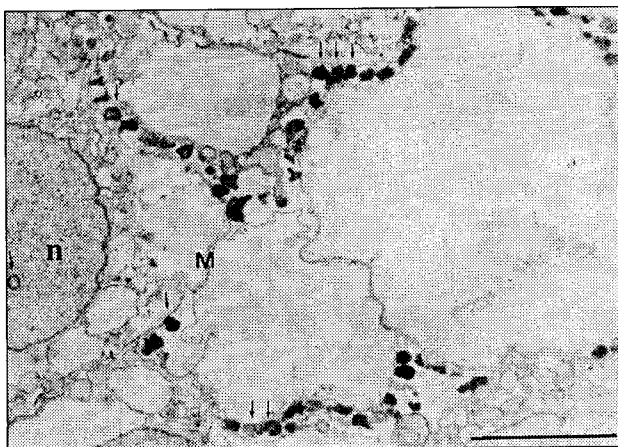
Na figura 27 (a-f) podem ser observadas as imagens obtidas com o estudo de *R. conorii* marroquina, espécie padrão. Nas imagens obtidas com culturas fixadas ao 3.º dia (Fig. 27a) observaram-se os microrganismos à periferia da célula, enquanto que ao 5.º dia (Fig. 27b) distribuíram-se pelo citoplasma. Em culturas mais velhas observaram-se muitas rickettsias em degeneração (Fig. 27c), por vezes circundadas por uma membrana vacuolar. Foram observadas também imagens de internalização no núcleo da célula hospedeira (Fig. 27d, 27e, 27f).

## Infecção de células Vero E6 com *R. conorii* marroquina, espécie padrão

### Aspectos gerais da infecção

**Legenda:**

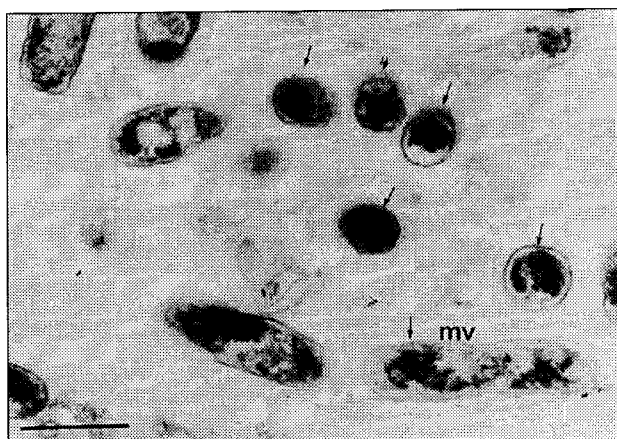
As setas indicam as rickettsias; n = núcleo; mn = membrana nuclear; m = mitocôndria; M = membrana da célula; mv = membrana do vacuolo.



*Figura 27a.* Ao 3.º dia – Rickettsias na periferia do citoplasma .



*Figura 27b.* Ao 5.º dia, Rickettsias dispersas no citoplasma.



*Figura 27c.* Ao 5.º dia, Rickettsias em degeneração.

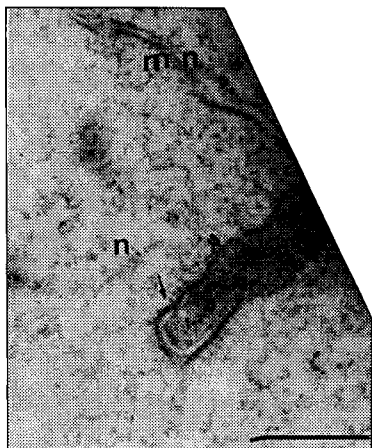


Figura 27d

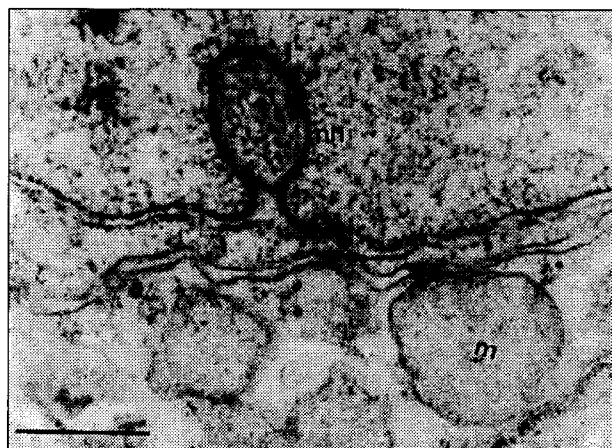


Figura 27e

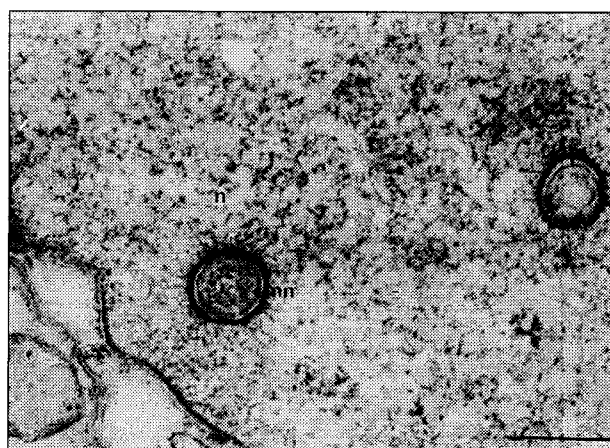


Figura 27d-f. 3.º dia de infecção. Aspectos da internalização de rickettsias no núcleo.

## 2. ESTIRPE DE *R. CONORII* ISOLADA DE *R. SANGUINEUS*

Na figura 28 (a-g) podem ser vistas imagens semelhantes, obtidas com PoTiR12. Observou-se ao 3.º dia a distribuição característica das rickettsias dispersas no citoplasma (Fig.28a) e a localização intranuclear (Fig. 28d). Nas células hospedeiras, ao 5.º dia, observaram-se a desorganização no citoplasma, vacúolos e também mitocôndrias de maiores dimensões (Fig.28b), comparativamente com as células infectadas ao 3.º dia (Fig.28c). Apresenta-se, igualmente, imagens de uma rickettsia em divisão binária (Fig.28e), de uma em degeneração dentro de um vacúolo (Fig.28f) e ainda uma constituição normal (Fig.28g).

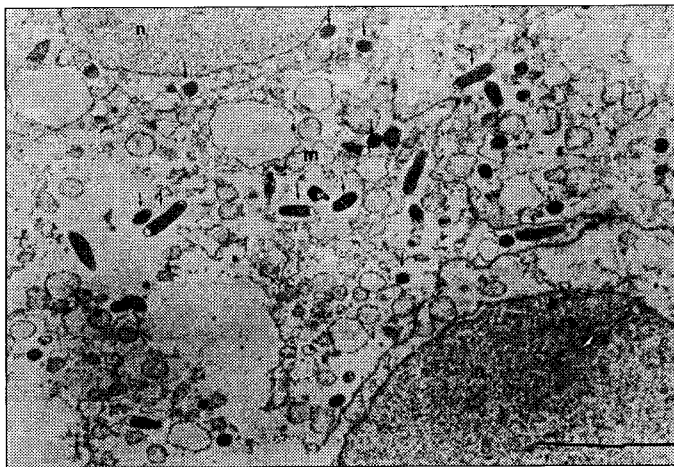


## Infecção de células Vero E6 com PoTiR12, isolada de *R. sanguineus*, classificada como *R. conorii*.

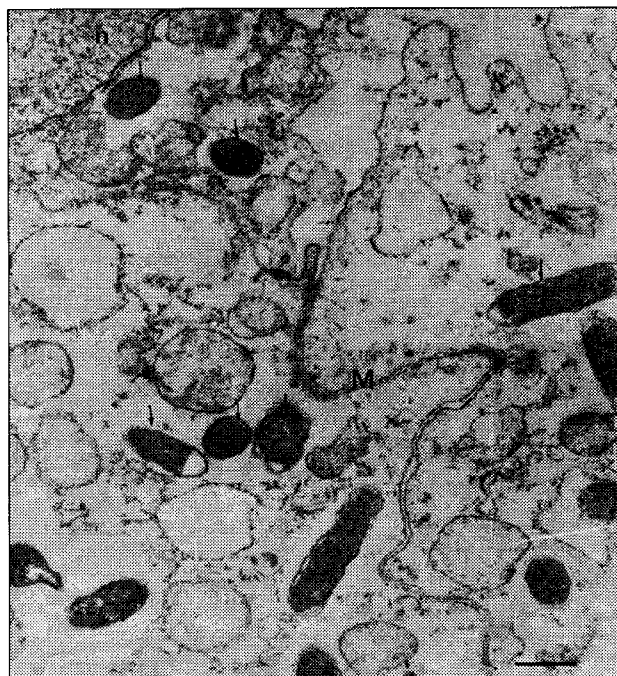
### Aspectos gerais da infecção

#### Legenda:

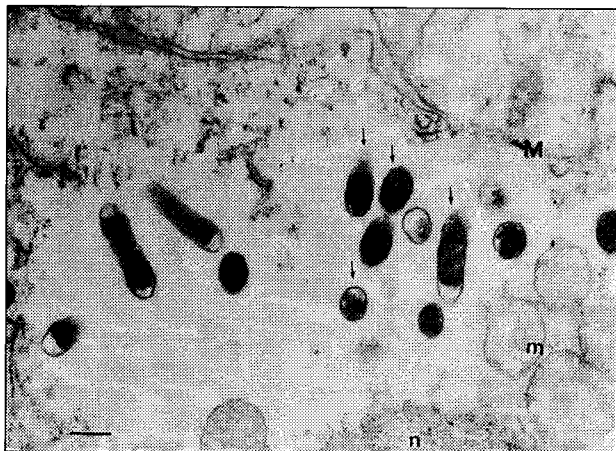
As setas indicam as rickettsias; n = núcleo; mn = membrana nuclear m =mitocôndria; M =membrana da célula; mv = membrana do vacuolo; cm = camada mucosa.



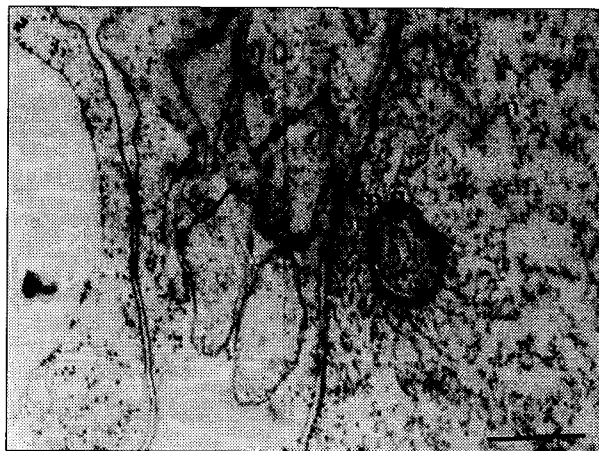
*Figura 28a.* Ao 3.º dia de infecção, Rickettsias dispersas no citoplasma.



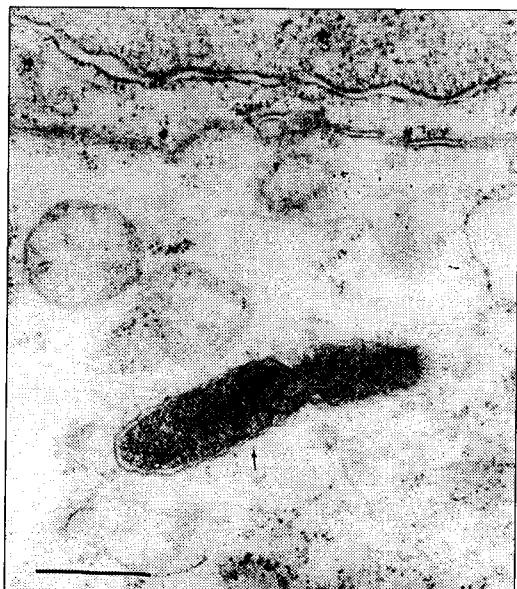
*Figura 28b.* Ao 3.º dia de infecção. Citoplasma vacuolizado.



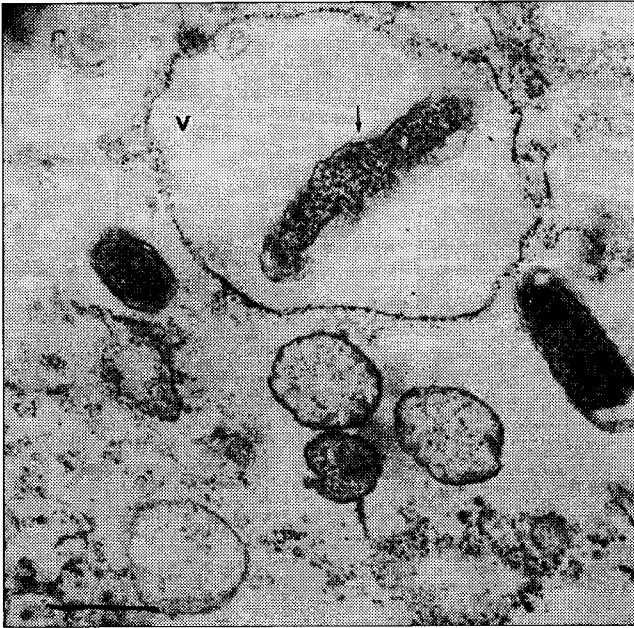
*Figura 28c.* Ao 5.º dia de infecção, Rickettsias dispersas no citoplasma, núcleo compacto.



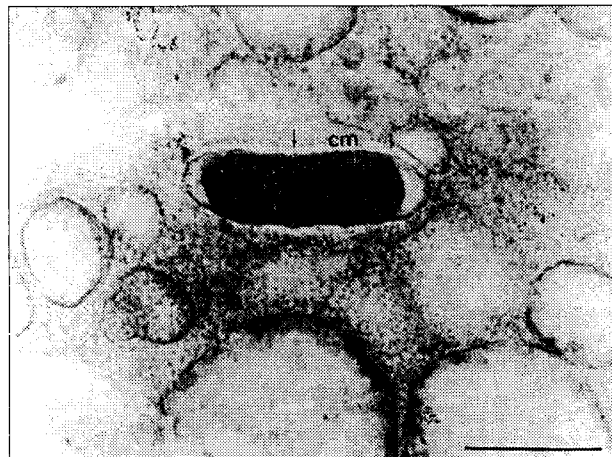
*Figura 28d.* Ao 3.º dia de infecção Rickettsia localizada intranuclearmente



*Figura 28e.* Ao 3.º dia de infecção, Rickettsia em divisão binária no citoplasma



**Figura 28f.** Ao 5.º dia de infecção, Rickettsia em degeneração dentro de um vacúolo.



**Figura 28g.** Ao 5.º dia de infecção, Rickettsia em secção transversal.

### 3. ESTIRPE DE *R. SLOVACA* ISOLADA DE *D. MARGINATUS*

Na figura 29 (a-e) podem-se observar imagens de PoTiR10. Comparando com as imagens anteriores, o efeito produzido por esta estirpe de rickettsia nas células hospedeiras não é tão evidente. O citoplasma das células apresenta uma granulação homogénea, poucos vacúolos e mitocôndrias com dimensões normais (Fig.29a e Fig.29b). Em algumas imagens as rickettsias aparecem com um halo que corresponderia à camada mucosa (Fig.29c e Fig.29d). Observaram-se ainda imagens de rickettsias em divisão (Fig.29d e Fig.29e).

**Infecção de células Vero E6 com PoTiR10, isolada de *D. marginatus*,  
classificada como *R. slovacca*.**

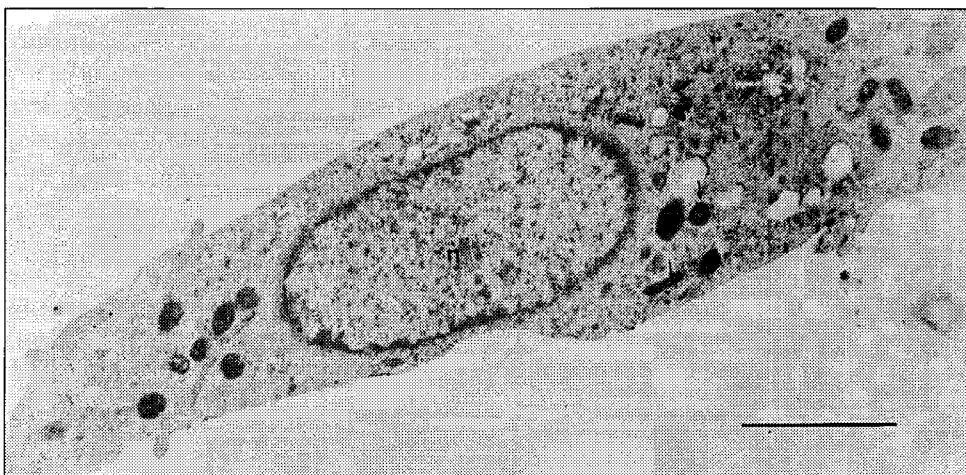
**Aspectos gerais da infecção ao 5.º dia de infecção**

**Legenda:**

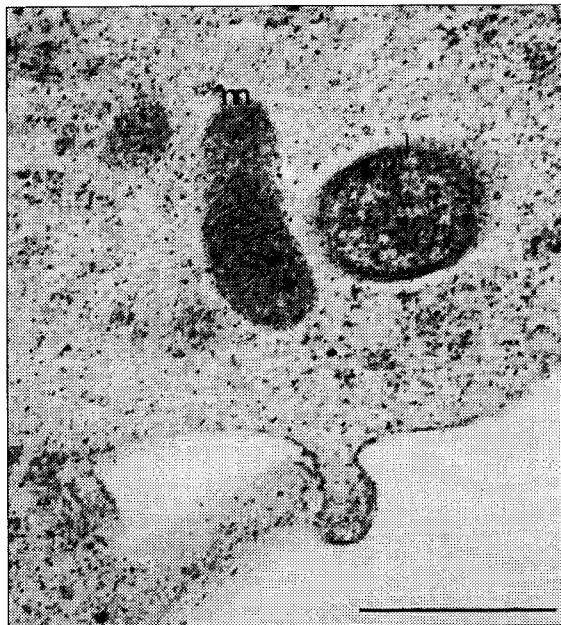
As setas indicam as rickettsias; n = núcleo; mn = membrana nuclear m = mitocôndria; M = membrana da célula; mv = membrana do vacuolo; cm = camada mucosa.



*Figura 29a.* Rickettsias dispersas no citoplasma



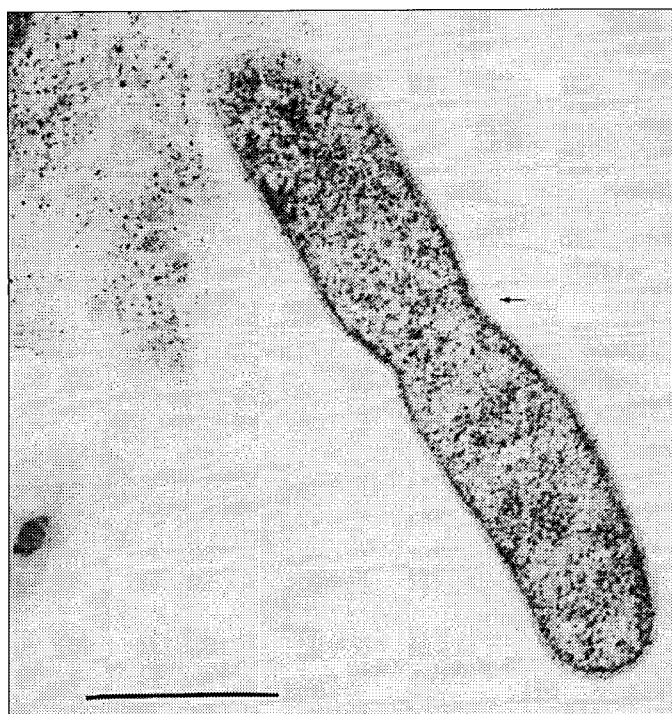
*Figura 29b.* Células hospedeiras sem efeitos evidentes de reação à infecção.



*Figura 29c.* Rickettsia em secção transversal e mitocôndria em secção longitudinal.



*Figura 29d.* Rickettsia em divisão binária



*Figura 29e.* Rickettsia em divisão binária

#### 4. ESTIRPE ISOLADA DE *H. MARGINATUM*

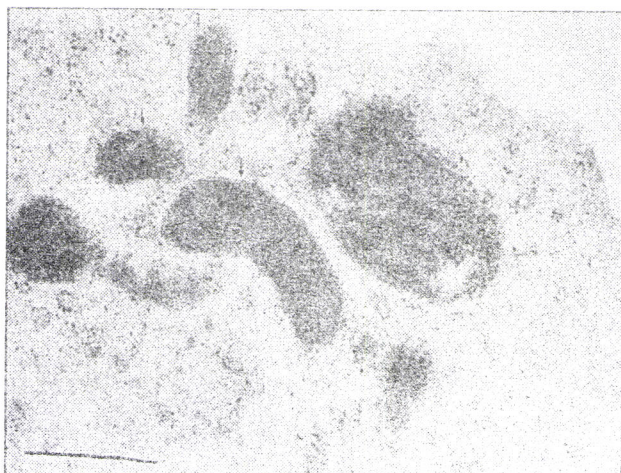
Na figura 30 (a-b) podem ser observadas imagens de PoTiR8. Esta estirpe, ao 5.º dia, induziu um grande “stress” oxidativo nas células hospedeiras, como pode ser observado pelas dimensões das mitocôndrias (Fig.30a e Fig.30b) e pela vacuolização do citoplasma.

#### Infecção de células Vero E6 com PoTiR8, isolada de *H. marginatum*, classificada como “*R. aeschlimanni*”

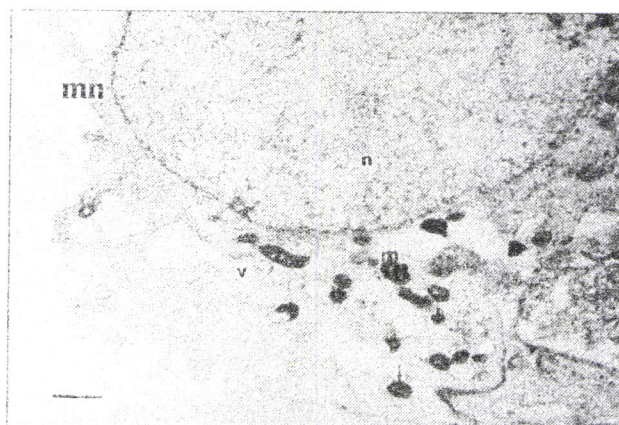
##### Aspectos gerais da infecção ao 5.º dia

##### Legenda:

As setas indicam as rickettsias; n = núcleo; mn = membrana nuclear m = mitocôndria



**Figura 30a.** Rickettsias dispersas no citoplasma. Células hospedeiras com grandes mitocôndrias.



**Figura 30b.** Rickettsias dispersas no citoplasma. Células hospedeiras com citoplasma vacuolizado.

## 5. ESTIRPE ISOLADA DE SANGUE HUMANO

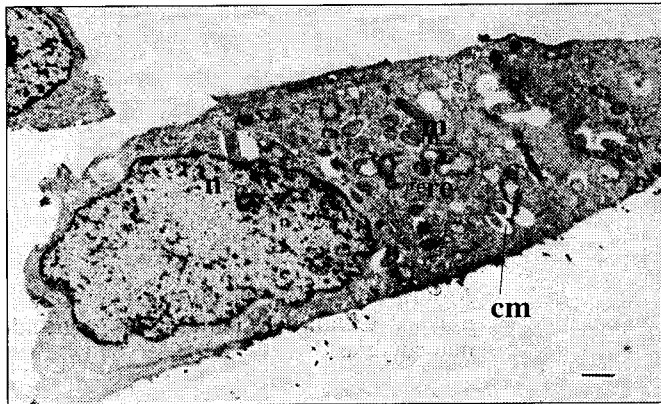
Na figura 31 (a-b) podem ser vistas imagens das estirpe isolada do sangue humano, PoTiR915/94. Pode ser observado que nas células infectadas com esta estirpe o retículo endoplasmático estava mais desenvolvido, muitas mitocôndrias (Fig.31a) e, também, algumas células completamente desorganizadas ao lado de células aparentemente saudáveis (Fig.31b).

### Infecção de células Vero E6 com PoHu915/94, isolada de sangue humano, classificada como *R. conorii*

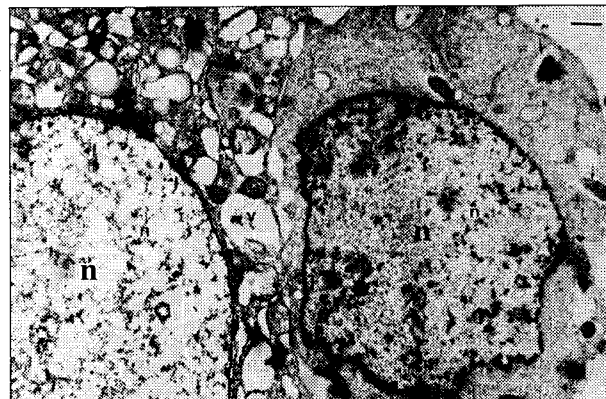
#### Aspectos gerais da infecção ao 5.º dia

##### Legenda:

As setas indicam as rickettsias; n = núcleo; m = mitocôndria; v = vacúolo; mv = membrana do vacuolo; cm = camada mucosa; re = retículo endoplasmático.



**Figura 31a.** Rickettsias dispersas no citoplasma. Células hospedeiras com retículo endoplasmático desenvolvido, muitas mitocôndrias.



**Figura 31b.** Células hospedeiras com imagens de desorganização do núcleo ao lado de células com aspecto normal.

## **VII**

### **Resultados dos Estudos Seroepidemiológicos**





## 1. PESQUISA DE ANTICORPOS CONTRA *R. CONORII* EM SOROS HUMANOS

Durante os trabalhos experimentais relacionados com a preparação da presente dissertação foram estudados, no Laboratório de Rickettsias do CEVDI, 2249 soros humanos recorrendo à técnica de imunofluorescência indirecta (IFA). Cerca da metade dos soros foi recebida para diagnóstico serológico de febre escaro nodular. O remanescente dos soros foi estudado em diversos inquéritos serológicos. Apresentam-se a seguir os resultados destes estudos.

### 1.2. Diagnóstico serológico de Febre escaro nodular

Durante os anos de 1992 a 1995 foram analisados pela técnica de IFA 1256 soros humanos pesquisando anticorpos contra o antigénio de *R. conorii*. Nas figuras 30 e 31 apresentam-se os resultados obtidos.

No ano de 1992, a serologia iniciou-se em Julho pelo que o número de análises foi menor do que nos anos seguintes, embora a percentagem de positivos encontrada fosse de cerca de 32 %. Na realidade, tendo em conta que nos anos seguintes houve uma média de 400 análises realizadas para o diagnóstico serológico de Febre escaro nodular, esta percentagem de positivos corresponderia apenas aos casos analisados no pico da incidência da doença. O ano em que se encontraram maior número de soros positivos foi o ano de 1993 (21%).

A distribuição do número de soros ao longo dos anos mostrou que o número de pedidos de análise, bem como o número de casos positivos encontrados, foram maiores nos meses de Julho a Setembro. Este resultado está de acordo com o que se conhece sobre a epidemiologia da Febre escaro nodular nos países mediterrânicos. O ciclo vital de *R. sanguineus*, artrópodo vector de *R. conorii*, segundo os ixodologistas, pode se completar entre 1,5 e 5 meses, iniciando a procura do hospedeiro quando a temperatura aumenta e a humidade diminui (condições primaveris) (Júlio, 1991; Dias, 1994). Teoricamente, as condições para a infecção do homem em Portugal, estariam reunidas a partir de meados de Abril, com a eclosão das larvas e as mudas das ninfas e dos adultos. Verificou-se nos biotopos estudados que o número de artrópodos adultos a parasitar o cão aumenta durante esta época, diminuindo até o Verão. No entanto, os casos de Febre escaro nodular atingem um pico entre Agosto e Setembro. Este último facto poderia ser explicado se fosse admitido que seriam as larvas e/ou as ninfas, que eclodem dos ovos

postos pelas fêmeas que se alimentaram na Primavera, as responsáveis pela transmissão da rickettsia ao Homem. Esta hipótese seria plausível também porque se considera que *R. sanguineus* no ciclo antropozoonótico é essencialmente monotrópico, isto é, todos os estadios se alimentam no hospedeiro de eleição – o cão e portanto entrariam facilmente em contacto com o Homem (Rehacek e Tarasevich, 1988; Dias, 1994).

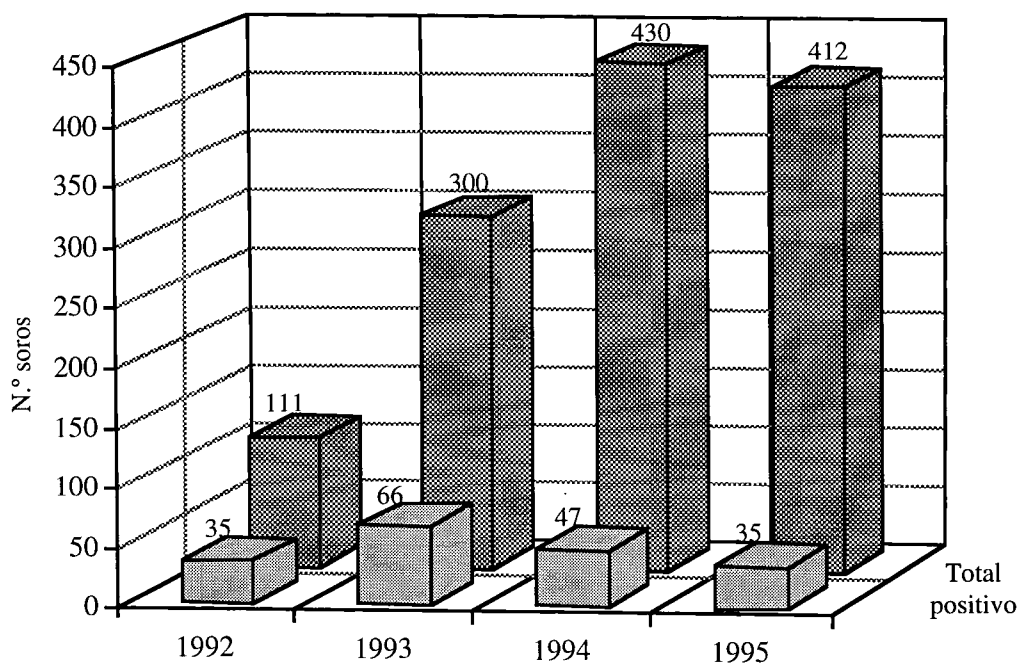


Figura 30. Serologia de Febre escaro nodular (anual).

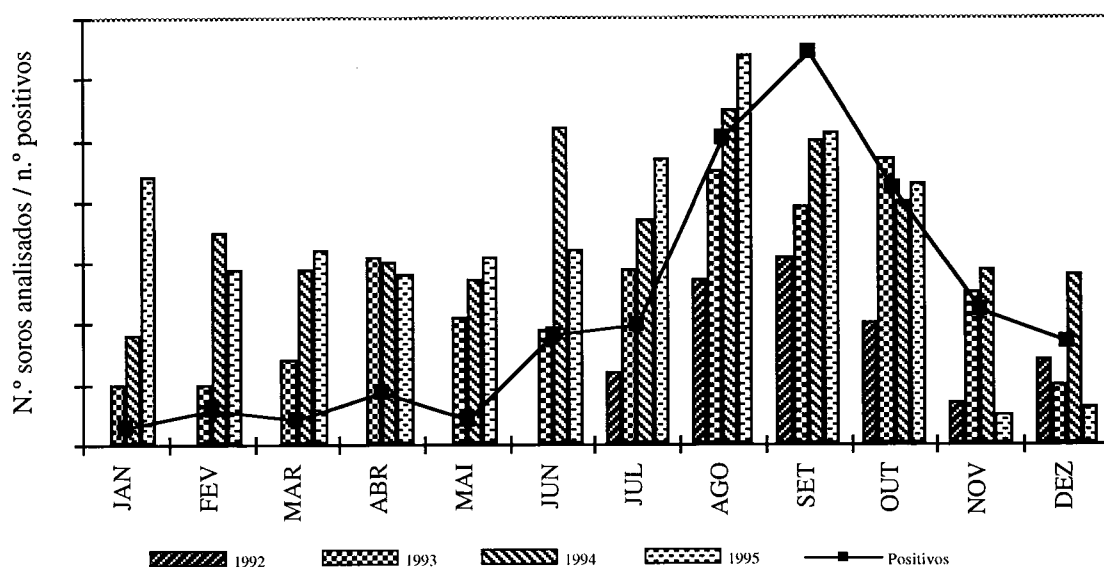


Figura 31. Serologia de Febre escaro nodular (mensal).

### 1.3. Inquéritos seroepidemiológicos

Durante os anos de 1993-1995 foram realizados alguns inquéritos serológicos em diferentes populações, escolhidas por conveniência, cujos resultados podem ser lidos a seguir. A técnica utilizada para os estudos efectuados foi a imunofluorescência indirecta (IFA).

#### 1.3.1. Serologia de uma população de dadores de sangue

Foram analisados 95 soros de indivíduos saudáveis, dadores de sangue do Serviço de Sangue do Hospital Distrital de Setúbal. Todos os soros foram testados em diluições (na razão de 2) a partir de 1:8. A partir deste estudo calculou-se o título limiar de positividade contra o antigénio de *R. conorii* como sendo de duas diluições acima da diluição em que 10% dos soros apresentaram alguma fluorescência e foi considerado o título de 1:64 (IgA, M, G).

#### 1.3.2. Serologia de doentes com diagnóstico de febre de origem indeterminada e outras patologias, excepto febres exantemáticas

Foram consituídas as populações a seguir discriminadas, cujos soros foram analisados pela técnica de IFA contra o antigénio de *R. conorii*. O título limiar de positividade foi de 1:64 (IgA,M,G).

- a) 119 soros de doentes com síndrome febril indeterminada;
- b) 184 soros de doentes com outras patologias, como por exemplo: borreliose de Lyme, leptospirose, coriomeningitelinfocitária;
- c) 136 soros de pessoas com diagnóstico clínico não especificado, porém sem sintomatologia compatível com uma rickettsiose, isto é, referências a febre e exantema.

Os resultados podem ser observados na tabela XXIV. Do total de 439 soros analisados 52 (12%) revelaram possuir anticorpos contra *R. conorii*. Destes, no grupo dos doentes com sintomatologia não especificada foram encontrados 31 (23%) indivíduos com anticorpos, enquanto que 14 (12%) dos indivíduos diagnosticados com febre indeterminada e 7 (4%) dos que padeciam de outras patologias, também apresentaram anticorpos contra *R. conorii*.

Destas observações ressaltaram que o diagnóstico da Febre escaro nodular é feito maioritariamente pelas características clínicas e que em apenas 12% dos casos o diagnóstico serológico pode indicar esta patologia como a responsável pelos sintomas. Não foi fornecida informação se os anticorpos detectados poderiam ser resultado de infecções antigas.

**Tabela XXIV. Resultados da pesquisa de anticorpos contra *R. conorii* em doentes com síndrome febril indeterminada e outras patologias**

Diagnóstico clínico	N.º de Soros	Positivos por IFA	
		n	%
Síndrome febril indeterminada	119	14	12
Outras patologias	184	7	4
Não especificado	136	31	23
<b>ΣTotal</b>	439	52	12

FA = imunofluorescência indirecta; positivo  $\geq 1:64$

No grupo dos indivíduos com diagnóstico clínico não especificado, mas sem sintomas como febre e exantema, a percentagem de positivos foi de 31% dos soros analisados. Este valor poderia indicar que os indivíduos estariam infectados com uma rickettsia do grupo das febres exantemáticas que não provocava a sintomatologia clássica.

Os resultados de serologia positiva obtidos em indivíduos afectados por outras patologias seria devido às reacções cruzadas entre os agentes etiológicos da moléstia e as rickettsias do grupo das febres exantemáticas ou então devido a anticorpos residuais.

### 6.1.3.3. Serologia de populações de grupo de risco

Foram escolhidos dois grupos de indivíduos referidos a seguir que, pela sua actividade laboral, estivessem sujeitos a um maior contacto com os artrópodos vectores de rickettsias: Os soros foram analisados com o antigénio de *R. conorii* e o título limiar foi de 1:64 (IgA, M, G):

- a) um grupo foi constituído por 15 guardas florestais, indivíduos do sexo masculino, com idades entre os 25 e os 50 anos e saudáveis. Alguns referiram picadas de ixodídeos no passado, mas nenhum acusou ter tido Febre escaro nodular recentemente.

b) um segundo grupo foi constituído por 157 militares em exercício no batalhão dos Comandos, no ano de 1993 e 706 indivíduos em recruta no Norte do país no ano de 1995. Todos foram considerados saudáveis clinicamente pelos serviços médicos militares.

Os resultados da análise serológica destas populações podem ser observados na tabela XXV.

**Tabela XXV. Resultados da pesquisa de anticorpos contra *R. conorii* em indivíduos de grupos de risco**

Grupo estudado	total n	positivo n	%	
			positivo	negativo
Guardas florestais	15	0	0	100
Comandos	157	4	2,5	97,5
Militares Norte	706	12	1,7	98,3
<b>ΣTotal</b>	878	16	1,82	98,1

## 2. SEROLOGIA EM POPULAÇÕES DE ANIMAIS DOMÉSTICOS (*CANIS FAMILIARIS*)

Os resultados dos inquéritos serológicos realizados com cães podem ser observados a seguir. A técnica utilizada foi IFA, com o antígeno de *R. conorii* e o título limiar de positividade foi de 1:64 (IgG). Este título foi escolhido com base na bibliografia consultada.

### 2.1. Estudo serológico de cães do Canil Municipal de Setúbal

Estudaram-se 104 cães mantidos no Canil Municipal de Setúbal. A maior parte foram abandonados no perímetro da cidade e alguns eram cães levados para abate pelos proprietários, por diversas razões.

Uma população foi constituída com 44 cães, sem critérios prévios de escolha, dos quais foi colhida apenas uma amostra de sangue, durante os meses de Outubro de 1991 e

Janeiro de 1992. Denominou-se este grupo de Outono/Inverno. Uma segunda população foi constituída por 60 animais, nas mesmas condições, porém as amostras foram colhidas durante os meses de Abril a Julho de 1992 (Primavera/Verão). No primeiro grupo foram retirados 12 ixodídeos (1 fêmea de *Ixodes ricinus* e 11 ninfas de *Rhipicephalus sanguineus*) e do segundo 213 exemplares adultos do género *Rhipicephalus*.

Os resultados do estudo serológico destes animais, levados para abate no Canil Municipal de Setúbal, podem ser observados na tabela XXVI. A positividade da amostra total foi de 85,5%, não havendo diferenças marcantes nos resultados das amostras colhidas em diferentes estações do ano.

**Tabela XXVI. Anticorpos contra *R. conorii* em cães do Canil Municipal de Setúbal**

Grupo	Total	positivo IFA		%	
	n	n	pos.	neg.	
Out/Inv	44	38	86,3	13,6	
Prim/Ver	60	51	85	15	
<b>ΣTotal</b>	<b>104</b>	<b>89</b>	<b>85,5</b>	<b>14,4</b>	

positivo IFA  $\geq$  1:64

## 2.2. Estudo sazonal da cinética de anticorpos em cães

No Canil de Belas foi estudada uma população de 17 cães adultos da raça pastor alemão, 3 fêmeas e 14 machos, com idades entre 1 e 8 anos. Os animais estavam sob controlo veterinário e acondicionados com boas condições de higiene. Foi determinado para cada animal o título final de anticorpos contra *R. conorii* por 3 vezes, durante o ano de 1994, com o objectivo de comparar os valores dos títulos obtidos para cada animal e/ou detectar seroconversão:

- a) a primeira determinação de título foi feita no soro colhido na Primavera (Março);
- b) a segunda, nas amostras obtidas durante o Verão (Julho);
- c) a última foi feita nos soros colhidos durante o Outono (Outubro).

Os resultados podem ser vistos na tabela XXVII. Todos os animais apresentaram anticorpos com títulos iguais ou maiores a 1:128, em todas as amostras. Os títulos mantiveram-se estáveis na maioria dos animais; nos cães n.º 8, 10, 12, e 17 houve variação de apenas uma diluição e o cão n.º 14 teve uma variação de título entre a primeira amostra e a última de 2 diluições (de 1:2048 para 1:256), o que indica uma diminuição do nível dos anticorpos específicos. Não foi referida pelos tratadores a presença de ixodídeos parasitando os animais entre as colheitas de sangue.

Nas tabelas XXVIII e XXVIX encontram-se os resultados de um estudo semelhante realizado com duas populações de cães, com amostras de soro colhidas em duas épocas: Abril/Maio e Agosto/Setembro de 1994. Uma população foi constituída por 7 cães de companhia, vivendo na zona urbana da cidade do Barreiro, com todas as condições de higiene e controlo sanitário veterinário. Os animais estudados foram 5 machos e 2 fêmeas com idades entre os 6 meses e 14 anos no início do estudo. A outra população foi constituída com 7 cães, da aldeia de Águas de Moura e dos arredores (freguesia de São Pedro da Marateca), uma zona predominantemente rural, onde os animais viviam em contacto com a natureza, sendo utilizados para a caça ou guarda de rebanhos. O grupo constou de 4 fêmeas e 3 machos com idades entre os 6 meses e os 7 anos. Destas duas populações, inicialmente, fizeram parte 11 animais na zona urbana e 23 da zona rural, porém o índice de abandono do estudo reduziu as populações para os referidos 7 animais.

Dos resultados da serologia pode observar-se que, nos animais da área urbana, houve um que sofreu uma seroconversão (cão n.º 11), do qual foram retirados vários ixodídeos do género *Rhipicephalus*, no mês de Maio. O animal esteve sempre saudável. O cão n.º 7 não apresentou anticorpos detectáveis contra *R. conorii* e foi um animal que esteve sob tratamento medicamentoso por ter uma babesiose aguda. Dois cães (n.º 4 e n.º 10) mantiveram os anticorpos com título no limite de positividade da técnica (1:64) e os outros 3 mantiveram títulos de 1:512. Apenas esporadicamente foi referido pelos proprietários dos animais a presença de ixodídeos entre as duas colheitas de sangue.

Na área rural, com excepção de um animal (cão n.º 11) que sofreu uma seroconversão, todos os outros apresentaram títulos elevados de anticorpos contra *R. conorii*, constantes nas duas amostras. Apesar de não terem sido retirados ixodídeos destes animais na ocasião da colheita do sangue, foi de ocorrência frequente nesta região a captura de ixodídeos em cães.

Tendo em conta a idade (< 1 ano) dos animais que tiveram uma seroconversão, após a colheita de sangue realizada na Primavera, este acontecimento estaria de acordo com a epidemiologia da Febre escaro nodular. Os ixodídeos adultos infectados com *R. conorii*,



após a diapausa de Inverno, fariam a refeição de sangue no vertebrado para completar o ciclo de vida, inoculando as rickettsias e induzindo a seroconversão.

**Tabela XXVII. Anticorpos contra *Rickettsia conorii* em cães do canil de Belas**

Cão			Amostra		
N.º	Idade	Sexo	1.ª Mar/Abr	2.ª Jul/Ago	3.ª Out/Nov
			Título (IFA)		
1	7	f	1:2048	1:2048	1:2048
3	8	m	1:2048	1:2048	1:2048
4	6	m	1:2048	1:2048	1:2048
5	7	m	1:1024	1:1024	1:1024
6	7	m	1:256	1:256	1:256
7	3	m	1:128	1:128	1:128
8	7	m	1:256	1:256	1:128
9	1	m	1:1024	1:1024	1:1024
10	3	m	1:2048	1:1024	1:2048
11	3	m	1:128	1:128	1:128
12	3	f	1:2048	1:1024	1:1024
14	1	m	1:1024	1:512	1:256
15	1	m	1:128	1:128	1:128
17	3	m	1:128	1:128	1:256
18	6	m	1:128	1:128	1:128
19	4	f	1:128	1:128	1:128
20	6	m	1:128	1:128	1:128
<b>ΣTotal</b>	<b>n = 17</b>		<b>17 +</b>	<b>17 +</b>	<b>17 +</b>

+ = positivo; idade em anos; m = macho; f = fêmea

**Tabela XXVIII. Anticorpos contra *R. conorii* em cães de uma área urbana**

Cão			Amostra (título IFA)	
Nº	Idade	Sexo	Primavera	Verão
2	12	m	1:512	1:512
4	2	f	1:64	1:64
6	3	f	1:512	1:512
7	1	m	<1:64	<1:64
9	14	m	1:512	1:512
10	12	m	1:64	1:64
11	<1	m	<1:64	1:256
<b>ΣTotal</b>	<b>n = 7</b>		<b>5 +</b>	<b>6 +</b>

+ = positivo; idade em anos; m = macho; f = fêmea

**Tabela XXIX. Anticorpos contra *R.conorii* em cães de uma área rural**

Cão			Amostra (título IFA)	
N.º	Idade	Sexo	Primavera	Verão
2	1	m	1:512	1:512
4	1	f	1:512	1:512
5	7	m	1:1024	1:1024
6	1	f	1:256	1:256
8	3	f	1:1024	1:1024
11	<1	m	<1:64	1:512
12	>3	f	1:256	1:256
$\Sigma$ total n = 7			6 +	7+

+ = positivo; idade em anos; m = macho; f = fêmea

### 3. SEROLOGIA EM MICROMAMÍFEROS

Foi feita a pesquisa de anticorpos contra *R. conorii* pela técnica de IFA durante os anos de 1993 a 1995 em 793 micromamíferos capturados em três áreas geográficas, Marateca, Pancas e Montemor-o-Velho. Os resultados encontram-se discriminados a seguir.

#### 3.1. Estudos realizados na Marateca

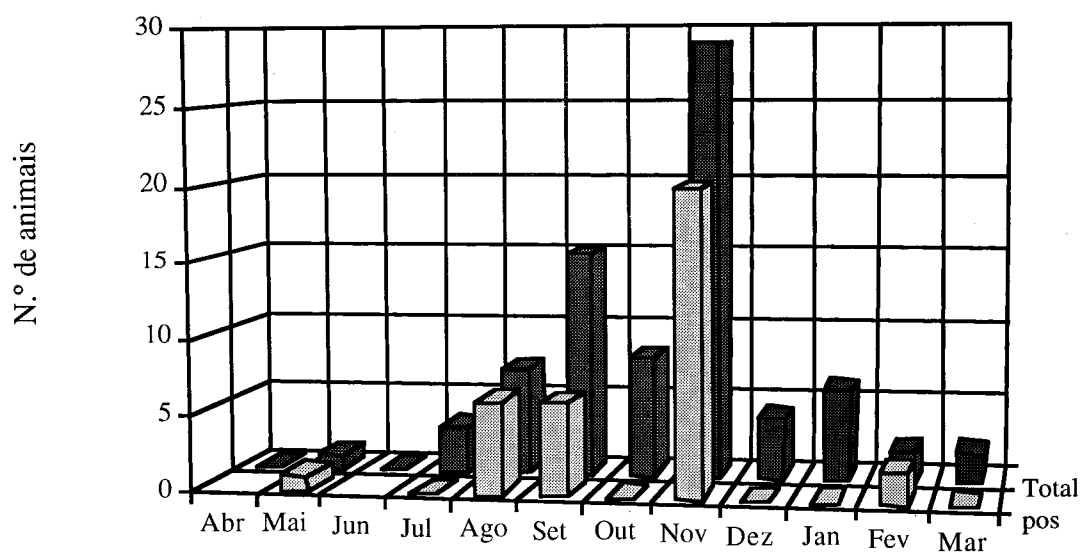
Durante um ano, de Abril de 1994 a Março de 1995, foram capturados 271 micromamíferos cuja distribuição mensal, espécies e resultados da pesquisa de anticorpos específicos contra *R. conorii* podem ser observadas na tabela XXX. Foram capturadas 5 espécies: *Apodemus sylvaticus* (o ratinho ruivo), *Mus spretus* (o ratinho do campo), *Crocidura russula* (o mussaranho), *Microtus cabrera* (o rato toupeira) e *Microtus (Pitymys) duodecimcostatus* (o ratinho toupeira). A percentagem de micromamíferos positivos nesta amostra foi de 43,4%. Os anticorpos foram pesquisados por IFA com conjugado fluoresceinado específico para *Mus* sp. e o título considerado limiar de positividade foi de 1:32.

**Tabela XXX. Anticorpos contra *R. conorii* em micromamíferos da Marateca determinados por IFA**

Capturas 1994-1995 (n total/n positivo)													
Espécie	Abr	Mai	Jun	Jul	Ago	Set	Out	Nov	Dez	Jan	Fev	Mar	Σ
<i>Apodemus sylvaticus</i>	28/0	7/6	5/2	8/0	18/9	10/10	26/15	4/0	20/8	24/12	20/12	12/3	182/77
<i>Mus spretus</i>	-	1/1	-	3/0	8/7	15/6	8/0	29/20	4/0	6/0	2/2	2/0	78/36
<i>Crocidura russula</i>	-	1/0	-	-	1/0	-	-	1/0	-	2/0	-	-	5/0
<i>Microtus cabrera</i>	-	-	-	-	-	-	1/0	-	-	-	-	-	1/0
<i>M. duodecimcostatus</i>	-	-	-	-	1/1	2/1	-	-	-	3/3	2/1	-	8/6
ΣTotal/positivo	28/0	9/7	5/2	11/0	28/17	27/17	35/15	34/20	24/8	35/15	24/15	14/3	274/119

- = não captura; positivo  $\geq 1:32$

Das 5 espécies capturadas *A. sylvaticus* e *M. spretus* apresentaram quase que 50% dos exemplares capturados com anticorpos contra *R. conorii*. Porém *M. (Pitymys) duodecimcostatus* apresentou 75% dos exemplares com anticorpos, embora tenham sido capturados poucos animais (cerca de 3% da amostra). A presença de anticorpos nas espécies ao longo do ano pode ser melhor visualizada nas figuras 32, 33 e 34.



**Figura 32. Serologia de *Mus musculus*.**

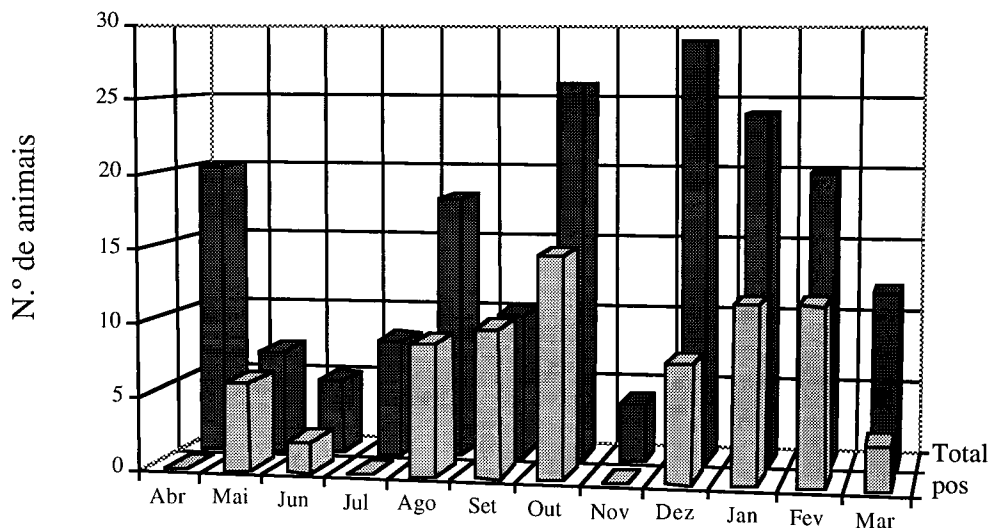


Figura 33. Serologia de *Apodemus sylvaticus*.

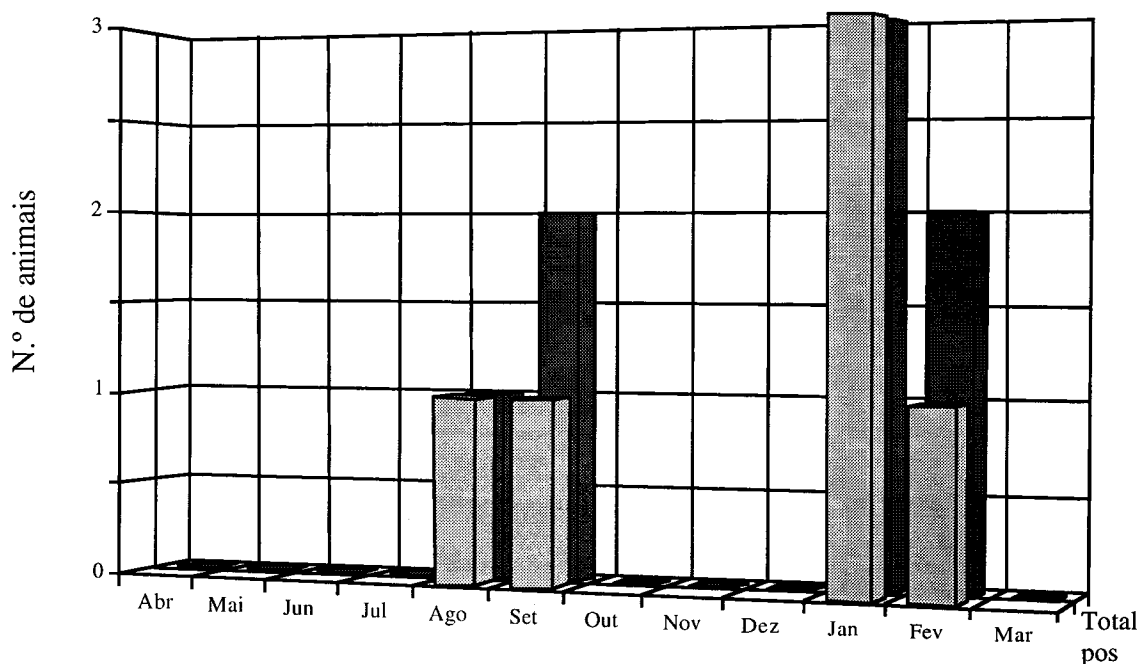


Figura 34. Serologia de *Microtus duodecimcostatus*.

A utilização do conjugado não específico para as diferentes espécies deveu-se a não existência de reagentes próprios comercializados. Este facto poderia influenciar os resultados encontrados, embora na literatura seja comum o uso de reagentes produzidos especificamente contra o género *Mus*, para o estudo de outros roedores. Os insectívoros *Crocidura russula* não foram encontrados com anticorpos detectáveis, contudo pelo motivo atrás exposto não se pode excluí-los como possíveis reservatórios de rickettsia.

### 3.2. Estudos realizados no Monte de Pancas

Em Pancas foram capturados nos três anos de estudo (1993-1995) um total de 150 micromamíferos dos quais apenas 21 exemplares (14%) apresentaram anticorpos contra *R. conorii*. A espécie com maior número de indivíduos positivos foi *Rattus norvegicus* (a ratazana castanha), micromamífero peri-doméstico. A seguir surgiu *Mus spretus* (o ratinho do campo). As outras espécies não revelaram a presença de anticorpos com os reagentes utilizados e no limiar de positividade considerado (1:32). Os resultados da serologia podem ser observados na tabela XXX.

**Tabela XXX . Anticorpos contra *R. conorii* em micromamíferos capturados em Pancas determinados por IFA**

Espécie	1993		1994		1995		ΣTotal	
	n total/+	%+ anual	n total/+	%+ anual	n total/+	%+ anual	n/+	%+
<i>Apodemus sylvaticus</i>	1/0	0	13/0	0	-	-	14/0	0
<i>Crocidura russula</i>	2/0	0	10/0	0	-	-	12/0	0
<i>Mus spretus</i>	27/2	7,4	41/5	12	25/2	8	93/9	10
<i>Mus musculus</i>	6/0	0	1/0	0	-	-	7/0	0
<i>Rattus norvegicus</i>	10/9	90	14/3	21,4	-	-	24/12	50
<b>ΣTotal</b>	<b>46/11</b>	<b>24%</b>	<b>79/8</b>	<b>10%</b>	<b>25/2</b>	<b>8%</b>	<b>150/21</b>	<b>14%</b>

+ = serologia positiva por IFA  $\geq$  1:32; - não captura

### 3.3. Estudos realizados em Montemor-o-Velho

Em Montemor-o-Velho, nas herdades Quinta da Boa Vista e Quinta do Castelo, foram capturados nos anos de estudo (1993/1995) um total de 196 micromamíferos dos quais 16 exemplares (8,1%) apresentaram anticorpos contra *R. conorii*. Tal como em Pancas a espécie com maior número de indivíduos positivos foi *Rattus norvegicus* e a seguir *Mus spretus*. Os resultados da serologia podem ser observados na tabela XXXII.

**Tabela XXXI. Anticorpos contra *R. conorii* em micromamíferos em Montemor-o-Velho determinados por IFA**

Espécie	1993		1994		ΣTotal	
	n/+ total	%+ anual	n/+ total	%+ anual	n/+	%+
<i>Apodemus sylvaticus</i>	-	-	11/0	0	11/0	0
<i>Crocidura russula</i>	5/0	0	21/0	0	26/0	0
<i>Mus spretus</i>	27/2	7	98/7	7	125/9	7
<i>Mus musculus</i>	9/0	0	-	-	9/0	0
<i>Rattus norvegicus</i>	5/5	100	20/2	10	25/7	28
<b>ΣTotal amostra</b>	<b>46/7</b>	<b>15%</b>	<b>150/9</b>	<b>6%</b>	<b>196/16</b>	<b>8%</b>

= serologia positiva IFA  $\geq 1:32$ ; - = não captura



## **DISCUSSÃO DOS RESULTADOS**





Os objectivos principais do estudo desenvolvido na presente dissertação foram a inventariação das espécies de ixodídeos existentes em Portugal parasitadas com rickettsias, o isolamento de estirpes destas bactérias em sistemas de cultura “*in vitro*” e a caracterização, identificação e classificação das estirpes isoladas.

Das 20 espécies de ixodídeos conhecidas até à data em Portugal, apenas não foram capturados exemplares de *I. frontalis*, *I. canisuga* e *H. hispanica* e não foram observados pelo teste dos hemócitos para a pesquisa de rickettsias os exemplares de *I. simplex*. Na área geográfica mais estudada, o distrito de Setúbal e, em especial, o concelho de Alcacer do Sal, foram pesquisadas pelo teste dos hemócitos as 11 espécies de ixodídeos dadas como aí existentes (*I. ricinus* e *I. ventalloi*; *R. bursa*, *R. sanguineus*, *R. pusillus* e *R. turanicus*; *B. annulatus*; *H. lusitanicum* e *H. marginatum*; *H. punctata*; *D. marginatum*) (Caeiro, 1992). A observação da hemolinfa dos ixodídeos pelo teste dos hemócitos permitiu encontrar 9 espécies parasitadas: *H. punctata*, *D. marginatus*, *I. hexagonus*, *I. ricinus*, *I. ventalloi*, *R. pusillus*, *R. sanguineus*, *R. turanicus* e *H. marginatum*.

Neste estudo obteve-se o isolamento em cultura de células Vero E6 de 41 estirpes de rickettsia a partir da hemolinfa das espécies *D. marginatus*, *R. sanguineus*, *R. turanicus*, *I. ricinus*, *I. ventalloi* e *H. marginatum*. A maior parte das estirpes isoladas de *D. marginatum* foram identificadas como *R. slovacica* e uma como *R. sibirica*. As espécies de ixodídeos *I. ricinus* e *I. ventalloi* estavam parasitadas com *R. helvetica*. Em *R. sanguineus* encontraram-se *R. conorii* e a estirpe Mtu5. *R. massiliae* foi isolada de *R. turanicus*. Por fim, de *H. marginatum* foi isolada uma espécie para a qual está proposta a denominação de “*Rickettsia aeschlimani*” (L. Beati, com. pessoal, Unité des Rickettsies – Marselha). Embora não sendo um dos objectivos deste estudo, foram ainda isoladas duas estirpes de *R. conorii* a partir do sangue de indivíduos doentes.

A amostra total de ixodídeos submetida a estudo, cujos resultados se apresentaram e analisaram na presente dissertação, pode ser considerada representativa da fauna ixodológica portuguesa. Contudo, a generalização dos resultados, assim como das conclusões sobre a inter-relação rickettsia/ixodídeo, devem ser muito prudentes uma vez que, devido às características biológicas e ecológicas destes seres vivos, cada amostragem deve ser analisada “*per si*”.

A percentagem de ixodídeos encontrados com microrganismos semelhantes a rickettsias na hemolinfa (3,4%) foi cerca de metade da encontrada em trabalhos realizados anteriormente (7,5%) (Filipe et al, 1991). Apesar de grande parte da área geográfica de estudo ser a mesma os dados, apresentados neste trabalho, se referem a uma região mais extensa. O número analisado de espécies de ixodídeos foi maior e isto, certamente,

determinou a prevalência encontrada. Adicionalmente, os ixodídeos foram capturados em várias espécies de hospedeiros silváticos, além dos animais domésticos e da vegetação já estudados.

No passado, os ixodologistas portugueses mencionaram algumas espécies de ixodídeos como vectores de *R. conorii*, agente da Febre escaro nodular (Leitão, 1943; Tendeiro, 1962; Dias, 1994). Além de *R. sanguineus*, foram citadas *I. hexagonus*, *D. pictus*, *B. annulatus* e *R. pusillus*. Aliás, esta última espécie foi considerada responsável por uma afecção, causada por rickettsias, denominada “febre dos guardas de caça” (Dias, 1994). Por outro lado, no Instituto Bacteriológico Câmara Pestana, o Prof. Dr. G. Nobre isolou, por inoculação de um “pool” de carraças *R. sanguineus* em ovos embrionados, algumas estirpes que identificou como sendo *R. conorii* (Nobre, 1971) e referiu ainda, em comunicação pessoal, ter isolado uma estirpe da mesma espécie de rickettsia a partir de um doente com Febre escaro nodular. Sampaio e Faia (1953) referiram, numa breve nota, terem obtido uma estirpe de rickettsia a partir de *B. annulatus*, mas não há dados posteriores acerca deste isolamento. Nestas condições considera-se que esta é a primeira vez que se isolam rickettsias em culturas de células, após a observação de rickettsias na hemolinfa de ixodídeos.

Quanto aos resultados obtidos com as técnicas de pesquisa de rickettsias nos artrópodos pode concluir-se que:

- a) o teste dos hemócitos, embora fácil de executar e específico para organismos Gram negativos, pode induzir em erro o observador que apenas utilize a microscopia óptica. Outros microrganismos que não são rickettsias e alguns artefactos da técnica podem reter a fucsina e corar de vermelho;
- b) teoricamente, o teste de imunofluorescência indirecta (IFA) aplicado ao exame da hemolinfa é mais específico, pois o conjugado fluoresceinado só se liga ao anticorpo se este estiver ligado ao antigénio. Na prática porém, verifica-se que há emissão de fluorescência inespecífica, sendo por vezes difícil a identificação dos microrganismos observados na gota de hemolinfa;
- c) a correlação entre os casos positivos observados no teste dos hemócitos e na técnica de IFA permitiu que se considerasse o primeiro tão fiável como o segundo e, por aquele ser mais económico, passou a ser a metodologia seleccionada para detecção de rickettsias;
- d) uma maneira de ultrapassar o problema da sensibilidade e especificidade das técnicas de detecção será a utilização do método de “PCR” para pesquisa de rickettsias directamente nos ixodídeos. Embora não sejam muitos os trabalhos publicados sobre este assunto, têm sido referidos alguns resultados positivos (Gage *et al*, 1992;

Beati, 1993; Dupont et al, 1994). Contudo, nos ixodídeos alimentados, o sangue inibe a acção enzimática impedindo as reacções e induzindo ao aparecimento de falsos negativos. Além disso, o custo é elevado e esta metodologia implica a destruição do ixodídeo, não permitindo o isolamento do agente posto em evidência. Esta será uma técnica alternativa para estudos epidemiológicos em grande escala onde, num curto período, uma grande quantidade de material pode ser estudada e que permitirá contribuir para delinear zonas de maior incidência de rickettsias.

No que diz respeito às espécies de ixodídeos em que não foram encontradas rickettsias, as razões para tal se ter verificado são de vária ordem. Por exemplo, *B. annulatus* só foi capturada no primeiro ano de estudo, embora seja uma carraça que existe em abundância, tanto nos hospedeiros pesquisados como na área geográfica em questão. Não se encontrou uma explicação plausível para não ter sido capturada com maior frequência. O motivo de os exemplares estudados não terem sido encontrados parasitados com rickettsias poderá estar relacionado com o facto de se tratar de um artrópodo de um só hospedeiro (monofásico), normalmente de bovinos, e de não se conhecer o papel destes mamíferos como reservatórios de rickettsias do grupo das febres exantemáticas. No entanto, estes animais podem sofrer patologias causadas por outras espécies de rickettsiales (*Cowdria ruminantium* e *Ehrlichia phagocytophila*). Quanto a *R. pusillus*, apesar de capturado com frequência em micromamíferos, hospedeiros silváticos e no cão, todos suspeitos de serem reservatórios de rickettsias do grupo das febres exantemáticas e, apesar de se terem observado formas semelhantes a estas bactérias na sua hemolinfa, não se conseguiu isolar qualquer estirpe. Como já foi referido, o tamanho do artrópodo e a sua fragilidade dificultam a execução não só do teste dos hemócitos como, principalmente, a sua utilização em isolamentos, por outro lado, não se conhece nenhuma referência na literatura sobre isolamentos de rickettsias a partir desta espécie. Na zona mediterrânica francesa, nos últimos 5 anos, não foi observado um único exemplar com rickettsias na hemolinfa, nem estas foram detectadas pela técnica de “PCR” (L. Beati, com. pessoal, Unité des Rickettsies – Marselha). *R. bursa*, espécie que também não foi encontrada parasitada, é citada na literatura como sendo vector de rickettsias, apesar de não se conhecerem isolamentos na Europa. *H. lusitanicum*, espécie endémica em Portugal e na Estremadura espanhola, nunca foi referida como parasitada por rickettsias. Deve ser assinalado que a maioria dos exemplares desta espécie, estudada no presente trabalho, provieram de uma única captura realizada na vegetação da margem do Rio Guadiana, perto de Évora, numa zona conhecida por “praia das carraças”.

No que diz respeito ao segundo objectivo – o isolamento de estirpes de microrganismos autóctones de cada área geográfica – o argumento que se considera mais válido para o

justificar é de que a utilização de antigénios locais permite contribuir para aumentar a sensibilidade e especificidade das técnicas de diagnóstico de doenças humanas e animais. A técnica do “*shell vial*”, utilizada neste trabalho, foi um aproveitamento técnico que resultou dos estudos realizados para isolamentos de citomegalovírus (Weiss e Dressler, 1962). Na metodologia original, no fundo do frasco cilíndrico, próprio para utilização em centrífugas, existia uma lamela de vidro onde cresciam as células hospedeiras. Era nesta camada que eram visualizados os vírus, recorrendo à técnica de IFA. Na metodologia utilizada no presente trabalho, adaptou-se o crescimento das células hospedeiras ao fundo do frasco. A seguir, optou-se por fazer uma passagem destas células para frascos de cultura de maior capacidade antes de verificar se havia ou não o crescimento de rickettsias. Como em todas as metodologias que utilizam linhas celulares para cultura “*in vitro*” exige-se que estas estejam em óptimas condições de cultivo para se obterem resultados positivos sendo, portanto, essencial a existência de um laboratório de culturas celulares a funcionar em boas condições. Tanto mais que, nos estudos com rickettsias, os meios de cultura não podem conter antibióticos e a manipulação envolve sempre o risco de contaminações com bactérias e fungos que existem, normalmente, no ambiente. Este é um método relativamente fácil de padronizar e económico.

O isolamento por “*shell vial*” das estirpes de rickettsias observadas na hemolinfa foi muito eficaz quando foram utilizadas carraças capturadas na vegetação. O índice de contaminação por outros microrganismos foi reduzido, exceptuando-se os casos em que o trabalho foi efectuado com ixodídeos ingurgitados. Todas as tentativas de isolamentos de rickettsias, a partir de órgãos de micromamíferos, utilizando esta metodologia, resultaram negativas. Contudo, é necessário ter em conta que a rickettsiémia nos animais é de curta duração, e o processo de colheita dos órgãos não foi o mais adequado. Para colher os órgãos na altura da rickettsiémia, em animais infectados naturalmente, de modo a ser possível obter um isolamento, envolveria uma metodologia de captura de animais e o processamento dos órgãos em larga escala por um longo período de tempo. Esse não foi um objectivo deste trabalho. Contudo o número de animais estudados forneceu dados suficientes para que futuros trabalhos possam vir a ter sucesso. Nas duas estirpes isoladas a partir do sangue humano, o factor comum foi a gravidade da patologia que atingiu os doentes. Num dos casos, a paciente faleceu, no outro a doente apresentou um quadro de encefalopatia. Em um dos casos, o sangue total esteve acondicionado a  $-20^{\circ}\text{C}$ , durante vários dias, antes de poder ser trabalhado no laboratório, no outro, foi tratado logo após a colheita. As outras amostras estudadas, que resultaram negativas, foram colhidas por processo semelhante, isto é, durante o período febril e antes de antibióticoterapia específica e conservadas da mesma maneira. Algumas destas amostras negativas, quando inoculadas em murganhos, induziram a produção de anticorpos contra *R. conorii* o que indica a presença do agente rickettsiano na amostra,

embora este não tivesse sido isolado. No trabalho original, onde foi descrita a utilização do “*shell vial*” para o isolamento de rickettsias do sangue humano (Marrero e Raoult, 1989), o sucesso desta técnica situou-se nos 85%, embora na “Unité des Rickettsies” de Marselha, onde o método foi desenvolvido, os isolamentos de rickettsias a partir do sangue não sejam muito frequentes (G. Vestris, com. pessoal, Unité des Rickettsies, Marselha).

Actualmente, pode ser considerado que a técnica do “*shell vial*” é o melhor método para isolamento de rickettsias. Como método de diagnóstico não é prático, nem traz benefícios para o doente uma vez que demora algum tempo até se observar a presença de rickettsias. Será de interesse utilizar esta metodologia nos casos de doenças febris de origem não determinada, associando-se à história epidemiológica do doente, não só pela possibilidade de se detectarem as rickettsias consideradas não patogénicas, como para esclarecer a etiologia de algumas afecções. Foi isso que aconteceu no caso do isolamento humano PoHu915/94, em que a doente faleceu antes de o diagnóstico ter sido feito.

Quanto ao terceiro objectivo proposto, a metodologia utilizada permitiu a identificação de várias espécies e estirpes de rickettsia. A identificação, neste estudo, consistiu em classificar as “novas estirpes isoladas” dentro de um *taxon* (neste caso a espécie) pela análise comparada dos anticorpos que induzem em vertebrados e pela análise comparada de parte do genoma, tendo sido utilizadas como padrão as espécies de rickettsia do grupo das febres exantemáticas conhecidas na Europa.

O teste de microimunofluorescência (MIF), quando estabelecido por Philip e colaboradores (1976; 1978a) foi repetido algumas vezes com o mesmo material. Isto, na prática, revelou-se de difícil execução, pois implica um trabalho que não é viável dentro dos períodos de tempo úteis e um gasto elevado de material (reagentes químicos e animais de laboratório). Também não é possível eliminar as variáveis introduzidas pelos manipuladores dos materiais e observadores das reacções de fluorescência, bem como as diferenças existentes entre os vários lotes de animais e os lotes de culturas de células utilizadas. Na descrição original desta técnica, a maior parte das espécies e estirpes utilizadas no estudo já tinha a sua sistemática estabelecida por métodos tradicionais e os títulos encontrados reflectiram essa identificação. Para diferenciar as estirpes isoladas na América do Norte, o MIF é considerado como útil, dado que neste País, existe uma única espécie patogénica, *R. rickettsii*, conhecida pela sua pequena variabilidade intraespecífica. As outras espécies, consideradas não patogénicas (*R. montana*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. parkeri* e a variedade de agentes sem nomenclatura oficial), têm hospedeiros artrópodos e reservatórios animais bem conhecidos e estudados. Assim, uma estirpe isolada é colocada com facilidade numa ou noutra categoria. Na Europa, porém,

a situação é diferente. Neste continente, ou melhor dizendo, na região euroasiática, coexistem várias espécies de rickettsias patogénicas, além de outras não patogénicas ou de patogenia duvidosa. Também, aqui, existe o complexo-*R. conorii*, com a grande variedade de estirpes descritas. Além disso, o principal reservatório e vector destas bactérias, *R. sanguineus*, pode estar parasitado com várias espécies de rickettsia. Estes factores tornam por vezes muito subjectiva a caracterização de uma “nova estirpe”, especialmente quando isolada deste ixodídeo, empregando apenas a técnica de MIF. Após a sua utilização neste trabalho, considera-se que é uma metodologia segura para caracterizar uma “nova estirpe” como pertencendo ao grupo das febres exantemáticas, uma vez que põe em evidência o somatório dos anticorpos contra os antigénios de grupo e de espécie (as proteínas de superfície rOmp A e rOmp B e os lipopolissacarídeos), mas necessita de ter os resultados são comparáveis, além de ser de mais fácil execução do que a microimunofluorescência. Na descrição original da técnica, com apenas três endonucleases foi possível estabelecer perfis de restrição diferentes para quase todas as espécies conhecidas. Mais tarde, no grupo-*R. sanguineus* na Eurásia, foram encontradas algumas estirpes com diferenças mínimas no genoma analisado sendo por isso classificadas como espécies ou novos agentes, como por exemplo *R. massiliae*, agente S, Mtu5, “*R. heijlonjiang*”. Ainda, as estirpes do complexo-*R. conorii* revelam diferenças na sequência das bases nucleotídicas do segmento do gene “190 kDa”, que alguns autores relacionam com as diferenças de patologia e virulência. O facto deste gene de *R. helvetica* não ser amplificado com os “primers” usados para todas as outras rickettsias do grupo das febres exantemáticas é mais um indício de que esta técnica de identificação necessita de aperfeiçoamentos. Finalizando, verifica-se que as “novas espécies” (serotipos/genoespécies) classificadas com base nas características analisadas por estas duas metodologias têm sido classificadas no grupo das rickettsias das febres exantemáticas, ainda por critérios epidemiológicos (vectores ixodídeos, área geográfica, hospedeiros) e biológicos (patogenia, crescimento em cultura).

Conclui-se que, apesar da nomenclatura do agente facilitar a sua localização geográfica e vectorial, o aparecimento de novas espécies classificadas com bases em critérios de biologia molecular (que não estão padronizados e que por vezes não são reprodutíveis), poderá no futuro recriar situações como as observadas no passado, quando o fenótipo do organismo é que determinava a sua classificação. Pensa-se que ao identificar-se um organismo com características únicas, o mais correcto seria que apenas se pudesse classificá-lo como “algo novo” para a Ciência obedecendo a alguns critérios de classificação reconhecidos pela comunidade científica e quando existissem várias “estirpes isoladas” com as mesmas características. Enquanto não for estabelecido um conjunto de genes a serem estudados e também as técnicas e condições de estudo a realizar, a identificação e classificação de “novas espécies” continuará a ser subjectiva.

Para além dos objectivos citados e concretizados, há no entanto outros aspectos de grande importância para o estudo que aqui se apresenta e que também foram abordados. A taxa de parasitismo (como foi dito na definição deste parâmetro, indica se a espécie de ixodídeo é pouco ou muito parasitada numa determinada amostra), aliada ao facto de as espécies de rickettsia detectadas na hemolinfa do artrópodo serem consideradas patogénicas ou não, determinará o papel vectorial potencial que os artrópodos exercem no seu nicho ecológico.

*D. marginatus*, na grande maioria dos exemplares estava parasitada com *R. slovacica* (95%). O achado ocasional de uma estirpe com características imunológicas e genéticas próximas de *R. sibirica*, deve ser avaliado com a maior precaução. Quanto à existência de *R. slovacica*, parasitando ixodídeos em Portugal, capturados em várias localidades, em diferentes hospedeiros e diferentes épocas do ano, confirma a presença autóctone desta bactéria por toda a Eurásia, desde o Pacífico até ao Atlântico. Na realidade, esta espécie de rickettsia foi uma das mais fáceis de ser isolada e conservada “*in vitro*”, tanto em cultura de células como por congelação, revelando ser pouco exigente quanto às condições óptimas de crescimento exponencial e de manutenção, resultando sempre em grande número de microrganismos. Também não mostraram ser tão lesivas para as células em cultura quanto, por exemplo, *R. conorii*, já que as células hospedeiras infectadas duraram mais tempo sem apresentar alterações citopatogénicas. Se esta espécie continuar a ser considerada como não patogénica (relembrando o caso de infecção laboratorial que resultou em meningite, Mittermayer et al, 1980), devido ao fenómeno de interferência poderá exercer um efeito profilático na sobrevivência de espécies patogénicas nestes artrópodos. O achado fortuito de uma estirpe de *R. sibirica*, agente do tifo da carraça siberiano, conhecido apenas no leste da Europa e na Ásia, estende a possibilidade de existir a doença até Portugal acompanhando a distribuição do ixodídeo vector. Mas, neste achado particular, antes de se concluir sobre a eventual introdução de um novo agente patogénico no nosso País, têm de ser avaliados vários factores, especialmente, o local de captura do ixodídeo, a vegetação na área do Monte de Pancas:

- a) o local, uma área de ambiente protegido, é uma zona de poiso de aves migradoras que vêm da Europa de Leste;
- b) a carraça não estava ingurgitada e, dado a época do ano (Janeiro), seria um adulto originário da muda de uma ninfa, estadio intermediário conhecido por parasitar pássaros;
- c) o facto de ser um macho também afasta a hipótese de que a infecção pudesse passar aos descendentes transovaricamente, embora em laboratório tenha sido comprovada a existência de *R. rickettsii* nos espermatozóides de *D. variabilis* (Hayes e Burgdorfer, 1980);



d) a ausência de doença na espécie humana ainda não diagnosticada entre a população habitando nesta área, embora possa ser eventualmente confundida com a febre escaro nodular.

Estas considerações não excluem o facto de que uma vigilância epidemiológica deva ser mantida, já que reforça as teses sobre a importação e introdução de agentes patogénicos transmitidos por artrópodos vectores, parasitas de aves migradoras.

Quanto à segunda espécie com uma taxa de parasitismo elevada, *R. sanguineus*, a carraça do cão em Portugal, foi encontrada parasitada por *R. conorii* e por uma estirpe com perfis de restrição semelhantes aos obtidos com Mtu5. No que respeita à Febre escaro nodular, dado o pequeno número de exemplares de *R. sanguineus* parasitado com o agente da doença, *R. conorii* (4 em 2665), aliado ao possível fenómeno de interferência que as outras estirpes de rickettsia podem eventualmente exercer, pode-se concluir que o potencial desta espécie de artrópodo como vector não seja um problema premente de Saúde Pública. Contudo, como a febre escaro nodular é conhecida pela sua ocorrência em focos bem delimitados e o Facto destes 4 exemplares terem sido capturados em cães da mesma região, é necessário encarar as áreas onde são encontradas carraças parasitadas com *R. conorii* como um possível foco antropozoonótico. O número anual de declarações de Febre escaro nodular nos serviços de estatística de saúde e os estudos de serologia humana, realizados neste trabalho, indicaram que a infecção ocorre, principalmente, no fim do Verão, quando estão activos os estadios intermédios do ixodídeo (ninfas), que assim seriam os principais responsáveis pela transmissão do agente.

*I. ricinus* é um ixodídeo conhecido como vector de vários agentes de doença humana e animal (borrélias, ehrlichias, vírus). Neste estudo foi encontrado com uma alta taxa de parasitismo, albergando *R. helvetica* o que estende a área geográfica de dispersão desta espécie de rickettsia da Suíça a Portugal. O isolamento desta rickettsia de *I. ventalloi* significa uma nova espécie de ixodídeo parasitado com esta rickettsia. Todavia este isolamento foi feito de uma ninfa a parasitar uma ratazana castanha, o que poderia implicar ser esta o reservatório da rickettsia e a infecção ser transitória. Os exemplares adultos de *I. ventalloi* são conhecidos no nosso País por parasitar, preferencialmente, a doninha e são necessários mais estudos para avaliar o real significado do seu parasitismo por rickettsias (Dias, 1994).

*H. marginatum* conhecida como parasita de bovinos, foi encontrada com uma nova espécie de rickettsia não patogénica, denominada, provisoriamente, "*R. aeschlimani*". Esta espécie foi caracterizada como sendo um novo serótipo e genótipo do grupo das

rickettsias das febres exantemáticas. Foi encontrada parasitando não só *H. marginatum marginatum*, a subespécie existente em Portugal, como também *H. m. rufipes*, subespécie africana (Marrocos e Zimbabué) (Beati et al, 1995). A biologia desta “nova espécie” ainda não está determinada.

O facto de neste estudo o Homem ter sido encontrado parasitado por *D. marginatus*, *I. ricinus* e *H. marginatum*, além de *R. sanguineus*, obriga a ponderar o papel vectorial destas carraças. Todas elas foram encontradas com rickettsias que, mesmo não produzindo uma doença reconhecida como uma febre exantemática, podem induzir a produção de anticorpos. Talvez resida aí o facto de indivíduos com serologia positiva, frequentemente, negarem terem tido uma “febre da carraça”. Nos estudos de seroepidemiologia, os títulos positivos alteram as prevalências da doença e indicam a existência de “áreas de risco”, onde não existe o perigo de infecção. Por vezes, podem induzir o clínico em êrro de diagnóstico o que implica a administração de antibióticoterapia e, por esta ser desnecessária, poderá potenciar o efeito da resistência aos antibióticos em outros microrganismos.

O estudo da ultraestrutura e do ciclo de infecção nas células hospedeiras forneceu mais alguns dados com interesse para a caracterização destas bactérias parasitas. Observou-se a localização no núcleo das células e a distribuição dos microrganismos no citoplasma da célula hospedeira de uma maneira irregular, não agregadas, característica das rickettsias. As células parasitadas com *R. conorii* e com “*R. aeschlimanni*” apresentaram imagens de mitocôndrias volumosas, núcleo em desagregação e citoplasma com muitos vacúolos, revelando o “*stress*” oxidativo que sofreram.

Os estudos seroepidemiológicos realizados com animais domésticos e com micromamíferos podem ser analisados à luz do papel destes animais na ecologia das rickettsias, nos ecossistemas estudados. Os títulos de anticorpos contra rickettsias observados nos cães, no estudo realizado na cidade de Setúbal, foi uma primeira indicação de que estes animais ou estariam sempre a receber novos estímulos antigénicos, ou então, manteriam durante longo tempo os anticorpos em circulação. O estudo da cinética de anticorpos, realizado ao longo de um ano, comprovou que estes animais, mesmo na ausência dos vectores, são capazes de apresentar níveis de anticorpos elevados. Este facto sugere que a rickettsiemia não é transitória e que manter-se-ia não só tempo suficiente para induzir uma reacção imunitária relevante, como, teoricamente, também seria suficiente para infectar novos artrópodos que se alimentem no cão. Esta observação vai contra os resultados dos estudos realizados em Espanha (Espejo et al, 1989; 1993) e por investigadores da Unité de Rickettsies (Raoult, 1992; Kelly et al, 1992) que concluíram que os cães não teriam grande importância como reservatórios de *R. conorii*. Entretanto, na região de Barcelona, onde surgiu a “confirmação” do papel pouco importante do cão no ciclo natural das rickettsias (Espejo et al,

1993), foi encontrada em *R. sanguineus*, ixodídeos parasitas habituais destes mamíferos, apenas a estirpe não patogénica Mtu5 (Beati, 1993), o que sugere que aquele estudo analisou os anticorpos contra esta estirpe e não contra *R. conorii*. Em Barcelona, alguns trabalhos referiram uma seropositividade elevada, tanto em humanos como em cães, embora a incidência da Febre escaro nodular mencionada fosse baixa (48 casos em 10 anos). Foram ainda relatados casos de infecção sub-clínica (Espejo-Arenas et al, 1989). Todos estes dados apontam para que naquela região de Espanha circule uma outra espécie de rickettsia, além de *R. conorii*. Em projectos futuros, a serem realizados nos dois países, as pesquisas sobre as relações rickettsias/ixodídeos e, ainda, sobre a alimentação destes artrópodos, infectados com diferentes espécies de rickettsia ao mesmo tempo que artrópodos não infectados (“*co-feeding*”), poderão contribuir para esclarecer esta hipótese.

A espécie de micromamífero que demonstrou ser um possível reservatório de rickettsias, pelos resultados serológicos, foi o ratinho toupeira, *Microtus (Pitymys) duodecimcostatus*. Isto se não for tido em conta, não só o facto do conjugado fluoresceinado não ser espécie-específico, como o pequeno número de animais estudados. Esta espécie não é referida habitualmente como hospedeira de ixodídeos e a sua biologia compreende a permanência debaixo do solo grande parte do dia, com picos de actividades tanto diurna como nocturna e saídas à superfície apenas durante a noite. A ratazana castanha também foi encontrada, frequentemente, com anticorpos específicos contra *R. conorii*. Estes roedores são conhecidos pela tolerância imunitária que revelam perante grande parte dos agentes infecciosos, sendo portadores assintomáticos de um grande número de organismos. Contudo não foram isoladas estirpes de rickettsia a partir dos órgãos deste animal. As razões deste fracasso devem-se por um lado, a que grande parte das culturas contaminaram com outros microrganismos e, por outro, sabe-se que é, relativamente, fácil isolar rickettsias dos órgãos hematopoiéticos apenas nas primeiras duas horas após a infecção experimental de roedores (Eremeeva et al, 1995). São estas algumas das dificuldades que tornam os resultados destes estudos tão raros na literatura da especialidade. Mais ainda, para comprovar que os micromamíferos são parte fundamental do ciclo biológico das rickettsias, será necessário além de isolar do agente, realizar o xenodiagnóstico.

Quanto à serologia realizada para diagnóstico da Febre escaro nodular e em estudos epidemiológicos da população humana verificou-se que:

- a) a incidência (cerca de 10,75%) encontrada foi menor do que a prevalência (12%), se for considerado que os dados obtidos no diagnóstico serológico correspondem à infecção activa e que a prevalência é dada pelo somatório das percentagens de casos positivos nos estudos serológicos;

- b) no nosso País, a incidência, correspondendo ao número de declarações obrigatórias, tem sido constante ao longo dos últimos 5 anos (cerca de 1000 casos/ano), facto que confirma o carácter endémico da doença;
- c) a distribuição temporal dos casos diagnosticados e declarados confirma o carácter sazonal e estival da afecção, incidindo principalmente nos meses de Julho a Setembro, embora haja casos esporádicos durante todo o ano.
- d) a maior parte dos casos diagnosticados foram provenientes de indivíduos habitando áreas rurais, que apresentaram uma escara de inoculação e referiram um maior contacto com cães. Embora os indivíduos não referissem especificamente a picada da carraça, a presença dos artrópodos foi frequentemente reconhecida nos animais e na área geográfica em questão.

Como as populações, tanto humanas como animais, foram seleccionadas por conveniência de estudo esteve previsto desde o início do trabalho que os dados serológicos não seriam submetidos a análise estatística. A justificação para este procedimento vem no seguimento das discussões sobre utilização dos métodos estatísticos na área da saúde onde, geralmente, as colecções de dados têm distribuições muito assimétricas e a metodologia clássica para estudo de uma amostra não indica com precisão o que ocorre na realidade (Nogueira et al, 1996). Mesmo assim, após a conclusão, procurou-se por uma análise não paramétrica (caixas de bigodes/*box-plot*), sumária, analisar as distribuições das amostras estudadas. Confirmou-se que estas foram muito assimétricas e o seu estudo estatístico não significativo.



# **SINOPSE E RECOMENDAÇÕES**

## **SUMMARY AND RECOMMENDATIONS**



*"Zoonotic diseases are epidemiologically complex, and adequate research capability requires scientists representing multiple specialties in biology, medicine, veterinary medicine, and environmental sciences. If current trends continue, we may lose our capacity to prevent and control this group of infections."*

P.M.Schantz, Parasitic zoonoses in perspective, 1991

Com este estudo foi possível verificar que a maior parte das espécies da Família Ixodidae existentes em Portugal, tal como acontece em grande parte do continente europeu, está parasitada por diversas rickettsias, para além do já conhecido agente da Febre escaro nodular- *Rickettsia conorii*. As estirpes isoladas, com excepção das classificadas como *R. conorii*, são consideradas não patogénicas para o Homem, embora sejam imunogénicas para animais de laboratório (*R. helvetica*, *R. massiliae*, "*R. aeschlimanni*", Mtu5). A presença de *R. sibirica* deverá ser avaliada em um contexto de vigilância epidemiológica.

Com a realização deste estudo utilizaram-se, pela primeira vez em Portugal, algumas metodologias mais adequadas ao estudo deste grupo de bactérias e dos artrópodos vectores. Foi possível intensificar a cooperação com alguns serviços de medicina dos hospitais nacionais, alertando para a importância da existência de estirpes de rickettsia autóctones e para o diagnóstico diferencial necessário quando a clínica da Febre escaro nodular não se apresenta de forma clara e inequívoca.

Dos estudos seroepidemiológicos efectuados concluiu-se que os anticorpos decorrentes da infecção por rickettsias do grupo das febres exantemáticas estão presentes no homem saudável ou com diagnóstico de outras patologias, o que leva a pensar em infecções atípicas. A presença de anticorpos em cães e em algumas espécies de roedores permite sugerir a existência de uma correlação entre a transmissão de rickettsias pelos artrópodos hospedeiros e vectores aos vertebrados e a manutenção destas bactérias em um ciclo sinantrópico que se pode transformar em antroponótico.

Uma generalização que pode ser feita é a de que a população portuguesa tem uma relação ambivalente com as carraças. Por um lado, os indivíduos encaram estes artrópodos como um "facto da vida", natural para quem está em contacto com o campo e com animais, não dando grande importância aos cuidados de higiene animal e pessoal. Por outro, assim que é picado surgem as ideias do perigo que a presença da carraça pode representar. Porém, raramente, se referem aos parasitas ou agentes infecciosos que elas podem transmitir. Apenas quando é chamada a atenção para a febre da carraça, todos se recordam o quão debilitante a doença foi para si ou para seus familiares. Os custos



sócio-económicos de tal atitude, aliado ao uso indiscriminado de antibióticos, prescritos ou não, ainda não estão realmente avaliados.

Como conclusão final ficam algumas recomendações e perspectivas futuras:

- 1 – Educação das populações para a saúde e higiene, com a divulgação do papel das carraças como vectores de infecções, as maneiras de prevenir a picada e os recursos existentes a que podem recorrer quando tal acontece;
- 2 – Formação e actualização dos agentes de saúde, no que respeita aos pontos focados acima, e sobre as novas técnicas de diagnóstico laboratorial das rickettsioses;
- 3 – Pesquisa de novos testes de diagnóstico laboratorial para esclarecer quais as espécies envolvidas na patologia;
- 4 – Organização de um laboratório de referência sobre rickettsias e rickettsioses, ligado à Organização Mundial da Saúde, em Portugal, tal como os existentes na Europa de Leste (Moscou e Bratislava) e na região Mediterrânica (Marselha), específico para os ecossistemas da Península Ibérica;
- 5 – Generalização deste estudo para todo o País e estendê-lo para a pesquisa do tifo murino e da varicela rickettsiana, bem como reactivar a procura dos reservatórios animais dos agentes destas doenças na natureza;
- 6 – Continuação de estudos laboratoriais dos ixodídeos para determinar as interrelações existentes entre as rickettsias patogénicas e não patogénicas e a sua sobrevivência nestes artrópodos, bem como as relações que existem com outros agentes (borrélias e vírus) que podem, simultaneamente, ser inoculados no Homem.

## SUMMARY AND RECOMMENDATIONS

In Portugal, as in the rest of Europe, the Family Ixodidae includes several species parasitized with spotted fever group rickettsiae, in addition the already known *Rickettsia conorii*. The majority of the isolated Portuguese rickettsial strains (*R. helvetica*, *R. massiliae*, *R. slovaca*, "*R. aeschlimanni*", Mtu5) are non pathogenic, with the exception of *R. conorii*, but are immunogenic to laboratory animals. The finding in this work of a *R. sibirica* strain should be the object of an epidemiological surveillance.

This study introduced in Portugal some more recent methodology for the research the tick-borne-rickettsiae. It also enhanced the co-operation between the diagnostic laboratory and medical services, and called the attention to over the autochthonous rickettsiae and to the necessity of a differential diagnosis when the boutonneuse fever signs and symptoms are not clear.

The seroepidemiological studies performed detected the prevalence of spotted fever group rickettsiae antibodies in both healthy humans and individual presented other pathologies, there for suggesting the existence of atypical affections. The antibodies existence in dogs and sylvatic rodents allowed to establish the correlation between transmission of tick-borne-rickettsia to the vertebrate in an epizootic cycle, that could become zoonotic.

It can be generalised that the Portuguese population has an ambivalent relationship with the ticks. Firstly, they are looked as a "natural fact of life" specially by who live in rural areas or that have animals, caring not for the hygiene of both, animals and personal. On the other hand, as soon as they are bitten they become very concerned with the tick, but seldom remember the parasites or infectious agents that can be tick-bite transmitted. Only when boutonneuse fever is mentioned, people recall how bad this disease can be to themselves and to others. The socio-economic costs, and the effect of the prescribed and non-prescribed antibiotic use, are not evaluated yet.

As a final reflection some recommendations and future perspectives for research are suggested:

- 1 – Public education, emphasizing the role of ticks as vectors of infectious agents, the ways to prevent the tick-bite and where to go and what to do when this happens should be implemented;

- 2 – Teach and update the health personal about those subjects and about new laboratory for rickettsiosis diagnostic techniques are required;
- 3 – The development of new laboratory diagnostic tools to establish wich rickettsia species are involved in the disease;
- 4 – Set up of a WHO rickettsial reference laboratory in Portugal, specific for the Iberian Peninsula ecological conditions, like exists in East Europe (Moscow and Bratislava) and in Mediterranean area (Marseille);
- 5 – To perform similar studies in another areas of the country, and to initiate a systematic research of murine typhus and rickettsialpox, as well as to re-establish the search for the rickettsiae natural vertebrate reservoirs;
- 6 – To continue the laboratory tick studies in order to determine the survival and relationships among the pathogenic and non-pathogenic rickettsiae in the tick, and to determine the relationships with other groups of tick-borne agents, such as borrelia and virus, that can be transmitted simultaneously to man.

# **ANEXO**



## CÉLULAS DE LINHA

Vero E6 – C1008 American Type Culture Collection

As células Vero C1008 é um clone originado a partir do epitélio renal de macaco-verde, Vero 76.

### 1. Cultura e subcultura de células de linha

#### 1.1. Material

1. câmara de fluxo laminar
2. estufa a 37°C
3. pipetas
4. frascos para cultura de células de 150 ml, 50 ml ou 25 ml de capacidade
5. reagentes:
  - tampão PBS pH 7,4 (Sigma)
  - tripsina 2% em meio de Hanks (Sigma)
  - versene 1% em PBS pH 7,4
  - meio de cultura 199 (Gibco) suplementado com bicarbonato de sódio (0,35 g) e soro bovino (8%) para manutenção da linha celular
  - meio de cultura MEM (Eagle's Minimal Essential Medium – Gibco) suplementado com glutamina (1%) e soro bovino (8%), sem antibióticos, para inoculação de rickettsias.

Os volumes de reagentes são proporcionais ao volume do frasco:

Frasco de 150 ml: 50 ml de meio de cultura

Frasco de 50 ml: 20 ml de meio de cultura

Frasco de 25 ml: 5 ml de meio

Frasco de 3 ml de capacidade (shell vial): 1ml de MEM com 107 células por ml

#### 1.2. Técnica para Inoculação de células VeroE6

1. Retira-se por decantação o meio de cultura de um frasco com uma camada de células a cobrir por completo uma das faces do frasco
2. Com uma pipeta coloca-se o tampão e lava-se a camada celular, uma ou duas vezes
3. Coloca-se tripsina com 2% de versene e deixa-se actuar por alguns minutos, a 37°C. A tripsina vai actuar sobre os desmosomas celulares e soltar as células da parede do frasco
4. Colocar o meio de cultura para inibir a acção da tripsina e obter uma suspensão homogénea das células
5. Retirar a suspensão e diluir no meio de cultura (199 completo para manutenção e MEM completo para inoculação de rickettsias) na razão de 1:8 para inoculação de novos frascos. Distribuir o meio de cultura com as células em suspensão células para frascos novos e incubar a 37°C.



# **BIBLIOGRAFIA**





1. Aeschlimann A, Burgdorfer W, Matile H, Peter O, Wyler R. Aspects Nouveaux du Rôle de Vecteur Joué par *Ixodes ricinus* L. en Suisse. *Acta trop* 1979;36:181-191.
2. Aeschlimann A, Schneeberger S, Pfister K, Burgdorfer W, Cotty A. Données Nouvelles sur les Tiques Ixodides du Canton du Tessin (Suisse) et sur la Présence d'Agents Rickettsiens dans leur Hémolymphe. *Annuaire Soc Helv Sc Nat* 1986;1:58-68.
3. Ahern H. Does a Molecular Clock Tick for Bacteria? *ASM News* 1994;60(11):600-603.
4. Akov S. Blood Digestion in Ticks. *Physiology of Ticks* 1982;6:197-211.
5. Albaladejo L. Tifus Exantemático y Otras Rickettsiosis Exantemáticas. Opúsculos sobre Investigación y Clínica 1941;1a Edición:5-111.
6. Aliabadi Z, Winkler HH, Wood DO. Isolation and Characterization of the *Rickettsia prowazekii* Gene Encoding the Flavoprotein Subunit of Succinate Dehydrogenase. *Gene* 1993;133:135-140.
7. Amnan R, Ludwig W, Schleifer KH. Identification of Uncultured Bacteria: A Challenging Task for Molecular Taxonomists. *ASM News* 1994;60(7):360-365.
8. Anacker RL, McCaul TF, Burgdorfer W, Gerloff RK. Properties of Selected Rickettsiae of the Spotted Fever Group. *Infect Immun* 1980;27(2):468-474.
9. Anacker RL, Philip RN, Williams JC, List RH, Mann RE. Biochemical and Immunochemical Analysis of *Rickettsia rickettsii* Strains of Various Degree of Virulence. *Infect Immun* 1984;44(3):559-564.
10. Anacker RL, List RH, Mann RE, Hayes SF, Thomas LA. Characterization of Monoclonal Antibodies Protecting Mice against *Rickettsia rickettsii*. *J Infect Diseases* 1985;151(6):1052-1060.
11. Anacker RL, List RH, Mann RE, Wiedbrauk DL. Antigenic Heterogeneity in High- and Low-Virulence Strains of *Rickettsia rickettsii* Revealed by Monoclonal Antibodies. *Infect Immun* 1986;51(2):653-660.
12. Anacker RL, Mann RE, Gonzales C. Reactivity of Monoclonal Antibodies to *Rickettsia rickettsii* with Spotted Fever and Typhus Group Rickettsiae. *J Clin Microbiol* 1987;25(1):167-171.
13. Andersen DR, Hopps HE, Barile MF, Bernheim BC. Comparison of the Ultrastructure of Several Rickettsiae, Ornithosis Virus, and Mycoplasma in Tissue Culture. *J Bacteriol* 1965;90(5):1387-1404.
14. Anderson BE, Regnery RL, Carlone GM, Tzianabos T, McDade JE, Fu ZY, Bellini WJ. Sequence Analysis of the 17-Kilodalton-Antigen Gene from *Rickettsia rickettsii*. *J Bacteriol* 1987;169(6):2385-2390.
15. Anderson BE, Baumstark BR, Bellini WJ. Expression of the Gene Encoding the 17-Kilodalton Antigen from *Rickettsia rickettsii*: Transcription and Posttranslational Modification. *J Bacteriol* 1988;170(10):4493-4500.
16. Anderson BE, Tzianabos T. Comparative Sequence Analysis of a Genus-Common Rickettsial Antigen Gene. *J Bacteriol* 1989;171(9):5199-5201.
17. Anderson BE, McDonald GA, Jones DC, Regnery RL. A Protective Protein Antigen of *Rickettsia rickettsii* Has Tandemly Repeated, Near-Identical Sequences. *Infect Immun* 1990;58:2760-2769.
18. Andersson S, Amiri H, Jamal A, Zomorodipour A, Kurland C. Evolution of Small Genomes: *Rickettsia prowazekii*. Twelfth Sesqui-Annual Meeting of the ASRRD 1996.
19. Andersson SGE, Zomorodipour A, Winkler HH, Kurland CG. Unusual Organization of the rRNA Genes in *Rickettsia prowazekii*. *J Bacteriol* 1995;177(14):4171-4175.
20. Andrew R, Bonnin JM, Williams S. Tick Typhus in North Queensland. *Med J Australia* 1946;2:253-258.
21. Aniskovich LP, Motin VL, Lichoded LJ, Balayeva NM, Smirnov GB. Identification of *Rickettsia prowazekii* Using the Polymerase Chain Reaction. *Eur J Epidemiol* 1993;9(6):645-649.
22. Archibald LK, Sexton DJ. Long-Term Sequelae of Rocky Mountain Spotted Fever. *Clin Infect Diseases* 1995;20:1122-1125.

23. Arranz Caso JA, Manzano Espinosa L, Albarrán Hernández F, Alvarez de Món M. Encefalitis por *Rickettsia conorii*. *Medicina Clínica* 1992;98:238-239.
24. Arthur DR. *Ticks and Disease*. Pergamon Press 1962.
25. Atwood EL, Lamb, Jr JT, Sonenshine DE. A Contribution to the Epidemiology of Rocky Mountain Spotted Fever in the Eastern United States. *Am J Trop Med Hyg* 1965;14(5):831-837.
26. Aubertin J, Lepoutre R. As Rickettsioses na Actualidade. *J Med* 1974;85(1609):156-158.
27. Austin FE, Turco J, Winkler HH. *Rickettsia prowazekii* Requires Host Cell Serine and Glycine for Growth. *Infect Immun* 1987;55(1):240-244.
28. Austin FE, Winkler HH. Relationship of Rickettsial Physiology and Composition to the Rickettsia-Host Cell Interaction. *Biology of Rickettsial Diseases*, vol. D. (ed.) 1988;CRC Press, Inc:29-50.
29. Azad AF. Relationship of Vector Biology and Epidemiology of Louse and Flea-Borne Rickettsioses. *Biology of Rickettsial Diseases* 1988;1:51-62.
30. Azad AF, Traub R. Experimental Transmission of Murine Typhus by *Xenopsylla* flea bites. *Med Vet Entomol* 1989;3:429-433.
31. Azad AF. Epidemiology of Murine Typhus. *Annu Rev Entomol* 1990;35:553-569.
32. Azad AF, Sacci JB, Nelson WM, Dasch GA, Schmidtman ET, Carl M. Genetic Characterization and Transovarial Transmission of a Typhus-like Rickettsia Found in Cat Fleas. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:43-46.
33. Azevedo A. A Febre Botonosa de Conor e Bruch (Febre Escaro-Nodular de Ricardo Jorge) em Coimbra. *Coimbra Médica* 1937;4:571-614.
34. Azevedo A. Tratamento da Febre Escaro-Nodular pelo Acido Para-Aminobenzóico (Primeiros Resultados). *Coimbra Médica* 1948;15(1):45-61.
35. Babalis T, Dupont HT, Tselentis Y, Chatzichristodoulou C, Raoult D. *Rickettsia conorii* in Greece: Comparison of a Microimmunofluorescence Assay and Western Blotting for Seroepidemiology. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48(6):784-792.
36. Babalis T, Tselentis Y, Roux V, Psaroulaki A, Raoult D. Isolation and Identification of a Rickettsial Strain Related to *Rickettsia massiliae* in Greek Ticks. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50(3):365-372.
37. Bacellar F, Nuncio MS, Filipe AR. Formas de *Tripanossoma* na Hemolinfa de Ixodídeos. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias* 1990;85(495):158-159.
38. Bacellar F, Nuncio MS, Rehacek J, Filipe AR. Rickettsiae and Rickettsioses in Portugal. *Eur J Epidemiol* 1991;7(3):291-293.
39. Bacellar F, Regnery RL, Nuncio MS, Filipe AR. Genotypic Evaluation of Rickettsial Isolates Recovered from Various Species of Ticks in Portugal. *Epidemiol Infect* 1995a;114:169-178.
40. Bacellar F, Nuncio MS, Alves MJ, Filipe AR. *Rickettsia slovaca*: Un Agente del Grupo de las Fiebres Exantemáticas, en Portugal. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1995b;13:218-223.
41. Bacellar F, Dawson JE, Silveira CA, Filipe AR. Antibodies Against Rickettsiaceae in Dogs of Setúbal, Portugal. *Centr Eur J Publ Hlth* 1995c;3(2):100-102.
42. Bacellar RC. *Brazil's Contribution to Tropical Medicine and Malaria Personalities and Institutions*. Gráfica Olímpica Ed 1963;Rio de Janeiro.
43. Baird RW, Lloyd M, Stenos J, Ross BC, Stewart RS, Dwyer B. Characterization and Comparison of Australian Human Spotted Fever Group Rickettsiae. *J Clin Microbiol* 1992;30(11):2896-2902.
44. Baird RW, Stenos J, Stewart R, Hudson B, Lloyd M, Aiuto S, Dwyer B. Genetic Variation in Australian Spotted Fever Group Rickettsiae. *J Clin Microbiol* 1996;34(6):1526-1530.

45. Bakken JS, Dumler JS, Chen S-M, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH. Human Granulocytic Ehrlichiosis in the Upper Midwest: A New Species Emerging? *JAMA* 1994;272:212-218.
46. Balayeva NM, Nikolskaya VN. Increased Virulence of the E Vaccine Strain of *Rickettsia prowazeki* passaged in the Lungs of White Mice and Guinea Pigs. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1973;17:11-20.
47. Balayeva NM, Nikolskaya VN. Experimental Forms of Infection and Serological Analysis of the Antigenic Structure of *Rickettsia canada*. *J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol* 1977;21:424-432.
48. Balayeva NM, Eremeeva ME, Raoult D. Genomic Identification of *Rickettsia slovaca* among Spotted Fever Group *Rickettsia* Isolates from *Dermacentor marginatus* in Armenia. *Acta virol* 1994;38:321-325.
49. Beati L, Finidori JP, Gilot B, Raoult D. Comparison of Serologic Typing, Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis Protein Analysis, and Genetic Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis for Identification of *Rickettsia*: Characterization of Two New *Rickettsia* Strains. *J Clin Microbiol* 1992;30(8):1922-1930.
50. Beati L. Approche Moléculaire de l'Épidémiologie des Rickettsioses du Groupe Boutonneux. Spécificité du Rapport Tiques-Rickettsies. These Docteur de l'Université d'Aix-Marseille II 1993.
51. Beati L, Peter O, Burgdorfer W, Aeschlimann A, Raoult D. Confirmation that *Rickettsia helvetica* sp. nov. Is a Distinct Species of the Spotted Fever Group of *Rickettsia*. *Int J System Bacteriol* 1993a;43(3):521-526.
52. Beati L, Raoult D. *Rickettsia massiliae* sp. nov., a New Spotted Fever Group *Rickettsia*. *Int J System Bacteriol* 1993a;43(4):839-840.
53. Beati L, Finidori JP, Raoult D. First Isolation of *Rickettsia slovaca* from *Dermacentor Marginatus* in France. *Am J Trop Med Hyg* 1993b;48(2):257-268.
54. Beati L, Raoult D. Nouvelles Rickettsies du Groupe Boutonneux en France et dans le Monde. *Med Mal Infect* 1993b;23:491-498.
55. Beati L, Roux V, Ortuno A, Segura-Porta F, Raoult D. Characterization of Six Spotted Fever Group *Rickettsia* Strains Isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* Ticks. VIII Society for Vector Ecology European Meeting 1994;Barcelona:39-.
56. Beati L, Humair PF, Aeschlimann A, Raoult D. Identification of Spotted Fever Group *Rickettsia* Isolated from *Dermacentor marginatus* and *Ixodes ricinus* Ticks Collected in Switzerland. *Am J Trop Med Hyg* 1994a;51(2):138-148.
57. Beati L, Kelly PJ, Mason PR, Raoult D. Species-Specific BALB/c Mouse Antibodies to *Rickettsia* Studied by Western Blotting. *FEMS Microbiol Letters* 1994b;119:339-344.
58. Beati L, Bacellar F, Kelly PJ, Meskini M, Raoult D. *Hyalomma marginatum* Ticks and Spotted Fever Group *Rickettsia*: A New Association in Need of Investigations. The 2nd International Conference on Tick Borne Pathogens at the Host-Vector Interface (THPI) 1995;Kruger National Park, South Africa.
59. Belan I, Bull CM. Host Detection by Four Australian Tick Species. *J Parasitol* 1991;77(3):337-340.
60. Bell EJ, Pickens EG. A Toxic Substance Associated with the *Rickettsia* of the Spotted Fever Group. *J Immunol* 1953;70:461-472.
61. Bell EJ, Stoenner HG. Immunologic Relationships Among the Spotted Fever Group of *Rickettsia* Determined by Toxin Neutralisation Tests in Mice with Convalescent Animal Serums. *J Immunol* 1960;84:171-182.
62. Bell EJ, Stoenner HG. Spotted Fever Vaccine: Potency Assay by Direct Challenge of Vaccinated Mice with Toxin of *Rickettsia rickettsii*. *J Immunol* 1961;87:737-746.
63. Bell EJ, Kohls GM, Stoenner HG, Lackman DB. Nonpathogenic *Rickettsia* Related to the Spotted Fever Group Isolated from Ticks, *Dermacentor variabilis* and *Dermacentor andersoni* from Eastern Montana. *J Immunol* 1963;90:770-781.
64. Bengtson IA. Complement Fixation in the *Rickettsia* Diseases. *Technique of the Test*. 1944;1:402-405.
65. Bengtson IA. Family *Rickettsiaceae*. *Bergey's Manual* 1948;6.ª Edição:37, 1083-1099.

66. Berger S. Manual and Determinative Bacteriology. Williams Wilkins Ed 1923;1.<sup>a</sup> Edição:1-23.
67. Bertram DS. Rickettsial Infections and Ticks. Symp Zool Soc London 1962;6:179-197.
68. Bier O. Galeria de Tropicalistas Brasileiros. Rocha Lima. Rev Inst Med Trop S Paulo 1960;2(5):243.
69. Blanc G, Caminopetros J. Études Épidémiologiques et Expérimentales sur la Fièvre Boutonneuse, Faites a L'Institut Pasteur DBAthènes. Arch Inst Pasteur Tunis 1932;XX(4):341-393.
70. Boese JL, Wisseman, Jr CL, Walsh WT, Fiset P. Antibody and Antibiotic Action on Rickettsia prowazekii in Body Lice across the Host-vector Interface, with Observations on Strain Virulence and Retrieval Mechanisms. Am J Epidemiol 1973;98(4):262-281.
71. Bovarnick MR, Snyder JC Respiration of Typhus rickettsiae. J Exp Med 1949;89:561-565.
72. Bovarnick MR, Miller JC. Oxidation and Transamination of Glutamate by Typhus Rickettsiae. J Biol Chem 1950;184:661-676.
73. Bovarnick MR. Phosphorylation Accompanying the Oxidation of Glutamate by the Madrid E Strain of Typhus rickettsiae. J Biol Chem 1956;220:353-361.
74. Bovarnick MR, Allen EG. Reversible Inactivation of the Toxicity and Hemolytic Activity of Typhus Rickettsiae by Starvation. J Bacteriol 1957;74:637-645.
75. Bozeman FM, Humphries JW, Campbell JM, O'Hara PL. Laboratory Studies of the Spotted Fever Group of Rickettsiae. Medical Science Publication N°7. Washington: Walter Reed Army Institute of Research 1960;C.L.Wisseman, Jr (ed.), Symposium on the Spotted Fever Group of Rickettsiae.
76. Bozeman FM, Elisberg BL, Humphries JW, Runcik K, Palmer, Jr DB. Serologic Evidence of Rickettsia canada Infection of Man. J Infect Dis 1970;121(4):367-371.
77. Bozeman FM, Masiello SA, Williams MS, Elisberg BL. Epidemic Typhus Rickettsiae Isolated from Flying Squirrels. Nature 1975;255:545-547.
78. Breitschwerdt EB, Moncol DJ, Corbett WT, MacCormack JN, Burgdorfer W, Ford RB, Levy MG. Antibodies to Spotted Fever-group Rickettsiae in Dogs in North Carolina. Am J Vet Res 1987;48:1436-1440.
79. Breitschwerdt EB, Walker DH, Levy MG, Burgdorfer W, Corbett WT, Hurlbert SA, Stebbins ME, Curtis BC, Allen DA. Clinical, Hematologic and Humoral Immune Response in Female Dogs Inoculated with Rickettsia rickettsii and Rickettsia montana. Am J Vet Res 1988;49(1):70-76.
80. Brenner DJ, O'Connor SP, Winkler HH, Steigerwalt AG. Proposals to Unify the Genera Bartonella and Rochalimaea, with Descriptions of Bartonella quintana comb. nov., Bartonella vinsonii comb. nov., Bartonella henselae comb. nov., and Bartonella elizabethae comb. nov., and To Remove the Family Bartonellaceae from the Order Rickettsiales. Int J Syst Bacteriol 1993;43(4):777-786.
81. Brettman LR, Lewin S, Holzman RS, Goldman WD, Marr JS, Kechijian P, Schinella R. Rickettsialpox: Report of an Outbreak and a Contemporary Review. Medicine Baltimore 1981;60:363-372.
82. Brezina R, Rehacek J, Ac P, Majerska M. Two Strains of Rickettsiae of Rocky Mountain Spotted Fever Group Recovered from Dermacentor marginatus Ticks in Czechoslovakia. Results of Preliminary Serological Identification. Acta virol 1968;13:142-145.
83. Brezina R, Murray ES, Tarizzo ML, Bogel K. Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Bull WHO 1973;49:433-442.
84. Brinton LP, Burgdorfer W. Fine Structure of Rickettsia canada in Tissues of Dermacentor andersoni Stiles. J Bacteriol 1971;105(3):1149-1159.
85. Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. Biology of Microorganisms. Prentice-Hall International, Inc 1994;Seventh Edition.
86. Brouqui P, Dupont HT, Drancourt M, Bourgeade A, Raoult D. Spotless Boutonneuse Fever. Clin Infect Diseases 1992a;14:114-116.
87. Brouqui P, Delmont J, Raoult D, Bourgeade A. Etat Actuel des Connaissances sur l'Epidemiologie des Rickettsioses en Afrique. Bull Soc Pathol Ex 1992b;85:359-364.

88. Brumpt E. La Fievre Boutonneuse et la Fievre Pourpree des Montagnes Rocheuses sont Deux Maladies Distinctes. Resultats de l'Epreuve de l'Immunité Croisee dans les Maladies Exanthematiques. *Compt Rend Soc Biol* 1932a;110:1197-.
89. Brumpt E. Longevite du Virus de la Fievre Boutonneuse (*Rickettsia conori*, n. sp.) chez la Tique, *Rhipicephalus sanguineus*. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Sciences et Memoires de la Societe de Biologie* 1932b;110:1199-1202.
90. Brumpt E. *Precis de Parasitologie*. Masson et Cie, Editeurs 1949; 6.ª Edição.
91. Burgdorfer W, Lackman D. Identification of *Rickettsia rickettsii* in the Wood Tick, *Dermacentor andersoni*, by Means of Fluorescent Antibody. *J Infect Dis* 1960;107:241-244.
92. Burgdorfer W, Friedhoff KT, Lancaster JL. Natural History of Tick-Borne Spotted Fever in the USA. Susceptibility of Small Mammals to Virulent *Rickettsia rickettsii*. *Bull Org Mond Sante* 1966;35:149-153.
93. Burgdorfer W, Anacker RL, Bird RG, Bertram DS. Intranuclear Growth of *Rickettsia rickettsii*. *J Bacteriol* 1968;96(4):1415-1418.
94. Burgdorfer W. Observations on *Rickettsia canada*, a Recently Described Member of the Typhus Group *Rickettsiae*. *J Hyg Epid Microbiol Immunol* 1968;12:26-31.
95. Burgdorfer W. Hemolymph Test. A Technique for Detection of *Rickettsiae* in Ticks. *Am J Trop Med Hyg* 1970;19(6):1010-1014.
96. Burgdorfer W, Brinton LP. Intranuclear Growth of *Rickettsia canada*, a Member of the Typhus Group. *Infect Immun* 1970;2:1121-14.
97. Burgdorfer W. A Review of Rocky Mountain Spotted Fever (Tickborne Typhus), its Agent, and its Tick Vectors in the United States. *J Med Entomol* 1975;12(3):269-278.
98. Burgdorfer W, Brinton LP. Mechanisms of Transovarial Infection of Spotted Fever *Rickettsiae* in Ticks. *Ann New York Acad Sciences* 1975;266:61-72.
99. Burgdorfer W, Sexton DJ, Gerloff RK, Anacker RL, Philip RN, Thomas LA. *Rhipicephalus sanguineus*: Vector of a New Spotted Fever Group *Rickettsia* in the United States. *Infect Immun* 1975;12:205-210.
100. Burgdorfer W. Tick-borne Diseases in the United States: Rocky Mountain Spotted Fever and Colorado Tick Fever A Review. *Acta Tropica* 1977;34(2):103-126.
101. Burgdorfer W, Brinton LP, Kryski WL, Philip RN. *Rickettsia rhipicephali*, A New Spotted Fever Group *Rickettsia* from the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. J. R.A.Ormsbee and I. (ed.) 1978sVEDA Publishing House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava.
102. Burgdorfer W, Aeschlimann A, Peter O, Hayes SF, Philip RN. *Ixodes ricinus*: Vector of a Hitherto Undescribed Spotted Fever Group Agent in Switzerland. *Acta Tropica* 1979;36:357-367.
103. Burgdorfer W. The Spotted Fever-Group Diseases. *CRC Handbook Series in Zoonoses* 1980sl:279-300.
104. Burgdorfer W, Hayes SF, Mavros AJ. Nonpathogenic *Rickettsiae* in *Dermacentor andersoni*: A Limiting Factor for the Distribution of *Rickettsia rickettsii*. Burgdorfer, W, Anacker, RL (ed. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases* 1981;Academic Press, N Y:585-594.
105. Burnet FM. The *Rickettsial* Diseases in Australia. *Med J Aust* 1942;2:129-134.
106. Bustamante ME, Varela G. Distribucion de las *Rickettsiasis* em Mexico. *Rev Inst Salubr Enferm Trop* 1947;8(1):3-14.
107. Busvine JR. Arthropod Vectors of Disease. *Studies in Biology* 1975;55:1-67.
108. Caeiro V, Simões AL. Relatórios Anuais do Programa de Luta contra os Ixodoidea e Prospecção e Luta contra as Hemoparasitoses, Referentes a 1982-1990a.
109. Caeiro V, Santos e Silva MM, Simões AJ, Nuncio MS. *Ixodes* (*Pholeoixodes*) *canisuga* Johnston, 1849, Uma Espécie Nova na Ixodofauna em Portugal. *Env p publ*.

110. Caeiro V, Simões AL. Sobre a Existência do *Haemaphysalis hispanica* Gil. *Rev Prot Cienc Vet* 1987;82(483):275-280.
111. Caeiro V, Pereira MAC, Simões AL. Ecto e Endoparasitas do Coelho Bravo *Oryctolagus cuniculus* (Lineu, 1758) em Algumas Regiões do Alentejo. *Med Vet* 1987;8:19-25.
112. Caeiro V, Simões AL. Ixodofauna das Espécies Silvestres em Portugal Continental II - Ixodídeos Parasitas do Javali (*Sus scrofa ferus*). *Med Vet* 1990b;19:43-48.
113. Caeiro V, Simões AL. Ixodoidea da Fauna Silvestre em Portugal Continental. Interesse do seu Conhecimento. *Rev Port Cien Vet* 1991a;86(497):20-30.
114. Caeiro V, Simões AL. Ixodofauna das Espécies Silvestres em Portugal Continental I - Ixodídeos Parasitas da Raposa (*Vulpes vulpes silacea* Miller, 1907). *Med Vet* 1991b;3(18):7-17.
115. Caeiro V. As Carraças em Portugal: Seus Hospedeiros Domésticos e Silvestres. Ciclos Vitais, Preferências de Vegetação e de Clima. *Med Vet* 1992;28:7-25.
116. Caeiro V, Núncio MS, Simões AJL, Vila Viçosa MJ, Silva MM. Contribuição ao Estudo dos Parasitas do *Apodemus sylvaticus* (Linnaeus, 1758). *O Med Vet* 1996;45:37-40.
117. Campbell RW, Pope JH. The Value of Newborn Mice as a Sensitive Host for *Rickettsia australis*. *Aust J Sci* 1968;30:324-325.
118. Campbell RW, Domrow R. Rickettsioses in Australia: Isolation of *Rickettsia tsutsugamushi* and *R. Australis* from Naturally Infected Arthropods. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1974;68(5):397-402.
119. Carmo G, Saleiro MA, Justino J. Febre Escaro-Nodular. A Propósito de um Caso Clínico com Inulgar Porta de Entrada. *Rev Port Doenças Infecciosas* 1981a;4:51-55.
120. Carmo G, Rodrigues M, Paiva JED. Febre Escaro-Nodular «versus» Doença de Weil. A Propósito de um Caso Clínico cujo Diagnóstico só foi Possível pela Imunofluorescência Indirecta. *Rev Port Doenças Infecciosas* 1981b;4:57-63.
121. Carmo G, Caixeiro IS, Uva AS, Paiva JED. Febre Escaro-Nodular. Actualização Teórica e Análise Retrospectiva de 231 Casos. *Rev Port Doenças Infecciosas* 1981c;4(1):13-28.
122. Castella S, Villar T, Badal J, Pons R, Gilabert J, Torres C, Torner F. Fiebre Botonosa Mediterránea Maligna. Shock Séptico de Origen Desconocido? *Rev Clin Esp* 1991;188(4):199-201.
123. Castro RS, Vasconcelos O, Marques R. Infecção Anos 80. Dez Anos de Internamentos no Serviço de Doenças Infecciosas do Hospital de Joaquim Urbano. *Rev Port Doenças Infecciosas* 1993;16(2):93-98.
124. Chamot E, Chatelanat P, Humair L, Aeschlimann A, Bowessidjaou J. Cinq Cas de Fièvre Boutonneuse Méditerranéenne en Suisse. *Ann Parasitol Hum Comp* 1987;62(5):371-379.
125. Chiner E, Gómez J, Betloch I, Alcacer E, Garcia M, Navarro D. Infarto Isquémico Cerebral en el Curso de la Fiebre Botonosa Mediterránea. *Enferm Infec Microbiol Clin* 1989;7:78-79.
126. Clifford CM, Sonenshine DE, Atwood EL, Robbins CS, Hughes LE. Tests on Ticks from Wild Birds Collected in the Eastern United States for *Rickettsiae* and Viruses. *Am J Trop Med Hyg* 1969;18:1057-1061.
127. Conor A, Bruch A. Une Fièvre Éruptive Observée en Tunisie. *Bull Soc Path Exot* 1910;8:492-496.
128. Conti-Díaz IA, Rubio I, Somma Moreira RE, Pérez Bórmida G. Rickettsiosis Cutáneo Ganglionar por *Rickettsia conorii* en el Uruguay. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1990;32(5):313-318.
129. Correia FS. A Vida, a Obra, o Estilo, as Lições e o Prestígio de Ricardo Jorge. Ed. Instituto Superior de Higiene Dr. Ricardo Jorge 1960.
130. Cowan ST. Cowan & Steel's Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press 1968.
131. Cox HR. The Spotted-Fever Group. *Rocky Mountain Spotted Fever* 1965;1:828-867.

132. Crocquet-Valdes PA, Weiss K, Walker DH. Sequence Analysis of the 190-kDa Antigen-Encoding Gene of *Rickettsia conorii* (Malish 7 Strain). *Gene* 1994;140:115-119.
133. Cutileiro J. Um caso de Rickettsiose (Tifo Murino). *Lisboa Médica* 1940;17(7):445-457.
134. Cutileiro J, Madeira F, Nina C, Sampaio A. Primeiras Impressões Acerca do Tratamento das Rickettsioses pela Aureomicina. *J Soc Cienc Med Lisboa* 1949a;113(3,4 e 5):89-99.
135. Cutileiro J, Sampaio A. Administração de Aureomicina no Período Pré-Exantemático das Rickettsioses. *J Soc Cienc Med Lisboa* 1949b;113(7,8 e 9):263-272.
136. Cutileiro J. Considerações Acerca do Tratamento das Rickettsioses Exantemáticas pela Aureomicina. *J Soc Cienc Med Lisboa* 1950;114(5):179-192.
137. Cwikel BJ, Ighbarieh J, Sarov I. Antigenic Polypeptides of Israeli Spotted Fever Isolates Compared with Other Spotted Fever Group *Rickettsiae*. *Ann New York Acad Sciences* 1990;590:381-388.
138. Dalton MJ, Clarke MJ, Holman RC, Krebs JW, Fishbein DB, Olson JG, Childs JE. National Surveillance for Rocky Mountain Spotted Fever, 1981-1992: Epidemiologic Summary and Evaluation of Risk Factors for Fatal Outcome. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52(5):405-413.
139. Dame JB, Mahan SM, Yowell CA. Phylogenetic Relationship of *Cowdria ruminantium*, Agent of Heartwater, to *Anaplasma marginale* and Other Members of the Order *Rickettsiales* Determined on the Basis of 16S rRNA Sequence. *Int J System Bacteriol* 1992;42(2):270-274.
140. Dasch GA, Samms JR, Weiss E. Biochemical Characterization of Typhus Group *Rickettsiae* with Special Attention to the *Rickettsia prowazekii* Strains Isolated from Flying Squirrels. *Infect Immun* 1978;19:676-685.
141. Dasch GA, Bourgeois AL. Antigens of the Typhus Group of *Rickettsiae*: Importance of the Species-Specific Surface Protein Antigens in Eliciting Immunity. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases* 1981;1:61-70.
142. Dasch GA. Isolation of Species-Specific Protein Antigens of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia prowazekii* for Immunodiagnosis and Immunoprophylaxis. *J Clin Microbiol* 1981;14(3):333-341.
143. Dasch GA, Weiss E. The genera *Rickettsia*, *Rochalimaea*, *Ehrlichia*, *Cowdria*, and *Neorickettsia*. Balows, A. et al, eds. *The Prokaryotes*. New York: Springer-Verlag 1992.
144. Dasinger BL, Wilson JB. Glutamate Metabolism in *Brucella abortus* Strains of Low and High Virulence. *J Bacteriol* 1962;84:911-915.
145. Dawson JE, Anderson BE, Fishbein DB, Sanchez JL, Goldsmith CS, Wilson K, Duntley CW. Isolation and Characterization of an *Ehrlichia* sp. from a Patient Diagnosed with Human Ehrlichiosis. *J Clin Microbiol* 1991;29:2741-2745.
146. Dawson JE, Warner CK, Standaert S, Olson JG. The Interface Between Research and the Diagnosis of an Emerging Tick-Borne Disease, Human Ehrlichiosis Due to *Ehrlichia chaffeensis*. *Arch Intern Med* 1996;156:137-142.
147. Demkin VV, Rydkina EB, Lichoded YA, Ignatovich VF, Genig VA, Balayeva NM. Genotypic Characterization of *Rickettsiae* by DNA Probes Generated from *Rickettsia prowazekii* DNA. *Acta Virol* 1994;38:65-70.
148. DGCSP – Serviço de Informação de Saúde. Doenças de Declaração Obrigatória 1985 – 1993. Ministério da Saúde, Lisboa, Portugal 1994.
149. Dias E, Martins AV. Spotted Fever in Brazil. *Am J Trop Med* 1939;9:103-107.
150. Dias JATS. Mais Dois Novos Ixodídeos (Acarina = Ixodoidea) para a Fauna de Portugal. *Bol Soc Port Entomol* 1990;IV/15(117):154-170.
151. Dias JATS, Caeiro V, Simões AL, Nuncio MS. Algumas Considerações Acerca das Espécies do Género *Dermacentor* Koch, 1844 (Acarina: Ixodoidea) Existentes em Portugal. *Garcia de Orta* 1993;18(1-2):13-18.
152. Dias JATS. As Carrças (Acarina-Ixodoidea) da Península Ibérica. Algumas Considerações sobre a sua Biogeografia e Relacionamento com a Ixodofauna Afropaleártica e Afrotropical. *Estudos, Ensaios e Documentos Lisboa* 1994;158:1-163.





153. Dias JATS, Nuncio MS, Gonçalves ACB. Contribuição para a Elaboração de um Inventário da Fauna Ixodoideológica (Acarina-Ixodoidea) de Portugal. *Sep Garcia de Orta Sér Zool* 1994;20(1 e 2):49-68.
154. Dias JATS, Nuncio MS. Um Novo Achado Ixodológico (Acarina-Ixodoidea) para a Fauna de Portugal *Ixodes (Eschatocephalus) simplex simplex* Neumann, 1906. Garcia de Orta Em publ.
155. Ding HF, Winkler HH. Characterization of the DNA-melting Function of the *Rickettsia prowazekii* RNA Polymerase. *J Biol Chem* 1993;268(6):3897-3902.
156. Ding HF, Winkler HH. The Molar Ratio of  $\alpha 73$  to Core Polymerase in the Obligate Intracellular Bacterium, *Rickettsia prowazekii*. *Molecul Microbiol* 1994;11(5):869-873.
157. Drancourt M, Beati L, Tarasevich I, Raoult D. Astrakan Fever *Rickettsia* is identical to Israel Tick Typhus *Rickettsia*, a Genotype of the *Rickettsia conorii* Complex. *J Infect Diseases* 1992a;165:1167-1168.
158. Drancourt M, Kelly PJ, Regnery R, Raoult D. Identification of Spotted Fever Group *Rickettsiae* Using Polymerase Chain Reaction and Restriction-Endonuclease Length Polymorphism Analysis. *Acta Virol* 1992b;36:1-6.
159. Drancourt M, Raoult D. La Fievre Boutonneuse Mediterraneenne. *Mediterranee Medicale* 1993;3:21-24.
160. Drancourt M, Raoult D. Taxonomic Position of the *Rickettsiae*: Current Knowledge. *FEMS Microbiol Rev* 1994;13:13-24.
161. Dumler JS. Murine Typhus. *Seminars in Pediatric Infectious Diseases* 1994;5(2):137-142.
162. Dumler JS, Bakken JS. Ehrlichial Diseases of Humans: Emerging Tick-Borne Infections. *Clin Infect Dis* 1995;20:1102-1105.
163. Dumler JS, Bakken J, Granstrom M, Kristiansen B, Asanovich K, Krueth J, Dotevall L, Gustafsson R. Serologic Evidence of Human Granulocytic Ehrlichiosis (HGE) in Sweden and Norway. Twelfth Sesqui-Annual Meeting of the ASRRD 1996.
164. Dunkin SM, Wood DO. Isolation and Characterization of the *Rickettsia prowazekii* *recA* Gene. *J Bacteriol* 1994;176(6):1777-1781.
165. Dupont HT, Raoult D. Épidémiologie de la Fièvre Boutonneuse Méditerranéenne en France. *Med Mal Infect* 1993a;23:485-490.
166. Dupont HT, Raoult D. Maladies Transmises par les Tiques. *Rev Med Int* 1993b;14(5):300-306.
167. Dupont HT, Cornet JP, Raoult D. Identification of *Rickettsiae* from Ticks Collected in the Central African Republic Using the Polymerase Chain Reaction. *Am J Trop Med Hyg* 1994;50(3):373-380.
168. Durand P. Transmission Expérimentale de la Fièvre Boutonneuse par *Rhipicephalus sanguineus*. *C R Acad Sci* 1930;190:1244.
169. Dwyer BW, Graves SR, McDonald MI, Yung AP, Doherty RR, McDonald JK. Spotted Fever in East Gippsland, Victoria: a Previously Unrecognised Focus of *Rickettsial* Infection. *Med J Australia* 1991;154:121-125.
170. Edlinger E. Mediterranean Spotted Fever Outside the Endemic Area. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases* 1985;1:370-372.
171. Eisemann CS, Osterman JV. Proteins of Typhus and Spotted Fever Group *Rickettsiae*. *Infect Immun* 1976;14:155-162.
172. Eremeeva ME, Roux V, Raoult D. Determination of Genome Size and Restriction Pattern Polymorphism of *Rickettsia prowazekii* and *Rickettsia typhi* by Pulsed Field Gel Electrophoresis. *FEMS Microbiol Letters* 1993a;112:105-112.
173. Eremeeva ME, Balayeva NM, Ignatovich VF, Raoult D. Proteinic and Genomic Identification of Spotted Fever Group *Rickettsiae* Isolated in the Former USSR. *J Clin Microbiol* 1993b;31(10):2625-2633.
174. Eremeeva ME, Yu X, Raoult D. Differentiation among Spotted Fever Group *Rickettsiae* Species by Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. *J Clin Microbiol* 1994a;32(3):803-810.

175. Ereemeeva ME, Beati L, Makarova VA, Fetisova NF, Tarasevich IV, Balayeva NM, Raoult D. Astrakhan Fever Rickettsiae: Antigenic and Genotypic Analysis of Isolates Obtained from Human and Rhipicephalus pumilio Ticks. *Am J Trop Med Hyg* 1994b;51(4):33-42.
176. Ereemeeva ME, Balayeva N, Ignatovich V, Raoult D. Genomic Study of Rickettsia akari by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Clin Microbiol* 1995a;33(11):3022-3024.
177. Ereemeeva ME, Balayeva N, Roux V, Ignatovich V, Kotsinjan M, Raoult D. Genomic and Proteinic Characterization of Strain S, a Rickettsia Isolated from Rhipicephalus sanguineus Ticks in Armenia. *J Clin Microbiol* 1995b;33(10):2738-2744.
178. Ereemeeva ME, Balayeva NM, Ignatovich VF, Raoult D. Serologic Response to Rickettsial Antigens in Patients with Astrakhan Fever. *Eur J Epidemiol* 1995c;11:383-387.
179. Espejo E, Alegre MD, Font B, Font A, Segura F, Bella F. Antibodies to Rickettsia conorii in Dogs: Seasonal Differences. *Eur J Epidemiol* 1993;9(3):344-346.
180. Espejo-Arenas E, Font-Creus BF, Bella-Cueto FB, Segura-Porta FS. Climatic Factors in Resurgence of Mediterranean Spotted Fever. *The Lancet* 1986;i:1333-.
181. Espejo-Arenas E, Font-Creus B, Alegre-Segura MD, Segura-Porta F, Bella-Cueto F. Seroepidemiological Survey of Mediterranean Spotted Fever in an Endemic Area (Vallés Occidental, Barcelona, Spain). *Trop Geogr Med* 1990;42:212-216.
182. Fan M-Y, Walker DH, Liu Q-H, Li H, Bai H-C, Zhang J-K, Lenz B, Cai H. Rickettsial and Serological Evidence for Prevalent Spotted Fever Rickettsiosis in Inner Mongolia. *Am J Med Hyg* 1987a;36(3):615-620.
183. Fan M-Y, Walker DH, Yu S-R, Liu Q-H. Epidemiology and Ecology of Rickettsial Diseases in the People's Republic of China. *Rev Infect Dis* 1987b;9(4):823-840.
184. Feng HM, Kirkman C, Walker DH. Radioimmunoprecipitation of (35S)Methionine-Radiolabeled Proteins of Rickettsia conorii and Rickettsia rickettsii. *J Infect Diseases* 1986;154(4):717-721.
185. Feng HM, Walker DH, Wang JG. Analysis of T-Cell-Dependent and -Independent Antigens of Rickettsia conorii with Monoclonal Antibodies. *Infect Immun* 1987;55(1):7-15.
186. Feng WC, Murray ES, Burgdorfer W, Spielman JM, Rosenberg G, Dang K, Smith C, Spickert C, Waner JL. Spotted Fever Group Rickettsiae in Dermacentor variabilis from Cape Cod, Massachusetts. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:691-694.
187. Feng WC, Waner JL. Serological Cross-Reaction and Cross-Protection in Guinea Pigs Infected with Rickettsia rickettsii and Rickettsia montana. *Infect Immun* 1980;28(2):627-629.
188. Filipe AR, Casals J. Isolation of Dhoru Virus from Hyalomma marginatum Ticks in Portugal. *Intervirology* 1979;11:124-127.
189. Filipe AR. Vírus Transmitidos por Ixodoidea. Alguns Aspectos Ecológicos e Relações Vírus-Vector-Vertebrado. *Monografia* 1980;1-51.
190. Filipe AR, Carliser CH. Isolation of Thogoto Virus from Ticks in Portugal. *Acta Virol* 1984;28:152-155.
191. Filipe AR, Rehacek J, Bacellar F, Nuncio MS. Ehrlichia canis: Um "Novo" Agente de Doença Presente em Portugal, com Importancia em Saúde Pública. *Revista Portuguesa de Doenças Infecciosas* 1990;13(4):235-238.
192. Filipe AR, Rehacek J, Bacellar F, Nuncio MS. Microbiologia e Parasitologia da Hemolinfa dos Ixodídeos do Distrito de Setúbal. *Rev Port Cienc Vet* 1992;87(501):46-52.
193. Filipe AR, Alves MJ, Karabatsos N, Matos APA, Nuncio MS, Bacellar F. Palma Virus, a New Bunyaviridae Isolated from Ticks in Portugal. *Intervirology* 1994;37:348-351.
194. Fonseca F, Pinto MR, Amaro C, Pinto M. Tifo Exantemático. I. Tifo Histórico ou Epidémico. *Med Contemp* 1942;15(11):167-211.
195. Fonseca F, Pinto MR. Tifo Exantemático. II. Tifo Endémico ou Murino. *Med Contemp* 1942;15(13):201-207.

196. Fonseca F, Pinto MR. Valor das Epizootias nas Epidemias das Rickettsioses. *Gaz Med Port* 1951;4(3):536-540.
197. Fox GE, Stackebrandt E, Hespell RB, Gibson J, Maniloff J, Dyer TA, Wolfe RS, Balch WE, Tanner RS, Magrum LJ, Zablen LB, Balkemore R, Gupta R, Bonen L, Lewis BJ, Stahl DA, Luehrsen KR, Chen KN, Woese CR. The Phylogeny of Prokaryotes. *Science* 1980;209:457-463.
198. Freeman BA, Pearson GR, Hines WD. Host-Parasite Relationships in Brucellosis. III. Behavior of Avirulent *Brucella* in Tissue Culture Monocytes. *J Infect Dis* 1964;114:441-449.
199. Friedhoff KT. Interaction between Parasite and Tick Vector. *Int J Parasitol* 1990;20(4):525-535.
200. Fuerst PA, Poetter KF. DNA Sequence Differentiation in North American Spotted Fever Group Species of *Rickettsia*. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases* 1991;1:162-166.
201. Fuerst PA, Stothard DR. Relative Phylogenetic Information in the 16S and 23S rRNA and 17-kD Antigen Genes for Evolutionary Studies of *Rickettsia*. Eleventh Sesqui-Annual Meeting of the ASRRD 1994.
202. Fuller HS. Studies of *Rickettsialpox*. III. Life Cycle of the Mite Vector, *Allodermanyssus sanguineus*. *Am J Hyg* 1954;59:236-239.
203. Gac P, Arquie E. Considerations Epidemiologiques sur la Fievre Exanthematique Boutonneuse Mediterraneenne Deuxieme note. *Bul Soc Pathologie Exotique* 1966;59(6):949-953.
204. 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):5099-5106.
205. Gage KL, Schrupf ME, Karstens RH, Burgdorfer W, Hinnebusch J, Schwan R. Identification of *Rickettsial* Serotypes in Naturally Infected Ticks by PCR. Proceeding and Abstracts. First Intern Conf Tick-Borne Pathogens at the Host-Vector Interface 1992;Saint Paul:299.
206. Gaon JA, Murray ES. The Natural History of Recrudescing Typhus (Brill-Zinsser Disease) in Bosnia. *Bull Org Mond Santé* 1966;35:133-141.
207. Gaspar M, Salgueiro C, Alpendre A, Rendeiro C. Falsa Reputação de Benignidade. II Simpósio Ibérico Sobre Ixodoidea e Enfermidades Transmitidas Évora 1993;C1.
208. Gear J. Complications in Tick-Bite Fever. A Survey of Fifty Cases. *S Afr Med J* 1939;13:35-36.
209. Gear JHS. The Rickettsial Diseases of Southern Africa. *S Afr J Clin Sci* 1954;5:158-174.
210. Gear JHS. Other Spotted Fever Group Rickettsioses: Clinical Signs, Symptoms, and Pathophysiology. *Biology of Rickettsial Diseases* 1988;1:101-114.
211. Gilmore, Jr RD, Hackstadt T. DNA Polymorphism in the Conserved 190kDa Antigen Gene Repeat Region among Spotted Fever Group Rickettsiae. *Bioch Bioph Acta* 1991;1097:77-80.
212. Gilot B, Quenin P, Joubert L. Recherche de Foyers Naturels de Fièvre Boutonneuse dans la Basse Vallée du Rhône. *Bull Soc Science Vet Med Comparee* 1981;23:447-458.
213. Gilot B, Marjoret M. Contribution à l'Étude du Parasitisme Humain par les Tiques (Ixodidae et Argasidae), plus Particulièrement dans le Sud-Est de la France. *Méd Malad Infect* 1982;12(6):340-351.
214. Gilot B, Laforge ML, Pichot J, Raoult D. Relationships Between the *Rhipicephalus sanguineus* Complex Ecology and Mediterranean Spotted Fever Epidemiology in France. *Eur J Epidemiol* 1990;6(4):357-362.
215. Gilot B, Laforge ML, Cabassu JP, Romani M. Elements pour la Cartographie Ecologique des Populations de *Rhipicephalus* du Group Sanguineus (Acariens, Ixodoidea) dans l'Agglomération Marseillaise, en Relation avec les Diverses Formes d'Urbanisation. *Acarologia* 1992;33(1):17-33.
216. Gimenez DF. Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. *Stain Technol* 1964;39:135-140.
217. Goddard J, Norment BR. Spotted Fever Group Rickettsiae in the Lone Star Tick *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1986;23(5):465-472.

218. Goddard J. Focus of Human Parasitism by the Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1989;26(6):628-629.
219. Goldwasser RA, Steiman Y, Klingberg W, Swartz TA, Klingberg MA. The Isolation of Strains of Rickettsiae of the Spotted Fever Group in Israel and their Differentiation from other Members of the Group by Immunofluorescence Methods. *Scand J Infect Dis* 1974;6:53-62.
220. Golinevitch H. A Propos de la Différenciation de Quelques Rickettsies du Groupe de la Fièvre Pourprée à • Tiques. *Arch Inst Pasteur Tunis* 1960;37:13-22.
221. Gordon JC, Gordon SW, Peterson E, Philips RN. Epidemiology of Rocky Mountain Spotted Fever in Ohio, 1981: Serologic Evaluation of Canines and Rickettsial Isolation from Ticks Associated with Human Case Exposure Sites. *Am J Trop Med Hyg* 1984;33(5):1026-1031.
222. Gould DJ, Miesse ML. Recovery of a Rickettsia of the Spotted Fever Group from *Microtus pennsylvanicus* from Virginia (20950). *Proceedings Soc Exp Biol Med* 1954;85:558-560.
223. Graumann CC, McDonald GA. The Reactivation Phenomenon of *Rickettsia rickettsii* Involves the Expression of Virulence Factor Proteins. *Ann Meeting Am Soc Rickettsiology and Rickettsial Diseases* 1994.
224. Graves SR, Dwyer BW, McColl D, McDade JE. Flinders Island Spotted Fever: a Newly Recognised Endemic Focus of Tick Typhus in Bass Strait Part 2. Serological Investigations. *Med J Australia* 1991;154:99-104.
225. Graves SR, Stewart L, Stenos J, Stewart RS, Schmidt E, Hudson S, Banks J, Huang Z, Dwyer B. Spotted Fever Group Rickettsial Infection in South-Eastern Australia: Isolation of Rickettsiae. *Comp Immun Microbiol Dis* 1993;16(3):223-233.
226. Gross EM, Arbeli Y, Bearman JE, Yagupsky P, Cohar K, Torok V, Goldwasser RA. Spotted Fever and Murine typhus in the Negev Desert Region of Israel, 1981. *Bull WHO* 1984;62(2):301-306.
227. Gutman A, Schreiber H, Taragan R. An Outbreak of Tick Typhus in the Coastal Plain of Israel. 13 Cases from Sharon Area. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1973;67(1):112-121.
228. Hackstadt T, Messer R, Cieplak W, Peacock MG. Evidence for Proteolytic Cleavage of the 120-Kilodalton Outer Membrane Protein of Rickettsiae: Identification of an Avirulent Mutant Deficient in Processing. *Infect Immun* 1992;60(1):159-165.
229. Hanawa T, Yamamoto T, Kamiya S. *Listeria monocytogenes* Can Grow in Macrophages without the Aid of Proteins Induced by Environmental Stresses. *Infect Immun* 1995;63(12):4595-4599.
230. Harden VA. Koch's Postulates and the Etiology of Rickettsial Diseases. *J Hist Med Allied Sciences* 1987;42:277-295.
231. Harden VA. *Rocky Mountain Spotted Fever*. The Johns Hopkins University Press 1990.
232. Hase T. Developmental Sequence and Surface Membrane Assembly of Rickettsiae. *Ann Rev Microbiol* 1985;39:69-88.
233. Hayes JE, Hahn FE, Cohn ZA, Jackson EB, Smadel JE. Metabolic Studies of Rickettsiae. IV. Terminal Respiratory Enzymes in *Rickettsia mooseri*. *Biochim Biophys Acta* 1957;26:570-576.
234. Hayes SF, Burgdorfer W, Aeschlimann A. Sexual Transmission of Spotted Fever Group Rickettsiae by Infected Male Ticks: Detection of Rickettsiae in Immature Spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infect Immun* 1980;27(2):638-642.
235. Hayes SF, Burgdorfer W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* Ticks: an Ultrastructural Analysis. *Infect Immun* 1982;37(2):779-785.
236. Hechemy KE, Raoult D, Eisemann C, Han Y, Fox JA. Detection of Antibodies to *Rickettsia conorii* with a Latex Agglutination Test in Patients with Mediterranean Spotted Fever. *J Infect Dis* 1986;153:132-135.
237. Heinzen RA, Hayes SF, Peacock MG, Hackstadt T. Directional Actin Polymerization Associated with Spotted Fever Group Rickettsia Infection of Vero Cells. *Infect Immun* 1993;61(5):1926-1935.
238. Heisch RB, Grainger WE, Harvey AEC, Lister G. Feral Aspects of Rickettsial Infections in Kenya. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1962;56:272-282.

239. Helmick CG, Winkler WG. Epidemiology of Rocky Mountain Spotted Fever 1975-1979. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases* 1980.
240. Henke SE, Pence DB, Demarais S, Johnson JR. Serologic Survey of Selected Zoonotic Agents in Black-Tailed Jack Rabbits from Western Texas. *J Wildlife Dis* 1990;26:107-111.
241. Herrero C, Pelaz C, Alvar J, Molina R, Vázquez J, Anda P, Casal J, Martin-Bourgon C. Evidence of the Presence of Spotted Fever Group Rickettsiae in Dogs and Dogs Ticks of the Central Provinces in Spain. *Eur J Epidemiol* 1992;8(4):575-579.
242. Herrero-Herrero JI, Ruiz-Beltrán R, Martín-Sánchez AM, Garcia EJ. Mediterranean Spotted Fever in Salamanca, Spain. Epidemiological Study in Patients and Serosurvey in Animals and Healthy Human Population. *Acta Trop* 1989;46:335-350.
243. Herrero-Herrero JI, Ruiz-Beltrán R, Walker DH. Antigens of Rickettsia conorii Recognized by Seropositive Healthy People from Salamanca (Central-West Spain). *Eur J Epidemiol* 1993;9(1):59-63.
244. Herrero-Herrero JI, Ruiz R, Walker DH. La Técnica de Western Immunoblotting en Situaciones Atípicas de Infección por Rickettsia conorii. Presentación de 2 Casos. *Enf Infec y Microbiol Clin* 1993;11(3):139-142.
245. Higgins JA, Radulovic S, Schriefer ME, Azad AF. Rickettsia felis: a New Species of Pathogenic Rickettsia Isolated from Cat Fleas. *J Clin Microbiol* 1996;34(3):671-674.
246. Hoogstraal H. Ticks in Relation to Human Diseases Caused by Rickettsia Species. *An Rev Entomol* 1967;12:377-420.
247. Hoogstraal H. Changing Patterns of Tickborne Disease in Modern Society. *Ann Rev Entomol* 1981;26:75-99.
248. Huang Z, Graves S, Stewart L, Banks J, Dwyer B. Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Detecting Antibody to Rickettsia australis in Sera of Various Animal Species. *Comp Immun Microbiol Infect Diseases* 1990;13(3):119-125.
249. Huebner RJ, Stamps P, Armstrong C. Rickettsialpox - A newly Recognized Rickettsial Disease I. Isolation of the Etiological Agent. *Public Health Reports* 1946a;61(45):1605-1614.
250. Huebner RJ, Jellison WL, Pomerantz C. Rickettsialpox - A Newly Recognised Rickettsial Disease. *Public Health Reports* 1946b;61(47):1677-1682.
251. Imam IZE, Alfy L. Evidence of Typhus Infection in Domestic Animals in Egypt. *Bull WHO* 1966;35:123-126.
252. Jackson EB, Danauskas JX, Coale MC, Smadel JE. Recovery of Rickettsia Akari from the Korean Vole Microtus fortis pelliceus. *Am J Hyg* 1957;66:301-308.
253. Jarboe DL, Eisemann CS, Jerrells TR. Production and Characterization of Cloned T-Cell Hybridomas that are responsive to Rickettsia conorii Antigens. *Infect Immun* 1986;52(1):326-330.
254. Jorge R. Tifo Exantemático ou Tabardilho. Conselho Superior de Higiene 1918;Relatórios:1-22.
255. Jorge R. Le Typhus Exanthématique à Porto. 1917-1919. Comitè International D'Hygiène Publique 1919;Communication:1-14.
256. Jorge R. La Fièvre Exanthématique (Fièvre Escharo-Nodulaire) et son Apparition au Portugal. *Lisboa Médica* 1930a;7:433-454.
257. Jorge R. A Propos de la Denomination de la Fièvre Exanthématique (Fièvre Escarro-Nodulaire). *Presse Med* 1930b;1:1549-.
258. Jorge R. Discursos do Prof. Ricardo Jorge nos Congressos de Medicina. *Lisboa Médica* 1932;12:1151-1154.
259. Jorge R. La Famille Typho-Exanthématique. *Office Int d'Hyg Publique* 1933;XXV:1-16.
260. Júlio SM. Estudo Preliminar das Populações de Ixodídeos (Ixodidae Murray, 1877) da Região da Marateca (Sul do Rio Tejo). *Relat Estágio Faculdade Ciências Lisboa* 1991;1:1-149.

261. Kass EM, Szaniawski WK, Levy H, Leach J, Srinivasan K, Rives C. Rickettsialpox in a New York City Hospital, 1980 to 1989. *N Engl J Med* 1994;331:1612-1617.
262. Katz M, Despommier DD, Gwadz RW. V. The Arthropods. 39. The Arachnids. *Parasitic Diseases* 1994;2a Ed.:241-249.
263. Kaufman WR. Tick-Host Interaction: A Synthesis of Current Concepts. *Parasitol Today* 1989;5(2):47-56.
264. Keenan KP, Buhles, Jr WC, Huxsoll DL, Williams RG, Hildebrandt PK, Campbell JM, Stephenson EH. Pathogenesis of Infection with *Rickettsia rickettsii* in the Dog: A Disease Model for Rocky Mountain Spotted Fever. *J Infect Dis* 1977;135(6):911-917.
265. Kelly DJ, Osterman JV, Stephenson EH. Rocky Mountain Spotted Fever in Areas of High and Low Prevalence: Survey for Canine Antibodies to Spotted Fever Rickettsiae. *Am J Vet Res* 1982;43(8):1429-1431.
266. Kelly PJ, Mason PR. Serological Typing of Spotted Fever Group Rickettsia Isolates from Zimbabwe. *J Clin Microbiol* 1990;28(10):2302-2304.
267. Kelly PJ, Mason PR. Tick-Bite Fever in Zimbabwe Survey of Antibodies to *Rickettsia conorii* in Man and Dogs, and of Rickettsia-Like Organisms in Dog Ticks. *South Africa Med J* 1991a;80:233-236.
268. Kelly PJ, Mason PR. Transmission of a Spotted Fever Group Rickettsia by *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1991b;28(5):598-600.
269. Kelly PJ, Vitale G, Librizzi R, Mocciano C, Gambino G, Reina G, Mason PR. Reactivity of *Rickettsia conorii* Monoclonal Antibodies with Four Zimbabwean Spotted Fever Group Isolates. *South African J Science* 1991c;87:539-540.
270. Kelly PJ, Matthewman LA, Mason PR, Courtney S, Katsande C, Rukwaka J. Experimental Infection of Dogs with a Zimbabwean Strain of *Rickettsia conorii*. *J Trop Med Hyg* 1992;95:322-326.
271. Kelly PJ, Beati L, Matthewman LA, Mason PR, Dasch GA, Raoult D. A New Pathogenic Spotted Fever Group Rickettsia from Africa. *J Trop Med Hyg* 1994;97:129-137.
272. Kelly PJ, Beati L, Mason PR, Matthewman LA, Roux V, Raoult D. *Rickettsia africae* sp.nov., the Etiological Agent of African Tick Bite Fever. *Int J Syst Bacteriol* 1996;46(2):611-614.
273. Kemper CA, Spivack AP, Deresinski SC. Atypical Papulovesicular Rash Due to Infection with *Rickettsia conorii*. *Clin Infect Dis* 1992;15:591-594.
274. Keysary A, Torton DN, Gross EM, Torton M. Prevalence of Antibodies to *Rickettsia conorii* in Dogs in Israel and its Relation to Outbreaks in Man. *Israel J Vet Med* 1988;44(2):103-107.
275. Kirkland KB, Wilkinson WE, Sexton DJ. Therapeutic Delay and Mortality in Cases of Rocky Mountain Spotted Fever. *Clin Infect Diseases* 1995;20:1118-1121.
276. Krieg NR, Holt JG. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Williams & Wilkins 1984;1.
277. Krinsky WL. Correspondence. Does Epizootic Lymphocytic Choriomeningitis Prime the Pump for Epidemic Rickettsialpox? *Rev Infect Diseases* 1983;5(6):1118-1119.
278. Lackman DB. A Review of Information on Rickettsialpox in the United States. *Clin Pediatr* 1963;2:296-301.
279. Lackman DB, Bell EJ, Stoenner HG, Pickens EG. The Rocky Mountain Spotted Fever Group of Rickettsias. *Health Lab Serv* 1965;2(3):135-141.
280. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-685.
281. Lane RS, Philip RN, Casper EA. Ecology of Tick-Borne Agents in California. II. Further Observations on Rickettsiae. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases* 1981;W.Burgdorfer and R.L.Anacker (ed.), Academic Press, NY.
282. Lane RS, Stubbs HA. Host-Seeking Behavior of Adult *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) as Determined by Flaggng Vegetation. *J Med Entomol* 1990;27(3):282-287.

283. Laynez F, Díez F, Yélamos F, Collado A. Fiebre Botonosa Mediterránea Asociada a Coagulación Intravascular Diseminada. A Propósito de 3 Casos. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1994;12:365-366.
284. Leitão S. Carraças ou Carrapatos. Sua Destruição. *Cartilhas do Lavrador Porto* 1950;97:1-69.
285. Lemaire G. Sur la Dénomination de "Fièvre Exanthématique". *Bull Soc Path Exot* 1932;25:934-935.
286. Lemierre A. Eruptive Mediterranean Fever. *The Lancet* 1934;226(i):441-443.
287. Li H, Lenz B, Walker DH. Protective Monoclonal Antibodies Recognize Heat-Labile Epitopes on Surface Proteins of Spotted Fever Group Rickettsiae. *Infect Immun* 1988;56(10):2587-2593.
288. Li H, Walker DH. Biological Characterization of Major Polypeptides on the Surface of Spotted Fever Group Rickettsiae. *Ann New York Acad Sciences* 1990;1:389-394.
289. Linnemann CC, Schaeffer AE, Burgdorfer W, Hutchinson L, Philip RN. Rocky Mountain Spotted Fever in Clermont County, Ohio Distribution of Population and Infected Ticks in an Endemic Area. *J Epidemiol* 1980;11(1):31-36.
290. Liu Q-H, Chen G-Y, Jin Y, Te M, Niu L-C, Dong S-P, Walker DH. Evidence for a High Prevalence of Spotted Fever Group Rickettsial Infections in Diverse Ecologic Zones of Inner Mongolia. *Epidemiol Infect* 1995;115:177-183.
291. Logan NA. *Bacterial Systematics*. Blackwell Scientific Publications 1994;1:1-263.
292. Loving SM, Smith AB, DiSalvo AF, Burgdorfer W. Distribution and Prevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks from South Carolina, With an Epidemiological Survey of Persons Bitten by Infected Ticks. *Am J Trop Hyg* 1978;27(6):1255-1260.
293. Magnarelli LA, Anderson JF, Philip RN, Burgdorfer W, Casper EA. Endemicity of Spotted Fever Group Rickettsiae in Connecticut. *Am J Trop Hyg* 1981;30(3):715-721.
294. Magnarelli LA, Anderson JF, Philip RN, Burgdorfer W. Antibodies to Spotted Fever-Group Rickettsiae in Dogs and Prevalence of Infected Ticks in Southern Connecticut. *Am J Vet Res* 1982;43(4):656-659.
295. Mallavia LP. Genetics of Rickettsiae. *Eur J Epidemiol* 1991;7(3):213-221.
296. Manor E, Ighbarieh J, Sarov B, Kassis I, Regnery R. Human and Tick Spotted Fever Group Rickettsia Isolates from Israel: a Genotypic Analysis. *J Clin Microbiol* 1992;30(10):2653-2656.
297. Mansueto S, Vitale G, Tringali G, Di Leo R, Barba G, Staiti A, Morreale S, Occhino C, Di Rosa S. Studi Sero-Immunologici nella Febbre Bottonosa. *Giorn Mal Inf Parass* 1983;35:723-730.
298. Mansueto S, Vitale G, Miceli MD, Tringali G, Quartararo P, Picone DM, Occhino C. A Sero-Epidemiological Survey of Asymptomatic Cases of Boutonneuse Fever in Western Sicily. *Transact Royal Soc Trop Med and Hyg* 1984;78:16-18.
299. Mansueto S, Vitale G, Bentivegna M, Tringali G, Leo RD. Persistence of Antibodies to Rickettsia conorii After an Acute Attack of Boutonneuse Fever. *J Infect Diseases* 1985;151(2):377-.
300. Marchette NJ. Rickettsioses (Tick Typhus, Q-Fever, Urban Typhus) in Malaya. *J Med Entomol* 1966;2(4):339-371.
301. Marchette NJ. Evolution of the Tick-Rickettsia Relationship. *Ecological Relationships and Evolution of the Rickettsiae* 1982;1:29-47.
302. Marks GL, Winkler HH, Wood DO. Isolation and Characterization of the Gene Coding for the Major Sigma Factor of Rickettsia prowazekii DNA-dependent RNA Polymerase. *Gene* 1992;121:155-160.
303. Marrero M, Raoult D. Centrifugation-shell Vial Technique for Rapid Detection of Mediterranean Spotted Fever Rickettsia in Blood Culture. *Am J Trop Med Hyg* 1989;40(2):197-199.
304. Martins LL. Análise Estatístico-Epidemiológica da Incidência da Febre Escaro-Nodular no Distrito de Évora de 1987 a 1992. II Simpósio Ibérico Sobre Ixodoidea e Enfermidades Transmitidas Évora 1993;C2.

305. McDade JE, Shepard CS, Redus MA, Newhouse VF, Smith JD. Evidence of *Rickettsia prowazekii* Infections in the United States. *Am J Trop Med Hyg* 1980;29:277-284.
306. McDade JE, Newhouse VF. Natural History of *Rickettsia rickettsii*. *Ann Rev Microbiol* 1986;40:287-309.
307. McDade JE, Black CM, Roumillat LF, Redus MA, Spruill CL. Addition of Monoclonal Antibodies Specific for *Rickettsia akari* to the Rickettsial Diagnostic Panel. *J Clin Microbiol* 1988;26(10):2221-2223.
308. McDonald J, MacLean JD, McDade JE. Imported Rickettsial Disease: Clinical and Epidemiologic Features. *Am J Med* 1988;85:799-805.
309. McKiel JA, Bell EJ, Lackman DB. *Rickettsia canada*: a new Member of the Typhus Group of Rickettsiae Isolated from *Haemaphysalis leporispalustris* Ticks in Canada. *Can J Microbiol* 1967;13:503-510.
310. McNeill WH. *Plagues and Peoples*. Penguin Books England 1979;l:1-330.
311. Melles HHB, Colombo S, Silva MV. Febre Maculosa: Isolamento de *Rickettsia* em Amostra de Biópsia de Pele. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1992;34(1):37-41.
312. Meskini M, Beati L, Benslimane A, Raoult D. Seroepidemiology of Rickettsial Infections in Morocco. *Eur J Epidemiol* 1995;11:655-660.
313. Mittermayer T, Brezina R, Urvolgyi J. First Report of an Infection with *Rickettsia slovaca*. *Folia Parasitol* 1980;27:373-376.
314. Molins A, Miquel F, Montalbán J, Codina A. Meningoencefalitis Subaguda por *Rickettsia conorii*. *Neurologia* 1988;3:125-126.
315. Morais JD, Dawson JE, Greene C, Filipe AR, Galhardas LC, Bacellar F. First European Case of Ehrlichiosis. *The Lancet* 1991;338:633-634.
316. Morita C, Tsuboi Y, Lida A, Mohri S, Handa S, Fukui M. Spotted Fever Group *Rickettsia* in Dogs in Japan. *J Med Sci Biol* 1989;42:143-147.
317. Motta LC. Provas Biológicas Específicas mais Indicadas e mais Práticas para o Diagnóstico das Principais Doenças Humanas Causadas por Vírus e Rickettsias. *O Médico* 1953;4(100):654-655.
318. Mumcuoglu KY, Frish K, Galun R, Sarov B, Manor E, Gross E. Ecological and Epidemiological Studies on Mediterranean Spotted Fever in the Negev Desert of Israel. *Virginia J Sci* 1990;41(3):159-160.
319. Myers WF, Wisseman, Jr CL, Fiset P, Oaks EV, Smith JF. Taxonomic Relationship of Vole Agent to *Rochalimaea quintana*. *Infect Immun* 1979;26:976-983.
320. Myers WF, Weissman, Jr CL. Genetic Relatedness Among the Typhus Group of Rickettsiae. *Int J System Bacteriol* 1980;30(1):143-150.
321. Myers WF, Wisseman, Jr CL. Genetic Relationships Within the Spotted Fever Group Biotype of the Genus *Rickettsia*. Meeting of the American Society for Rickettsiology and Rickettsial Diseases 1982;Atlanta.
322. Neves C. Sobre a Febre Escaro-Nodular. *Med Contemp* 1932;50(39):295-296.
323. Nice CS. The Dissemination of Human Infectious Disease by Birds. *Rev Med Microbiol* 1994;5(3):191-198.
324. Nina C. Terramicina no Tratamento da Febre Escaro-Nodular. *Bol Clin Hosp Civis Lisboa* 1951;15:720-729.
325. Nobre G. A Cultura de *Rickettsia conorii* e a sua Utilização em Provas de Imunofluorescência. *Arq Instit Bacteriol Camara Pestana* 1971;XI(2):101-216.
326. Nogueira PJ, Dias CM, Falcão JM. Como Abordar Metodologicamente Coleções de Dados com Distribuições Muito Assimétricas. *Saúde em Números – Direcção Geral da Saúde* 1996;11(1):1-4.
327. Norment BR, Burgdorfer W. Susceptibility and Reservoir Potential of the Dog to Spotted Fever-group Rickettsiae. *Am J Vet Res* 1984;45(9):1706-1710.



328. Norment BR, Burgdorfer W. Susceptibility of small Mammals to Nonvirulent Spotted Fever Group Rickettsiae. *J Med Entomol* 1985;22(2):200-203.
329. Nuncio MS, Péter O, Alves MJ, Bacellar F, Filipe AR. Isolamento e Caracterização de Borrélias de *Ixodes ricinus* L. em Portugal. *Rev Port Doenç Infec* 1993;16(3):175-179.
330. Nuncio MS, Santos e Silva MM, Filipe AR. Micromamíferos como Eventuais Reservatórios de Borrélias: Serologia e Níveis de Infestação por Ixodídeos. 2a Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Parasitologia - Porto 1994.
331. Oaks, Jr SC, Osterman JV. The Influence of Temperature and pH on the Growth of *Rickettsia conorii* in Irradiated Mammalian Cells. *Acta Virol* 1979;23:67-72.
332. Ojcius DM, Thibon M, Mounier C, Dautry-Varsant A. pH and Calcium Dependence of Hemolysis Due to *Rickettsia prowazekii*: Comparison with Phospholipase Activity. *Infect Immun* 1995;63(8):3069-3072.
333. Okada T, Tange Y, Kobayashi Y. Causative Agent of Spotted Fever Group Rickettsiosis in Japan. *Infect Immun* 1990;58(4):887-892.
334. Oliver, Jr JH. Induction of oogenesis and oviposition in ticks. *Morphol Physiol Behavioral Biol Ticks* 1984;1:233-279.
335. Oliver, Jr JH. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). *Ann Rev Ecol Syst* 1989;20:397-430.
336. Olmer D. Sur une Infection Épidémique avec Exanthème de Nature Indéterminée. *Marseille Médicale* 1925;5 Aout:1921.
337. Olmer D, Olmer J. Epidémie des Rickettsioses sur le Littoral Méditerranéen La Fièvre Boutonneuse. *Rev Pathol Gén Comparée* 1956;1:80-92.
338. Olmer M. La Fièvre de Marseille - Fièvre Exanthématique Nodulaire. *La Presse Medicale* 1930;87:1459-.
339. Olsen GJ, Woese CR, Overbeek R. The Winds of (Evolutionary) Change: Breathing New Life into Microbiology. *J Bacteriol* 1994;176(1):1-6.
340. Ormsbee RA. Rickettsiae (As Organisms). *Annu Rev Microbiol* 1969;23:275-292.
341. Ormsbee RA, Peacock MG. Rickettsial Plaques Assay and Cloning Procedures. *Tissue Culture Assoc Manual* 1976;2:475-478.
342. Osterman JV, Eisemann CS. Surface Proteins of Typhus and Spotted Fever Group Rickettsiae. *Infect Immun* 1978;21(3):866-873.
343. Paiva JED. Rickettsioses: Esboço Histórico, Patogenia e Clínica. II Simpósio Ibérico Sobre Ixodoidea e Enfermidades Transmitidas. 1993;C3.
344. Pang H, Winkler HH. Copy Number of the 16S rRNA Gene in *Rickettsia prowazekii*. *J Bacteriol* 1993;175(12):3893-3896.
345. Pang H, Winkler HH. The Concentrations of Stable RNA and Ribosomes in *Rickettsia prowazekii*. *Molecul Microbiol* 1994a;12(1):115-120.
346. Pang H, Winkler HH. Analysis of the Peptidoglycan of *Rickettsia prowazekii*. *J Bacteriol* 1994b;176(3):923-926.
347. Papadopoulos B, Nuncio MS, Filipe AR. The Occurrence of *Rhipicephalus turanicus* Pomerantzev, Matikashvily & Lototsky, 1940, A Species of *Rhipicephalus sanguineus* Group, in Portugal. *Acarologia* 1992;15(3):173-176.
348. Payet M. As Rickettsioses. *J Med* 1970;71:426-430.
349. Peacock MG, Ormsbee RA, Johnson KM. Rickettsioses of Central America. *Am J Trop Med Hyg* 1971;20(6):941-949.
350. Pedersen CE, Walters VD. Comparative Electrophoresis of Spotted Fever Group Rickettsial Proteins. *Life Sciences* 1977;22:583-588.

351. Penkina GA, Ignatovich VF, Balayeva NM. Interaction of *Rickettsia prowazekii* Strains of Different Virulence with White Rat Macrophages. *Acta virol* 1995;39:205-209.
352. Perna A, Di Rosa S, Intonazzo V, Sferlazzo A, Tringali G, La Rosa G. Epidemiology of Boutonneuse Fever in Western Sicily: Accidental Laboratory Infection with a Rickettsial Agent Isolated from a Tick. *Microbiologica* 1990;13:253-256.
353. Pervikov Y. The Role of the World Health Organization in the Control of Rickettsial Diseases. *Eur J Epidemiol* 1991;7(3):287-290.
354. Péter O, Burgdorfer W, Aeschlimann A. Enquête Épidémiologique dans un Foyer Naturel de Rickettsies à *Ixodes ricinus* du Plateau Suisse. *Ann Parasitol* 1981;56(1):1-8.
355. Péter O, Williams JC, Burgdorfer W. *Rickettsia helvetica*, a New Spotted Fever Group Rickettsiae: Immunochemical Analysis of the Antigens of 5 Spotted Fever Group Rickettsiae. *Rickettsiae and Rickettsial Disease* 1985;J.Kazar (Ed.):99-105.
356. Péter O. Présence D'Anticorps Contre la "Rickettsie suisse" chez les Mammifères Sauvages et Domestiques du Canton de Neuchatel. *Schweiz Arch Tierheikd* 1985;127:461-468.
357. Péter O, Raoult D, Gilot B. Isolation by a Sensitive Centrifugation Cell Culture System of 52 Strains of Spotted Fever Group Rickettsiae from Ticks Collected in France. *J Clin Microbiol* 1990;28(7):1597-1599.
358. Pether JVS, Jones W, Lloyd G, Rutter DA, Barry M. Fatal Murine Typhus from Spain. *The Lancet* 1994;344:897-898.
359. Phibbs PV, Winkler HH. Regulatory Properties of Citrate Synthase from *Rickettsia prowazekii*. *J Bacteriol* 1982;149(2):718-725.
360. Philip CB, Hughes LE, Rao KNA, Kalra SL. Studies on Indian Tick Typhus and its Relation to other Human Typhus-like Rickettsiosis. 5th International Congress of Microbiology Rio de Janeiro 1950;Brazil:571.
361. Philip CB. Tick Transmission of Indian Tick Typhus and Some Related Rickettsioses. *Exp Parasitol* 1952;1:129-142.
362. Philip CB. Comments on the Classification of the Order Rickettsiales. *Canadian J Microbiol* 1956;2:261-270.
363. Philip CB. Order I. Rickettsiales. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* 1957;1:933-957.
364. Philip CB, Burgdorfer W. Arthropod Vectors as Reservoirs of Microbial Disease Agents. *Ann Rev Entomol* 1961;6:391-412.
365. Philip CB, Hoogstraal H, Reiss-Gutfreund R, Clifford CM. Evidence of Rickettsial Disease Agents in Ticks from Ethiopian Cattle. *Bull WHO* 1966;35:127-131.
366. Philip RN, Casper EA, Ormsbee RA, Peacock MG, Burgdorfer W. Microimmunofluorescence Test for the Serological Study of Rocky Mountain Spotted Fever and Typhus. *J Clin Microbiol* 1976;3(1):51-61.
367. Philip RN, Casper EA, Burgdorfer W, Gerloff RK, Hughes LE, Bell EJ. Serologic Typing of Rickettsiae of the Spotted Fever Group by Microimmunofluorescence. *J Immunol* 1978a;121(5):1961-1968.
368. Philip RN, Casper EA, Burgdorfer W. Current Knowledge of the Distribution of Serotypes of Spotted Fever-Group Rickettsiae in the United States as Determined by Microimmunofluorescence. *VII Int Congr Inf Parasit Dis* 1978b;1:500-510.
369. 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;30:230-238.
370. Philip RN, Lane RS, Casper EA. Serotypes of Tick-Borne Spotted Fever Group Rickettsiae from Western California. *Am J Trop Med Hyg* 1981;30(3):722-727.
371. Philip RN, Casper EA, Anacker RL, Peacock MG, Hayes SF, Lane RS. Identification of an Isolate of *Rickettsia canada* from California. *Am J Trop Med Hyg* 1982;31:1216-1221.
372. Philip RN, Casper EA, Anacker RL, Cory J, Hayes SF, Burgdorfer W, Yunker CE. *Rickettsia bellii* sp. nov.: a Tick-Borne Rickettsia, Widely Distributed in the United States, that is distinct from the Spotted Fever and Typhus Biogroups. *Int J System Bacteriol* 1983;33(1):94-106.

373. Pickens EG, Bell EJ, Lackman DB, Burgdorfer W. Use of Mouse Serum in Identification and Serologic Classification of *Rickettsia akari* and *Rickettsia australis*. *J Immunol* 1965;94(5):883-889.
374. Pijper A, Dau H. Etude Expérimentale Comparée de la Fièvre Boutonneuse et de la Tick-Bite Fever. *Arch Inst Pasteur Tunis* 1936;25:388-401.
375. Pijper A, Crocker CG. Rickettsioses of South Africa. *S Afr Med J* 1938;12:613-630.
376. Pinto MR. Tifo Murino. *Trab. Lab. Bacteriol. Ins. Port. Oncol. Ins. Bacteriol. Camara Pestana* 1945.
377. Pinto MR. O Diagnóstico Laboratorial das Rickettsioses. *An Ins Med Trop* 1951;8(3):401-418.
378. Pièri A, Brugeas C. Un Nouveau Cas d'Exanthème Infectieux Épidémique de Nature Méditerranéenne. *Marseille Médicale* 1925;5 Novembre.
379. Plotz H, Reagan RL, Wertman K. Differentiation Between Fiebre Boutonneuse and Rocky Mountain Spotted Fever by Means of Complement Fixation. *Proc Soc Exp Biol Med* 1944;55:173-176.
380. Plotz H, Smadel J, Bennett B, Reagen R, Snyder M. North Queensland Tick Typhus. Studies of the Aetiological Agent and its Relation to other Rickettsial Diseases. *Med J Aust* 1946;2:263-268.
381. Popov VL, Ignatovich VF. Electron Microscopy of Surface Structures of *Rickettsia prowazekii* Stained with Ruthenium Red. *Acta Virol* 1976;20:424-428.
382. Porto A, Corte-Real R, Pereira AS, Couto MA, Couto F, Marta E. Alternativa Terapeutica na Febre Escaro-Nodular. *Rev Port Doenças Infecciosas* 1977;1(1):21-24.
383. Prates MM. Febre de Carraças Não Recorrente Endêmica em Lourenço Marques. 1.º Congr Med Trop Luanda 1923;l:329-341.
384. Pretzman C, Daugherty N, Poetter K, Ralph D. The Distribution and Dynamics of *Rickettsia* in the Tick Population of Ohio. *Ann N Y Acad Sci* 1990;590:227-236.
385. Price WH, Johnson JW, Emerson H, Preston CE. Rickettsial-Interference Phenomenon: A New Protective Mechanism. *Science* 1954;120:457-459.
386. Price WH. The Epidemiology of Rocky Mountain Spotted Fever. II. Studies of the Biological Survival Mechanism of *Rickettsia Rickettsii*. *Am J Hyg* 1954;60:292-319.
387. Proença RM, Vieira JM, Dias AJ. Febre Escaro-Nodular. A Propósito de um Inquérito Epidemiológico e Clínico. *O Médico* 1974;71(1179):7-12.
388. Punda-Polic V, Leko-Grbic J, Radulovic S. Prevalence of Antibodies to *Rickettsiae* in the North-Western Part of Bosnia and Herzegovina. *Eur J Epidemiol* 1995a;11:697-699.
389. Punda-Polic V, Bradaric N, Klismanic-Nuber Z, Mrljak V, Giljanovic M. Antibodies to Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Dogs in Croatia. *Eur J Epidemiol* 1995b;11:389-392.
390. Radulovic S, Walker DH, Weiss K, Dzelalija B, Morovic M. Prevalence of Antibodies to Spotted Fever Group *Rickettsiae* along the Eastern Coast of the Adriatic Sea. *J Clin Microbiol* 1993;31(8):2225-2227.
391. Ralph D, Pretzman D, Daugherty N, Poetter K. Genetic Relationships Among the Members of the Family *Rickettsiaceae* as Shown by DNA Restriction Fragment Polymorphism Analysis. *Ann N Y Acad Sci* 1990;590:541-552.
392. Ramm LE, Winkler HH. Identification of Cholesterol in the Receptor Site for *Rickettsiae* on Sheep Erythrocyte Membranes. *Inf Immun* 1976;13(1):120-126.
393. Raoult D, Gallais H, Ottomani A, Resh JP, Tichadou D, De Micco P, Casanova P. La Forme Maligne de la Fièvre Boutonneuse Méditerranéenne. Six Observations. *Presse Med* 1983;12:2375-2378.
394. Raoult D, Rousseau S, Toga B, Tamalet C, Gallais H, Micco P, Casanova P. Diagnostic Serologique de la Fiebre Boutonneuse Mediterraneenne. *Path Biol* 1984;32:791-794.
395. Raoult D, Toga B, Dunan S, Davoust B, Quilici M. Mediterranean Spotted Fever in the South of France; Serosurvey of Dogs. *Trop Geogr Med* 1985;l:258-260.

396. Raoult D, Toga B, Chaudet H, Chiche-Portiche C. Rickettsial Antibody in Southern France: Antibodies to *Rickettsia conorii* and *Coxiella burnetii* Among Urban, Suburban and Semi-Rural Blood Donors. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1987;81:80-81.
397. Raoult D, Dasch GA. Line Blot and Western Blot Immunoassays for Diagnosis of Mediterranean Spotted Fever. *J Clin Microbiol* 1989;27(9):2073-2079.
398. Raoult D. Relatório. Unité des Rickettsies - OMS 1992;Marseille.
399. Raoult D, Tissot Dupont H, Caraco P, Brouqui P, Drancourt M, Charrel C. Mediterranean Spotted Fever in Marseille: Descriptive Epidemiology and Climatic Factors Influence. *Eur J Epidemiol* 1992;8(2):192-197.
400. Raoult D, Dupont HT, Chicheportiche C, Peter O, Gilot B, Drancourt M. Mediterranean Spotted Fever in Marseille, France: Correlation between Prevalence of Hospitalized Patients, Seroepidemiology, and Prevalence of Infected Ticks in Three Different Areas.. *Am J Trop Med Hyg* 1993;48(2):249-256.
401. Raoult D, Arzouni J-P, Jambon MC, Beytout J, Ramousse O. Western Blot as a Seroepidemiologic Tool for Detecting foci of Mediterranean Spotted Fever (MSF). *Eur J Epidemiol* 1994;10:37-40.
402. Regnery RL, Tzianabos T, Esposito JJ, McDade JE. Strain Differentiation of Epidemic Typhus *Rickettsiae* (*Rickettsiae prowazekii*) by DNA Restriction Endonuclease Analysis. *Curr Microbiol* 1983;8:355-358.
403. Regnery RL, Fu ZY, Spruill CL. Flying Squirrel-Associated *Rickettsia prowazeki* (Epidemic Typhus *Rickettsiae*) Characterized by a Specific DNA Fragment Produced by Restriction Endonuclease Digestion. *J Clin Microbiol* 1986;23(1):189-191.
404. 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):1576-1589.
405. Rehacek J, Brezina R, Kovacova R, Zupancicova M. Haemocyte Test - An Easy, Quick and Reliable Method for the Detection of *Rickettsiae* in Ticks. *Acta Virol* 1971;15:237-240.
406. Rehacek J, Zupancicova M, Ac P, Brezina R, Urvolgyi J, Kovacova E, Tarasevic IV, Jablonskaja VA, Pospisil R, Baloghova D. *Rickettsioses* Studies. 2. Natural Foci of *Rickettsioses* in East Slovakia. *Bull WHO* 1976a;53:31-38.
407. Rehacek J, Zupancicova M, Kovacova E, Urvolgyi J, Brezina R. Study of *Rickettsioses* in Slovakia. III. Experimental Infection of *Apodemus flavicollis* Melch, by *Rickettsiae* of the Spotted Fever (SF) Group Isolated in Slovakia. *J Hyg Epidem Microbiol Immunol (Prague)* 1976b;20:306-313.
408. Rehacek J, Vosta J, Tarasevic IV, Brezina R, Jablonskaja VA, Plotnikova LF, Fetisova NF, Hanak P. *Rickettsioses* Studies. 3. Natural Foci of *Rickettsioses* in South Bohemia. *Bull WHO* 1977;55:455-461.
409. Rehacek J, Urvolgyi J. Towards more Standardized Methods in Ecological Studies of *Rickettsiae* in Relation to their Vectors and Vertebrate Hosts. VII Int Congr Infect Paras Diseases 1978;1:1-8.
410. Rehacek J, Vosta J, Brezina R, Hanak P. *Rickettsiae* in the Southern Part of the Protected Natural Region of (PNR) Sumava. *Rada Zootechnicka* 1984;2:63-77.
411. Rehacek J. *Rickettsia Slovaca*, the Organism and Its Ecology. *Acta Sc Nat Brno* 1984;18(2):1-50.
412. Rehacek J, Tarasevich IV. Acari-Borne *Rickettsiae* & *Rickettsioses* in Eurasia. Veda Publishing House Bratislava 1988;1:1-343.
413. Rehacek J. Ecological Relationships between Ticks and *Rickettsiae*. *Eur J Epidemiol* 1989;5(4):407-413.
414. Rehacek J, Tarasevich IV. Ecological Questions Concerning *Rickettsiae*. *Eur J Epidemiol* 1991;7(3):229-236.
415. Rehacek J. The Role of Ticks in Dissemination of *Rickettsiae* in Nature. *Acta Facult Rerum Natur Univers Comenianae – Zoologia* 1991;35:127-130.
416. Rehacek J. *Rickettsiae* and their Ecology in the Alpine Region. *Rev* 1992a;1:290-301.
417. Rehacek J. *Rickettsioses* as Zoonoses. Comunicação Oral no INSA 1992b.

418. Rehacek J. Tick Culture: Applications in Biology. *Arthropod Cell Culture Systems* 1994;5:65-90.
419. Relman DA. The Identification of Uncultured Microbial Pathogens. *J Infect Dis* 1993;168:1-8.
420. Rhodes AR, Norment BR. Hosts of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in Northern Mississippi, USA. *J Med Entomol* 1979;16(6):488-492.
421. Ribeiro JMC. Vector Saliva and its Role in Parasite Transmission. *Experim Parasitol* 1989;69:104-106.
422. Ricketts HT. Classic in Infectious Diseases. Some Aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as Shown by Recent Investigations. *Rev Infectious Diseases* 1991;13:1227-1240.
423. Roberts JI. The Tick of Rodents and their Nests, and the Discovery that *Rhipicephalus sanguineus* Latr. is the Vector of Tropical Typhus in Kenya. *J Trop Med and Hyg* 1935;35(1):1-22.
424. Robertson RG, Wisseman, Jr CL, Traub R. Tick-Borne Rickettsiae of the Spotted Fever Group in West Pakistan. I. Isolation of Strains from Ticks in Different Habitats. *Am J Epidemiol* 1970;92(6):382-394.
425. Robertson RG, Wisseman, Jr CL. Tick-Borne Rickettsiae of the Spotted Fever Group in West Pakistan. II. Serological Classification of Isolates from West Pakistan and Thailand: Evidence for Two New Species. *Am J Epidemiol* 1973;97(1):55-64.
426. Rocha-Lima H. Zur Aetiologie des Fleckfiebers. *Berliner Klin Wochenschrift* 1916;21:567-569.
427. Rodriguez AL, Jerez V, Lombardo AG, Rebollo J, Julia JA. ARDS Associated with Boutonneuse Fever. *Chest* 1989;95:924-925.
428. Roux V, Drancourt M, Raoult D. Determination of Genome Sizes of *Rickettsia* spp. within the Spotted Fever Group, using Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Bacteriology* 1992;174(22):7455-7457.
429. Roux V, Raoult D. Genotypic Identification and Phylogenetic Analysis of the Spotted Fever Group Rickettsiae by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *J Bacteriol* 1993;175:4895-4904.
430. Roux V, Raoult D. Phylogenetic Analysis of the Genus *Rickettsia* by 16S rDNA Sequencing. *Res Microbiol* 1995;146:385-396.
431. Ruiz R, Herrero JI, Martín AM, Sanz F, Mateos A, Hernández A, et al. Vascular Permeability in Boutonneuse Fever. *J Infect Dis* 1984;149:1036-.
432. Ruiz R, Herrero-Herrero JI, Martín-Sánchez AM, Martín-González JA. Prevalence of Antibodies to *Rickettsia conorii*, *Coxiella burnetii* and *Rickettsia typhus* in Salamanca Province (Spain). Serosurvey in the Human Population. *Eur J Epidemiol* 1990;6(3):293-299.
433. Ruiz R, Herrero-Herrero JI, Macías JF. Mechanism of Low Serum Sodium Levels in Mediterranean Spotted Fever. *Acta Tropica* 1992;50:161-167.
434. Salgo MP, Telzak EE, Currie B, Perlman DC, Litman N, Levi M, Nathenson G, Benach JL, Al-Hafidh R, Casey J. A Focus of Rocky Mountain Spotted Fever within New York City. *New England J Med* 1988;318:1345-1348.
435. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual - 2nd Edition*. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
436. Sampaio A, Soares A. Tifo Exantemático em Braga. Identificação da Forma Murina da Doença. *J Soc Cienc Med Lisboa* 1950;114:201-211.
437. Sampaio A, Faia MM. Estudo Comparativo de Algumas Reacções Sorológicas no Diagnóstico da Febre Escarotodular. *J Soc Cienc Med Lisboa* 1951;115(1 e 2):300-310.
438. Sampaio A, Faia MA. Contribuição para o Estudo da Biologia da *Rickettsia conorii* em Portugal. *An Ins Med Trop* 1953;10:627-636.
439. Sant'anna JF. On a Disease in Man Following Tick-Bites and Occurring in Lourenço Marques. *Parasitol* 1912;4:87-88.

440. Santos-Reis M, Collares-Pereira M, Bacellar F, Mathias ML, Ramalinho MG, Alves MJ, Oom MM, Nuncio MS, Petrucci-Fonseca F, Martins L. A Importancia Ecológica dos Mamíferos como Reservatórios de Zoonoses. II Simpósio Ibérico Sobre Ixodoidea e Enfermidades Transmitidas 1993;Évora.
441. Santucci LA, Gutierrez PL, Silverman DJ. *Rickettsia rickettsii* Induces Superoxide Radical and Superoxide Dismutase in Human Endothelial Cells. *Infect Immun* 1992;60(12):5113-5118.
442. Sarov B, Galil A, Sikuler E, Yaguspky P, Saah A, Gilad A, Naggan L, Sarov I. Prospective Study on Symptomatic versus Asymptomatic Infections and Serological Response to Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Two Rural Sites in the Negev (Southern Israel). *Ann N Y Acad Sci* 1991;1:243-245.
443. Saz JV, Bacellar F, Merino FJ, Filipe A. Seroprevalencia de la Infeccion por *Coxiella burnetti* y *Rickettsia conorii* en la Provincia de Soria. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 1993;11(9):469-473.
444. Schaechter M, Bozeman FM, Smadel JE. Study on the Growth of *Rickettsiae*. II. Morphologic Observations of Living *Rickettsiae* in Tissue Culture Cells. *Virology* 1957;3:160-172.
445. Schramek S. Deoxyribonucleic Acid Base Composition of Members of the Typhus Group of *Rickettsiae*. *Acta virol* 1972;16:447.
446. Schramek S. Deoxyribonucleic Acid Base Composition of *Rickettsiae* Belonging to the Rocky Mountain Spotted Fever Group Isolated in Czechoslovakia. *Acta virol* 1974;18:173-174.
447. Schrieffer M, Sacci JB, Dumler S, Bullen MG, Azad AF. Identification of a Novel *Rickettsial* Infection in a Patient Diagnosed with Murine Typhus. *J Clin Microbiol* 1994a;32(4):949-954.
448. Schrieffer M, Higgins J, Azad A. Taxonomic placement of the ELB Agent. *Ann Meeting Am Soc Rickettsiology and Rickettsial Diseases* 1994b.
449. Schuenke KW, Walker DH. Cloning, Sequencing and Expression of the Gene Coding for an Antigenic 120-Kilodalton Protein of *Rickettsia conorii*. *Infect Immun* 1994;62(3):904-909.
450. Schwan TG. Guest Editorial. How Do We Control Tick-Borne Diseases? *J Spirochetal Tick-Borne Dis* 1995;2(1):1-2.
451. Segura-Porta F, Font-Creus B, Espejo-Arenas E, Bella-Cueto F. New Trends in Mediterranean Spotted Fever. *Eur J Epidemiol* 1989;5(4):438-443.
452. Sexton DJ, Burgdorfer W, Thomas L, Norment BR. Rocky Mountain Spotted Fever in Mississippi: Survey for Spotted Fever Antibodies in Dogs and for Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Dog Ticks. *Am J Epidemiol* 1976;103(2):192-197.
453. Sexton DJ, Banks J, Graves S, Hughes K, Dwyer B. Prevalence of Antibodies to Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Dogs from Southeastern Australia. *Am J Trop Med Hyg* 1991;45(2):243-248.
454. Sexton DJ, Corey GR. Rocky Mountain "Spotless" and "Almost Spotless" Fever: A Wolf in Sheep's Clothing. *J Infect Diseases* 1992;15:439-448.
455. Sexton DJ, Muniz M, Corey R, Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Dumler S, Walker DH, Peçanha PM, Dietze R. Brazilian Spotted Fever in Espírito Santo, Brazil: A Description of a Focus of Infection in a New Endemic Region. *Am J Trop Med Hyg* 1993;49(2):222-226.
456. Shaked Y, Samra Y, Maier MK, Rubinstein E. Murine typhus and Spotted Fever in Israel in the Eighties: Retrospective Analysis. *Infection* 1988;16:283/29-287/35.
457. Shaked Y, Samra Y, Maier MK, Rubinstein E. Relapse of *Rickettsial* Mediterranean Spotted Fever and Murine Typhus after Treatment with Chloramphenicol. *J Infect* 1989;18:35-37.
458. Silverman DJ, Wisseman, Jr CL. Comparative Ultrastructural Study on the Cell Envelopes of *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia rickettsii*, and *Rickettsia tsutsugamushi*. *Infect Immun* 1978;21(3):1020-1023.
459. Silverman DJ, Wisseman, Jr CL. In Vitro Studies of *Rickettsia*-Host Cell Interactions: Ultrastructural Changes Induced by *Rickettsia rickettsii* Infection of Chicken Embryo Fibroblasts. *Infect Immun* 1979;26(2):714-727.
460. Silverman DJ, Santucci LA. Potential for Free Radical-Induced Lipid Peroxidation as a Cause of Endothelial Cell Injury in Rocky Mountain Spotted Fever. *Infect Immun* 1988;56:3110-3115.

461. Silverman DJ. Some Contributions of Electron Microscopy to the Study of the Rickettsiae. *Eur J Epidemiol* 1991;7(3):200-206.
462. Silverman DJ, Santucci LA, Meyers N, Sekeyova Z. Penetration of Host Cells by *Rickettsia rickettsii* Appears To Be Mediated by a Phospholipase of Rickettsial Origin. *Infect Immun* 1992;60(7):2733-2740.
463. Singer CE, Ames BN. Sunlight Ultraviolet and Bacterial DNA Base Ratios. *Science* 1970;170:822-826.
464. Smadel JE. Intracellular Infection and the Carrier State. *Science* 1963;140:153-160.
465. Smith JE, Dunn AM. Transovarial Transmission. *Parasitol Today* 1991;7(6):146-148.
466. Snyder JC. Typhus Fever Rickettsiae. *Pitman Medical* 1965;4.<sup>a</sup> Edição:799-1160.
467. Soliman AK, Botros BAM, Ksiazek TG, Hoogstraal H, Helmy I, Morrill JC. Seroprevalence of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia conorii* Infection Among Rodents and Dogs in Egypt. *J Trop Med Hyg* 1989;92:345-349.
468. Sompolinsky D, Boldur I, Goldwasser RA, Kahana H, Kazak R, Keysary A, Pik A. Serological Cross-Reactions Between *Rickettsia typhi*, *Proteus vulgaris* OX19 and *Legionella bozemanii* in a Series of Febrile Patients. *Israel J Med Sci* 1986;22:745-752.
469. Sonenshine DE, Peters AH, Levy GF. Rocky Mountain Spotted Fever in Relation to Vegetation in the Eastern United States, 1951 - 1971. *Am J Epidemiol* 1972;96(1):59-69.
470. Sonenshine DE. *Biology of Ticks*. Oxford University Press 1993;1 e 2.
471. Spurr AR. A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy. *J Ultra Res* 1969;26:31-43.
472. Stackebrandt E, Goebel BM. Taxonomic Note: A Place for DNA-DNA Reassociation and 16S rRNA Sequence Analysis in the Present Species Definition in Bacteriology. *Int J System Bacteriol* 1994;44(4):846-849.
473. Stenos J, Baird R, Ross B, Bowden S, Dwyer B, Leslie D. Molecular Characterization of *Rickettsia honei*, a Newly Described Member of the Rickettsial Spotted Fever Group. *Ann Meeting Am Soc for Rickettsiology and Rickettsial Diseases* 1994.
474. Stewart RS. Flinders Island Spotted Fever: a Newly Recognised Endemic Focus of Tick Typhus in Bass Strait Part I. Clinical and Epidemiological Features. *Med J Australia* 1991;154:94-99.
475. 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*. *Int J Systematic Bacteriol* 1994;44(4):798-804.
476. Takada N, Fujita H, Yano Y, Tsuboi Y, Mahara F. First Isolation of a *Rickettsia* Closely Related to Japanese Spotted Fever Pathogen from a Tick in Japan. *J Med Entomol* 1994;31(2):183-185.
477. Tamura A, Ohashi N, Urakami H, Miyamura S. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a New Genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol* 1995;45(3):589-591.
478. Tarasevich IV, Makarova VA, Fetisova NF, Stepanov AV, Miskarova ED, Raoult D. Studies of a "New" Rickettsiosis "Astrakhan" Spotted Fever. *Eur J Epidemiol* 1991a;7(3):294-298.
479. Tarasevich IV, Makarova VA, Fetisova NF, Stepanov AV, Miskarova ED, Balayeva N, Raoult D. Astrakhan Fever, a Spotted-Fever Rickettsiosis. *The Lancet* 1991b;337:172-173.
480. Tavares L, Botas J, Antunes F, Araújo FC. A Febre Escaro-Nodular em Portugal. I. Análise Estatístico-Epidemiológica nos Últimos 30 Anos (1955-1984). *O Médico* 1985;113(1769):838-846.
481. Tendeiro J. Revisão Sistemática dos Ixodídeos Portugueses. *Boletim Pecuário Lisboa* 1962;2:1-137.
482. Teysseire N, Chiche-Portiche C, Raoult D. Intracellular Movements of *Rickettsia conorii* and *R. typhi* Based on Actin Polymerization. *Res Microbiol* 1992;143:821-829.
483. Teysseire N, Raoult D. Comparison of Western Immunoblotting and Microimmunofluorescence for Diagnosis of Mediterranean Spotted Fever. *J Clin Microbiol* 1992;30(2):455-460.

484. Teysseire N. Physiopathologie des Affections a *Rickettsia conorii*. Etude Microscopique du Cycle Intracellulaire et Exploration du Dysfonctionnement Endothelial. These pour le Doctorat de L'Universite D'Aix - Marseille II 1993;Faculte des Sciences de Luminy.
485. Teysseire N, Boudier J-A, Raoult D. *Rickettsia conorii* Entry into Vero Cells. *Infect Immun* 1995;63(1):366-374.
486. Todd WJ, Burgdorfer W, Wray GP. Detection of Fibrils Associated with *Rickettsia rickettsii*. *Infect Immun* 1983;41:1252-1260.
487. Traub R, Wisseman, Jr CL, Farhang-Azad A. The Ecology of Murine Typhus - A Critical Review. *Trop Dis Bull* 1978;75(4):237-317.
488. Traub R, Jellison WL. Evolutionary and Biogeographic History and the Phylogeny of Vectors and Reservoirs as Factors in the Transmission of Diseases from Other Animals to Man. *Rickettsiae and Rickettsial Diseases* 1981;l:517-546.
489. Tringali G, Montenegro MR, Walker DH, Mansueto S. Immunity and Rickettsial Infection: A Review. *Acta Tropica* 1983;40:311-320.
490. Tringali G, Intonazzo V, Perna AM, Mansueto S, Walker DH. Epidemiology of Boutonneuse Fever in Western Sicily. Isolation of Spotted Fever Group Rickettsiae from *Rhipicephalus sanguineus* (Fam. Ixodidae). *Microbiologica* 1986a;9:81-87.
491. Tringali G, Regnery R, Sperlazzo A, Intonazzo V, Spruill C, Perna AM, La Rosa G. Epidemiology of Boutonneuse Fever in Western Sicily: Demonstration of Multiple Spotted Fever Group-Rickettsiae Subtypes. *Microbiologica* 1989;12:189-194.
492. Troisier J, Cattani R, Sifferlen . Fievre Exanthematique Inapparente de L'Homme Transmise par *Rhipicephalus sanguineus*, Virulence pour le Singe et le Cobaye. *An Ins Pasteur* 1931;47(5):492-507.
493. Tselentis Y, Psaroulaki A, Maniatis J, Spyridaki I, Babalis T. Genotypic Identification of Murine Typhus *Rickettsia* in Rats and Their Fleas in an Endemic Area of Greece by the Polymerase Chain Reaction and Restriction Fragment Length Polymorphism. *Am J Trop Med Hyg* 1996;54(4):413-417.
494. Turco J, Winkler HH. Isolation of *Rickettsia prowazekii* with Reduced Sensitivity to Gamma Interferon. *Infect Immun* 1989;57:1765-1772.
495. Tyeryar, Jr FJ, Weiss E, Millar DB, Bozeman FM, Ormsbee RA. DNA Base Composition of Rickettsiae. *Science* 1973;180:415-417.
496. Uchida T, Tashiro F, Funato T, Kitamura Y. Isolation of a Spotted Fever Group Rickettsia from a Patient with Febrile Exanthematous Illness in Shikoku, Japan. *Microbiol Immunol* 1986;30(12):1323-1326.
497. Uchida T, Uchiyama T, Koyama AH. Isolation of Spotted Fever Group Rickettsiae from Humans in Japan. *J Infect Dis* 1988;158(3):664-665.
498. Uchida T, Yu X, Uchiyama T, Walker DH. Identification of a unique Spotted Fever Group Rickettsia from Humans in Japan. *J Infect Diseases* 1989;159(6):1122-1126.
499. Uchida T, Uchiyama T, Kumano K, Walker DH. *Rickettsia japonica* sp.nov., the Etiological Agent of Spotted Fever Group Rickettsiosis in Japan. *Int J Systematic Bacteriol* 1992;42(2):303-305.
500. Uchida T. *Rickettsia japonica*, the Etiologic Agent of Oriental Spotted Fever. *Microbiol Immunol* 1993;37(2):91-102.
501. Uchiyama T, Uchida T. Ultrastructural Study on Japanese Isolates of Spotted Fever Group Rickettsiae. *Microbiol Immunol* 1988;32(11):1163-1166.
502. Uchiyama T, Uchida T, Walker DH. Species-Specific Monoclonal Antibodies to *Rickettsia japonica*, a Newly Identified Spotted Fever Group Rickettsia. *J Clin Microbiol* 1990;28(6):1177-1180.
503. Uchiyama T, Uchida T, Wen JW, Walker DH. Demonstration of Heat-Labile and Heat-Stable Epitopes of *Rickettsia japonica* on Ultrathin Sections. *Lab Invest* 1994a;71(3):432-437.
504. Uchiyama T, Uchida T, Walker DH. Analysis of Major Surface Polypeptides of *Rickettsia japonica*. *Microbiol Immunol* 1994b;38(7):575-579.



505. Urvolgyi J, Brezina R. Rickettsia slovacica: A New Member of Spotted Fever Group Rickettsiae. Acta del II International Symposium Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Bratislava 1978;Publishing House of the Slovak Academy of Sciences:299-306.
506. Valente C, Trindade L, Faria MJ, Sarraguça L, Barros MSJ, Vieira A. Febre Escaro nodular – Casuística de 5 Anos. Med Cir 1994a;XIV:62-66.
507. Valente C, Trindade L, Faria MJ, Ferrão O, Sarraguça L. Febre Escaronodular no Doente Idoso: A Propósito de 30 Casos. Geriatria 1994b;7(67):19-21.
508. Varma MRG. Ticks and mites (Acari). Med Insects and Arachnids 1993;18:597-600.
509. Vaughan JA, Azad AF. Acquisition of Murine Typhus Rickettsiae by Fleas. Ann New York Acad Scienc 1990;590:70-75.
510. Vene SL. Diagnosis of Rickettsial Infections in Swedish Patients: Detection of Specific IgM. Eur J Epidemiol 1989;5(4):436-437.
511. Vest ED, Lundgren DL, Parker DD, Johnson DE, Morse EL, Bushman JB, Sidwell RW, Thorpe BD. Results of a Five-Year Survey for Certain Zoonotic Diseases in the Fauna of Western Utah. Am J Trop Med Hyg 1965;14(1):124-135.
512. Vicente V, Alberca I, Ruiz R, Herrero JI, González R, Portugal J. Coagulation Abnormalities in Patients with Mediterranean Spotted Fever. J Infect Dis 1986;153:128-131.
513. Vishwanath S, McDonald GA, Watkins NG. A Recombinant Rickettsia conorii Vaccine Protects Guinea Pigs from Experimental Boutonneuse Fever and Rocky Mountain Spotted Fever. Infect Immunol 1990;58(3):646-653.
514. Vitale G, DiStefano R, Damiani G, Mansueto S. Characterization of Sicilian Strains of Spotted Fever Group Rickettsiae by Using Monoclonal Antibodies. J Clin Microbiol 1989;27:1081-1085.
515. Walker DH, Firth WT, Edgell CJS. Human Endothelial Cell Culture Plaques Induced by Rickettsia rickettsii. Infect Immun 1982;37(1):301-306.
516. Walker DH, Firth WT, Ballard JG, Hegarty BC. Role of Phospholipase-Associated Penetration Mechanism in Cell Injury by Rickettsia rickettsii. Infect Immun 1983;40(2):840-842.
517. Walker DH, Firth WT, Hegarty BC. Injury Restricted to Cells Infected with Spotted Fever Group Rickettsiae in Parabolic Chambers. Acta Tropica 1984a;41:307-312.
518. Walker DH, Lange JV, Hanff PA, Tidwell RR, Hegarty BC. Antigens of Rickettsii and Rickettsia conorii. L Leive and D Schlessinger Ed 1984b;Am Soc Microbiol:244-247.
519. Walker DH, Gear JHS. Correlation of the Distribution of Rickettsia conorii, Microscopic Lesions, and Clinical Features in South African Tick Bite Fever. Am J Trop Med Hyg 1985;34(2):361-371.
520. Walker DH, Staiti A, Mansueto S, Tringali G. Frequent Occurrence of Hepatic Lesions in Boutonneuse Fever. Acta Tropica 1986;43:175-181.
521. Walker DH, Herrero-Herrero JI, Ruiz-Beltran R, Bullon-Sopelana A, Ramos-Hidalgo A. The Pathology of Fatal Mediterranean Spotted Fever. Am J Clin Pathol 1987;87(5):669-672.
522. Walker DH. The Rickettsia-Host Interaction. Intracellular Parasitism 1988;1:79-92.
523. Walker DH. Rickettsioses of the Spotted Fever Group around the World. J Dermatol 1989a;16(3):169-177.
524. Walker DH. Rocky Mountain Spotted Fever: A Disease in Need of Microbiological Concern. Clin Microbiol Rev 1989b;2(3):227-240.
525. Walker DH. The Role of Host Factors in the Severity of Spotted Fever and Typhus Rickettsioses. Ann New York Acad Sciences 1990;590:10-19.
526. Walker DH, Liu Q-H, Yu X-J, Li H, Taylor C, Feng H-M. Antigenic Diversity of Rickettsia conorii. Am J Trop Med Hyg 1992;47(1):78-86.

527. Walker DH, Feng HM, Saada JI, Crocquet-Valdes P, Radulovic S, Popov VL, Manor E. Comparative Antigenic Analysis of Spotted Fever Group Rickettsiae from Israel and Other Closely Related Organisms. *Am J Trop Med Hyg* 1995;52(6):569-576.
528. Walker DH. Rocky Mountain Spotted Fever: A Seasonal Alert. *Clin Infect Dis* 1995;20:1111-1117.
529. Walker DH, Dumler JS. Emergence of the Ehrlichioses as Human Health Problems. *Emerging Infectious Diseases* 1996;2(1):18-29.
530. Walker TS, Winkler HH. Penetration of Cultured Mouse Fibroblasts (L Cells) by Rickettsia prowazeki. *Infect Immun* 1978;22:200-208.
531. Wang JG, Walker DH, Li H, Lenz B, Jerrells TR. Barbash Strain Spotted Fever Group Rickettsia is a Strain of Rickettsia conorii and Differs from Rickettsia sibirica. *Acta virol* 1987a;31:489-498.
532. Wang JG, Walker DH. Identification of Spotted Fever Group Rickettsiae from Human and Tick Sources in the People's Republic of China. *J Infect Diseases* 1987b;156(4):665-669.
533. Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, Murray RGE, Stackebrandt E, Starr MP, Truper HG. Report of the Ad Hoc Committee on Reconciliation of Approaches to Bacterial Systematics. *Int J System Bacteriol* 1987;37(4):463-464.
534. Weil E, Felix A. Zur Serologischen Diagnose des Fleckfiebers. *Wiener Klinische Wochenschrift* 1916;29(2):33-35.
535. Weisburg WG, Woese CR, Dobson ME, Weiss E. A Common Origin of Rickettsiae and Certain Plant Pathogens. *Science* 1985;230:556-558.
536. Weisburg WG. Molecular Approach to the Study of Rickettsial Phylogeny. *Clin Microbiol* 1986;1:191-193.
537. Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, Mandelco L, Sechrest JE, Weiss E, Woese CR. Phylogenetic Diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol* 1989;171(8):4202-4206.
538. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. 16S Ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic Study. *J Bacteriol* 1991;173(2):697-703.
539. Weiss E, Dressler HR. Centrifugation of Rickettsiae and Viruses Onto Cells and Its Effect on Infection. *Proc Soc Exp Biol and Med* 1960;103:691-695.
540. Weiss E, Dressler HR. Increased Resistance to Chloramphenicol in Rickettsia prowazekii with a Note on Failure to Demonstrate Genetic Interaction Among Strains. *J Bacteriol* 1962;83:409-414.
541. Weiss E. Comparative Metabolism of Rickettsiae and Other Host Dependent Bacteria. *Zentralbl Bakteriol Parasitenk Infektionskr Hyg Abt Orig* 1968;206:292-298.
542. Weiss E. Growth and Physiology of Rickettsiae. *Bacteriol Rev* 1973;37(3):259-283.-
543. Weiss E, Coolbaugh JC, Williams JC. Separation of Viable Rickettsia typhi from Yolk Sac and L Cell Host Components by Renografin Density Gradient Centrifugation. *Appl Microbiol* 1975;30(3):456-463.
544. Weiss E. The Biology of Rickettsiae. *Ann Rev Microbiol* 1982;36:345-370.
545. Weiss E, Moulder JW. Order I. Rickettsiales Gieszczykiewicz, 1939. *Bergey Manual of Systematic Bacteriology* 1984;1:687-703.
546. Weiss E, Dasch GA, Chang K-P. Tribe III. Wolbachieae Philip 1956, 266. *Bergey Manual of Systematic Bacteriology* 1984;1:711-717.
547. Weiss E, Dobson ME, Dasch GA. Biochemistry of Rickettsiae: Recent Advances. *Acta Virol* 1987;31:271-286.
548. Weiss E, Nelson WN, Dasch GA. Wolbachia persica to be renamed Francisella suitori. *Ann Meeting Am Soc for Rickettsiology and Rickettsial Diseases* 1994.
549. Weiss K. The role of Rickettsioses in History. *Biology of Rickettsial Diseases* 1988;1:1-14.
550. Werren JH, Hurst GDD, Zhang W, Breeuwer JAJ, Stouthamer R, Majerus MEN. Rickettsial Relative Associated with Male Killing in the Ladybird Beetle (*Adalia bipunctata*). *J Bacteriol* 1994;176(2):388-394.

551. WHO / OMS. EP5. 1970.
552. WHO / OMS. Report of a Working Group on Rickettsial Diseases. WHO 1981;82(1):1-27.
553. WHO / OMS. Rickettsioses: Un Problème de Morbidité Persistant. Bull OMS 1982a;60(5):693-701.
554. WHO / OMS. Rickettsioses: A Continuing Disease Problem. Bull WHO 1982b;60(2):157-164.
555. WHO / OMS. Report of the MZCP Workshop on Surveillance, Prevention and Control of Rickettsial Zoonoses in the Mediterranean. Report 1987;87(2):1-11.
556. WHO / OMS. Laboratory diagnosis of Rickettsial diseases. Bull WHO 1988;66(3):283-420.
557. WHO / OMS. Global Surveillance of Rickettsial Diseases: Memorandum from a WHO Meeting. Bull WHO 1993;71(3 e 4):293-296.
558. Williams JC, Vodkin MH. Metabolism and Genetics of Chlamydias and Rickettsias. Onderstepoort J Vet Res 1987;54:211-221.
559. Winkler HH, Ramm LE. Adsorption of Typhus Rickettsiae to Ghosts of Sheep Erythrocytes. Infect Immun 1975;11(6):1244-1251.
560. Winkler HH, Miller ET. Phospholipase A and the Interaction of Rickettsia prowazekii and Mouse Fibroblasts (L-929 Cells). Infect Immun 1982;38(1):109-113.
561. Winkler HH, Daugherty RM. Acquisition of Glucose by Rickettsia prowazekii through the Nucleotide Intermediate Uridine 5'-Diphosphoglucose. J Bacteriol 1986;167(3):805-808.
562. Winkler HH. Protein and RNA Synthesis by Isolated Rickettsia prowazekii. Infect Immun 1987;55(9):2032-2036.
563. Winkler HH. Rickettsia Species (as Organisms). Annu Rev Microbiol 1990;44:131-153.
564. Winkler HH. Molecular Biology of Rickettsiae. Eur J Epidemiol 1991;7(3):207-212.
565. Winkler HH, Day L, Daugherty R. Analysis of Hydrolytic Products from Choline-Labeled Host Cell Phospholipids during Growth of Rickettsia prowazekii. Infect Immun 1994;62(4):1457-1459.
566. Wisseman, Jr CL, Hahn FE, Jackson EB, Bozeman FM, Smadel JE. Metabolic Studies of Rickettsiae. II. Studies on the Pathway of Glutamate Oxidation by Purified Suspensions of Rickettsia mooseri. J Immunol 1952;68:251-264.
567. Wisseman, Jr 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):1391-1401.
568. Wisseman, Jr CL, Edlinger EA, Waddell AD, Jones MR. Infection Cycle of Rickettsia rickettsii in Chicken Embryo and L-929 Cells in Culture. Infect Immun 1976;14(4):1052-1064.
569. Wisseman, Jr CL. Selected Observations on Rickettsiae and their Host Cells. Rickettsiae and Rickettsial Diseases 1985;J Kazar (Ed.):167-184.
570. Woese CR, Gutell R, Gupta R, Noller HF. Detailed Analysis of the Higher-Order Structure of 16S-Like Ribosomal Ribonucleic Acids. Microbiol Rev 1983;47(4):621-669.
571. Woese CR, Stackebrandt E, Weisburg WG, Paster BJ, Madigan MT, Fowler VJ, Hahn CM, Blanz P, Gupta R, Nealson KH, Fox GE. The Phylogeny of Purple Bacteria: The Gamma Subdivision. Syst Appl Microbiol 1984;5:315-326.
572. Woese CR. Bacterial Evolution. Microbiol Rev 1987;51(2):221-271.
573. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the Domains Archaea, Bacteria and Eucarya. Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:4576-4579.
574. Woese CR. Microbiology in Transition. Proc Natl Acad Sciences 1994;91:1601-1603.

575. Wolbach SB. Studies on Rocky Mountain Spotted Fever. *J M Res* 1919;41.
576. Wood DO, Williamson LR, Winkler HH, Krause DC. Nucleotide Sequence of the *Rickettsia prowazekii* Citrate Synthase Gene. *J Bacteriol* 1987;169(8):3564-3572.
577. Wood DO, Solomon MJ, Speed RR. Characterization of the *Rickettsia prowazekii* pepA Gene Encoding Leucine Aminopeptidase. *J Bacteriol* 1993;175(1):159-165.
578. Wood WH, Wisseman, Jr CL. The Cell Wall of *Rickettsia mooseri*. I. Morphology and Chemical Composition. *J Bacteriol* 1967;93(3):1113-1118.
579. Yamamoto S, Morita C, Tsuchiya K. Isolation of Spotted Fever Group *Rickettsia* from *Apodemus speciosus* in an Endemic Area in Japan. *Jpn J Med Sci Biol* 1992;45:81-86.
580. Yan Y, Uchiyama T, Uchida T. Differentiation of *Rickettsia japonica* by Restriction Endonuclease Fragment Length Polymorphism Using Products of Polymerase Chain Reaction Amplification with *Rickettsia rickettsii* 190-kilodalton Surface Antigen Gene Primers. *Microbiol Immunol* 1993;37:441-445.
581. Yu X, Walker DW, Jerrells TR. Polypeptides Constituting the Antigenic Basis for Identification of *Rickettsia sibirica* Species by the Standard Serotyping Method for Spotted Fever Group *Rickettsiae*. *Acta Virol* 1990;34:71-79.
582. Yu X, Jin Y, Fan M, Xu G, Liu Q, Raoult D. Genotypic and Antigenic Identification of Two New Strains of Spotted Fever Group *Rickettsiae* Isolated from China. *J Clin Microbiol* 1993;31(1):83-88.
583. Zdrovovskij PF. La Rickettsiose à tiques d'Asie. *Bull Org Mond Santé* 1966;35:105-109.
584. Zhang JZ, Fan MY, Bi DZ. Detection of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Ticks and Rodents by Polymerase Chain Reaction Technique in People's Republic of China. *Acta Virol* 1995;39:263-267.
585. Zhang XF, Fan MY, Chen J, Bi DZ. Genotypic Identification of Seven *Rickettsia conorii* Strains. *Acta virol* 1994;38:35-37.
586. Zinsser H. Rats, Lice and History. Boston, Little Brown 1935;1:1-301.
587. Zupancicova M, Kovacova E. Contribution to localization of *Rickettsiae* in Ticks collected in nature. *Wiadomosci Parazytologiczne* 1972;18(4-5-6):565-569.



*À amizade, a quem tanto devo.*

**No Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge:**

Esta dissertação existe pelo facto do Prof. Dr. Armindo Filipe, Director do Centro de Estudos de Vectores e Doenças Infecciosas, ter-me orientado para a Rickettsiologia. A ele agradeço o apoio contínuo, a orientação, a leitura e sugestões ao manuscrito.

Devo, ainda, agradecer à Direcção do INSA, na pessoa do seu Director Dr. Bandeira da Costa, os apoios concedidos para a minha formação.

Agradeço às colegas:

Sofia Núncio, que tanto apoio dispensou nos trabalhos de campo e na fase de escrita; M. João Alves, aos mais novos do CEVDI (Rita, Margarida, Perpétua e Ana Sofia), a alguns mais velhos (Sandra, Armandina e Luís) e aos estrangeiros que por aqui passaram (Cheng, Paloma, Angel e Miguel).

Um agradecimento especial aos técnicos do CEVDI que, com profissionalismo, responderam a todas as solicitações:

Lígia Chaínho, Teresa Villares, Cristina Filipe, Basília Cristo, nos trabalhos de laboratório; Otilia Cristo e Conceição Paliotes, na preparação do material; Ana Borda d'Água, no cuidado com os animais e nas capturas de carraças; Olga Costa e Inês Perinas no secretariado.

Ainda no Instituto Nacional de Saúde – Lisboa, quero agradecer à Susana Franca pelos conhecimentos técnicos e pessoais que me transmitiu e aos técnicos do laboratório que dirige: Lúcia, Filomena e Amélia e, também, à Dr.<sup>a</sup> Maria Augusta do INSA – Porto.

**Na Universidade de Évora:**

Ao Prof. Dr. Vitor Caeiro, agradeço a aceitação como co-orientador desta tese, o apoio e ensinamentos na área da Ixodologia e ao Eng.<sup>o</sup> A.L.Simões.

Embora não só na Universidade, mas também no Hospital Distrital de Évora, o meu obrigada ao Prof. Dr. J. David de Morais

**Na Faculdade de Ciências de Lisboa:**

Aos colegas de curso Margarida Santos Reis e Francisco Fonseca, pelos conhecimentos que transmitiram e carraças que forneceram.

Aos que partilharam uma ou outra época e ainda estão presentes: Ju, Mar, Luz, Graça, Manela, Zu, Didi, Jorge, Paula Leiro, Fátima Marinho, Laura.

**No Instituto de Higiene e Medicina Tropical de Lisboa:**

Um agradecimento especial a Ana Tomás e ainda, à Alcione Trinca e Silvana Belo, da Helminologia; nas Leptospiras e nos trabalhos com roedores, à colega Margarida Collares Pereira.

Aos ex-companheiros da Protozoologia: Zé Capela, Luisa Anselmo, João Ramada, Francelina Pereira e Amélia Gomes; Prof. Dr. F. Antunes, Dr.<sup>a</sup> Conceição Pereira e Dr.<sup>a</sup> Filomena Silva. Uma palavra de apreço ao Paulo Almeida.

**No estrangeiro:**

À Lorenza Beati, mentora e modelo, quero agradecer todos os ensinamentos, o material, o apoio e acolhimento em sua casa e a sua amizade. Agradeço ainda ao François e ao Guy Vestris.

Ao Dr. J. Rehacek a ajuda nos primeiros passos dos estudos das relações ixodídeos-rickettsias.

Ao Russell Regnery, os ensinamentos sobre genética de rickettsias, à Jackie Dawson a amizade, e ao pessoal da VRZB-CDC, Joe, Judy, Kim, Barbara, Mary Jane, Laura, Dr. Olson, Neile.

**E ainda:**

Aos responsáveis pelos serviços bibliotecários do Instituto Bacteriológico Câmara Pestana, Instituto de Higiene e Medicina Tropical e INSA, agradeço as facilidades concedidas. Uma palavra em especial às Sras. Maria José, Maria Antónia, Maria do Céu, Teresa Kopke, Beatriz Bebiano e Etelvina Moreira e aos Srs. Antonio Ribeiro e Rui Rodrigues, pelo apoio indispensável na recolha da bibliografia.

Ao João Cobra; aos médicos veterinários Luis Vaz Pereira e Adalberto Cunha,; ao Sr. Luis Guerreiro e Sr. José Hilário dos Serviços da Zona Agrária de Alcácer do Sal, e a todos que cooperaram na captura dos ixodídeos o apreço pela ajuda. Ao pessoal do Canil de Belas (PSP) e de Setúbal, aos proprietários dos cães em Águas de Moura, pela compreensão.

Aos médicos do Hospital Distrital de Setúbal, Conceição Rendeiro e equipe, José Poças e Joana Sá, e de outros Serviços, que manifestaram interesse e ajuda para melhor compreendermos a febre das carraças.

À Dr.<sup>a</sup> Maria Conceição Branco agradeço o trabalho de supervisão da gramática (os erros são assumidos e devidos ao brasileirismo). Ao Sr.<sup>a</sup> Ana Bela Aguizo e Sr. Fernando Pinho a composição gráfica do texto. À Luisa, Beto, Nelo e Matos pelas fotografias.

Aos amigos de sempre (por ordem alfabética): Celso, Lita, Fernanda, Graça, Isidro, Zé Antonio, Zé Bentes, Rosário, Marinete e Paulo Anjos.

Aos meus pais Dario e Marina, irmãos Flávia e Neto, Nanda e João e Graça, em representação de toda a família. Finalmente, e sempre os primeiros, Roberto e Dario, a quem só não dedico este trabalho porque sei que prefeririam o meu tempo.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Filogenia dos Seres Vivos Elaborada pela Análise do 16S rARN .....	20
Figura 2 – Classificação Filogenética da Ordem Rickettsiales e Espécies Relacionadas .....	21
Figura 3 – Filogenia do Grupo $\alpha_2$ das Proteobacteria elaborada pela Análise do 16S rARN .....	31
Figura 4 – Dendrograma das Relações Genéticas entre as Sequências do Gene que Codifica a Proteína Antigénica de 190 kDa das Espécies do Grupo das Febres Exantemáticas .....	33
Figura 5 – Distribuição Geográfica das Espécies Patogénicas de Rickettsias do Grupo das Febres Exantemáticas .....	78
Figura 6 – Distribuição Geográfica das Rickettsias Isoladas de Ixodídeos e Consideradas Não Patogénicas para o Homem..	93
Figura 7 – Posição Sistemática dos Vectores de Rickettsias no Filo Arthropoda .....	97
Figura 8 – Sistemática das Espécies de Ixodidae Existentes em Portugal .....	102
Figura 9 – Casos Declarados de Febre Escaro Nodular de 1955-1995 .....	122
Figura 10 – Método da Bandeira para Recolha de Ixodídeos na Vegetação .....	131
Figura 11 – Rickettsias na Hemolinfa de Ixodídeos .....	184
Figura 12 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene CS das Espécies Padrão .....	219
Figura 13 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” das Espécies Padrão Digeridos com <i>Alu I</i> .....	221
Figura 14 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” das Espécies Padrão Digeridos com <i>Pst I</i> .....	222
Figura 15 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” das Espécies Padrão Digeridos com <i>Rsa I</i> .....	223
Figura 16 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” das Estirpes Isoladas de Sangue humano .....	224
Figura 17 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” das Estirpes Isoladas de <i>D. marginatus</i> .....	226
Figura 18 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” da Estirpe de <i>R. sibirica</i> .....	229
Figura 19 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene CS das Estirpes Isoladas de <i>R. sanguineus</i> .....	230
Figura 20 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” das Estirpes Isoladas de <i>R. sanguineus</i> .....	231
Figura 21 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” da Estirpe de Mtu 5 .....	232
Figura 22 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene CS das Estirpes Isoladas de <i>R. turanicus</i> .....	235
Figura 23 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” das Estirpes Isoladas de <i>R. turanicus</i> .....	236
Figura 24 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene CS das Estirpes Isoladas de <i>I. ricinus</i> e de <i>I. ventralloii</i> .....	237
Figura 25 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene CS das Estirpes Isolada de <i>H. marginatum</i> .....	238
Figura 26 – Perfis de Restrição do Segmento do Gene “190 KDa” das Estirpes Isoladas de <i>H. marginatum</i> .....	239
Figura 27 – Microscopia Electrónica – <i>R. conorii</i> marroquina .....	244
Figura 28 – Microscopia Electrónica – <i>R. conorii</i> PoTiR12 .....	246
Figura 29 – Microscopia Electrónica – <i>R. slovacica</i> PoTiR10 .....	249
Figura 30 – Microscopia Electrónica – PoTiR8 .....	251
Figura 31 – Microscopia Electrónica – Estirpes Isoladas de Sangue Humano .....	252
Figura 32 – Serologia da Febre Escaro Nodular (anual) .....	256
Figura 33 – Serologia da Febre Escaro Nodular (mensal) .....	256
Figura 34 – Serologia de <i>Mus musculus</i> .....	264
Figura 35 – Serologia de <i>Apodemus sylvaticus</i> .....	265
Figura 36 – Serologia de <i>Microtus duodecimcostatus</i> .....	265

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela I – Características diferenciais das Famílias da Ordem Rickettsiales .....	26
Tabela II – Taxonomia da Ordem Rickettsiales .....	26
Tabela III – Características Fenotípicas das Espécies de Rickettsia .....	30
Tabela IV – Estirpes do “complexo- <i>Rickettsia conorii</i> ” .....	39
Tabela V – Classificação das Rickettsias do Grupo das Febres Exantemáticas .....	43
Tabela VI – Óbitos Declarados Causados pela Febre Escaro Nodular em Portugal .....	122
Tabela VII – Sequência das Bases dos Oligonucleotídeos Sintéticos (“primers”) Utilizados para Multiplicação do DNA de Rickettsias .....	161
Tabela VIII – Endonucleases de Restrição Utilizadas para “RFLP” de Rickettsias .....	162
Tabela IX – Ixodídeos Capturados para Pesquisa de Rickettsias .....	175
Tabela X – Distribuição Anual por Hospedeiro do Total de Ixodídeos Capturados .....	178
Tabela XI – Ixodídeos com Microrganismos Semelhantes à Rickettsias na Hemolinfa .....	185
Tabela XII – Isolamento de Rickettsias pelo Método de “shell via” .....	189
Tabela XIII – Dados sobre os Ixodídeos a Partir dos Quais Foram Isoladas Estirpes de Rickettsia .....	191
Tabela XIV – Dados sobre as Amostras de Sangue Humano Submetidas ao Método de “shell via” para Isolamento de Rickettsias .....	193
Tabela XV – Órgãos de Micromamíferos Processados para Isolamento de Rickettsias .....	194
Tabela XVIa – Identificação por MIF de PotiHu915/94 .....	197
Tabela XVIb – Identificação por MIF de PoHu1021/95 .....	197
Tabela XVIIa – Identificação por MIF de PoTiR4 .....	198
Tabela XVIIb – Identificação por MIF de PoTiR5 .....	199
Tabela XVIIc – Identificação por MIF de PoTiR6 .....	199
Tabela XVIId – Identificação por MIF de PoTiR7 .....	199
Tabela XVIIe – Identificação por MIF de PoTiR10 .....	200
Tabela XVIIf – Identificação por MIF de PoTiR13 .....	200
Tabela XVIIg – Identificação por MIF de PoTiR14 .....	200
Tabela XVIIh – Identificação por MIF de PoTiR15 .....	201





<i>Tabela XVIII</i> – Identificação por MIF de PoTiR16 .....	201
<i>Tabela XVIIIj</i> – Identificação por MIF de PoTiR19 .....	201
<i>Tabela XVIIIk</i> – Identificação por MIF de PoTiR20 .....	202
<i>Tabela XVIIIl</i> – Identificação por MIF de PoTiR21 .....	202
<i>Tabela XVIIIm</i> – Identificação por MIF de PoTiR22 .....	202
<i>Tabela XVIIIn</i> – Identificação por MIF de PoTiR23 .....	203
<i>Tabela XVIIIo</i> – Identificação por MIF de PoTiR24 .....	203
<i>Tabela XVIIIp</i> – Identificação por MIF de PoTiR26 .....	203
<i>Tabela XVIIIq</i> – Identificação por MIF de PoTiR27 .....	204
<i>Tabela XVIIIr</i> – Identificação por MIF de PoTiR28 .....	204
<i>Tabela XVIIIs</i> – Identificação por MIF de PoTiR30 .....	204
<i>Tabela XVIIIt</i> – Identificação por MIF de PoTiR35 .....	205
<i>Tabela XVIIIu</i> – Identificação por MIF de PoTiR41 .....	205
<i>Tabela XVIIIa</i> – Identificação por MIF de PoTiR1 .....	206
<i>Tabela XVIIIb</i> – Identificação por MIF de PoTiR3 .....	206
<i>Tabela XVIIIc</i> – Identificação por MIF de PoTiR12 .....	207
<i>Tabela XVIIId</i> – Identificação por MIF de PoTiR17 .....	207
<i>Tabela XVIIIe</i> – Identificação por MIF de PoTiR25 .....	207
<i>Tabela XVIIIf</i> – Identificação por MIF de PoTiR31 .....	208
<i>Tabela XVIIIg</i> – Identificação por MIF de PoTiR32 .....	208
<i>Tabela XVIIIh</i> – Identificação por MIF de PoTiR33 .....	208
<i>Tabela XVIIIi</i> – Identificação por MIF de PoTiR34 .....	209
<i>Tabela XVIIIj</i> – Identificação por MIF de PoTiR36 .....	209
<i>Tabela XVIIIk</i> – Identificação por MIF de PoTiR40 .....	209
<i>Tabela XIXa</i> – Identificação por MIF de PoTiR9 .....	210
<i>Tabela XIXb</i> – Identificação por MIF de PoTiR11 .....	211
<i>Tabela XIXc</i> – Identificação por MIF de PoTiR29 .....	211
<i>Tabela XIXd</i> – Identificação por MIF de PoTiR37 .....	211
<i>Tabela XIXe</i> – Identificação por MIF de PoTiR38 .....	212
<i>Tabela XIXf</i> – Identificação por MIF de PoTiR39 .....	212
<i>Tabela XX</i> – Identificação por MIF de PoTiR42 .....	213
<i>Tabela XXI</i> – Identificação por MIF de PoTiR43 .....	214
<i>Tabela XXII</i> – Identificação por MIF de PoTiR8 .....	214
<i>Tabela XXIII</i> – Títulos obtidos com soros humanos .....	216
<i>Tabela XXIV</i> – Serologia em Doentes com Síndrome Febril Indeterminada e Outras Patologias .....	258
<i>Tabela XXV</i> – Serologia de Indivíduos de Grupos de Risco .....	259
<i>Tabela XXVI</i> – Serologia em Cães do Canil Municipal de Setúbal .....	260
<i>Tabela XXVII</i> – Cinética de Anticorpos em Cães do Canil de Belas .....	262
<i>Tabela XXVIII</i> – Cinética de Anticorpos em Cães do Barreiro .....	262
<i>Tabela XXVIX</i> – Cinética de Anticorpos em Cães de Águas de Moura .....	263
<i>Tabela XXX</i> – Serologia em Micromamíferos da Marateca .....	264
<i>Tabela XXXI</i> – Serologia em Micromamíferos do Monte de Pancas .....	266
<i>Tabela XXXII</i> – Serologia em Micromamíferos do Montemor-o-Velho .....	267