

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

DISSERTAÇÃO

Pesquisa de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em carapatos de vida livre nas mesorregiões Sul Fluminense e Metropolitana do Rio de Janeiro, RJ

GUSTAVO NUNES DE SANTANA CASTRO

2016



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Pesquisa de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. em carapatos de vida livre nas mesorregiões Sul Fluminense e Metropolitana do Rio de Janeiro, RJ

GUSTAVO NUNES DE SANTANA CASTRO

*Sob Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca*

*E Co-Orientação da Doutora
Andrea Kill Silveira*

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Março de 2016

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C355p Castro, Gustavo Nunes de Santana, 1991-
Pesquisa de Rickettsia spp., Ehrlichia spp. e
Anaplasma spp. em carrapatos de vida livre nas
mesorregiões Sul Fluminense e Metropolitana do Rio de
Janeiro, RJ / Gustavo Nunes de Santana Castro. - 2016.
45 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.
Coorientadora: Andréa Kill Oliveira.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias, 2016.

1. Parasitologia Veterinária. 2. Doenças
Transmitidas por Carrapatos. 3. Hemoparasitoses. I.
Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-, orient. II.
Oliveira , Andréa Kill, 1980-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso
de Pós Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

GUSTAVO NUNES DE SANTANA CASTRO

Requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós
Pós-graduação em Ciências Veterinárias,

TESE APROVADA EM 03/03/2016


ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA, Dr. UFRRJ-RJ
(Presidente da Banca)

Nathalie Costa da Cunha
NATHALIE DA COSTA CUNHA, Dr. UFF-RJ

Daniel S. Guedes Jr.
DANIEL DA SILVA GUEDES JÚNIOR, Dr. FIOCRUZ-RJ

Enquanto a nossa meta não for atingida
Continuamos gritando o nosso canto (...)
O amanhã tá breve”

Elis Regina

Dedico este trabalho aos meus pais, Edna e Jorge,
aos meus irmãos Jorge, Anderson, André e Tássia,
aos meus sobrinhos Mateus e Maria Beatriz,
aos meus avós Iracy, Amália e Edgar,
à minha noiva Nathany, e aos meus preciosíssimos amigos,
por todo apoio, carinho e presença ao longo de toda esta caminhada.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Força Soberana, que sempre esteve ao meu lado, me defendendo; dentro de mim, me guardando; diante de mim, me conduzindo; atrás de mim, me guardando e acima de mim, me abençoando.

Ao professor Adivaldo Henrique da Fonseca, pela orientação, amizade e por toda sabedoria, serenidade. Por ser um exemplo de profissional a ser seguido.

À doutora Andrea Kill Silveira, pela co-orientação, pelos ensinamentos, ajuda e discussões sobre o plano de trabalho.

Ao professor Adevair Henrique da Fonseca, por ceder o material biológico utilizado, além de se disponibilizar para ajudar no desenvolvimento do projeto.

Ao doutor Matheus Dias Cordeiro, pela amizade e por toda ajuda prestada desde 2010, momento em que ingressei no Laboratório de Doenças Parasitárias.

À minha amiga de longa data, Priscilla Nunes dos Santos, pelos conselhos, ajudas e por estar sempre presente ao longo da minha jornada.

À discente de graduação Laura Ribeiro, por participar ativamente de todo o processamento das amostras, sendo de importância salutar para a obtenção dos dados.

À mestre Iwine Joyce Faria, por identificar parcialmente as ninfas analisadas neste trabalho.

Aos demais amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, Adlilton de Oliveira, Bruna Baêta, Bruna Land, Carla Uzêdo, Carolina Marotta, Jaqueline Valim, Jenevaldo da Silva, Márcio Cepeda, Michelle Silva, Patrícia Cepeda, Paulo Cesar, Rafaela Câmara e Vanessa Raia, pelas excelentes discussões, intenso companheirismo e apoio irrestrito para o curso do meu projeto.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular, professor Douglas McIntosh, Tássia Furtado e João Petrucelli, por toda ajuda e orientação prestada.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo suporte financeiro.

BIOGRAFIA

GUSTAVO NUNES DE SANTANA CASTRO, filho de **Jorge João dos Santos Castro e Edna Nunes de Santana Castro**, nascido na cidade de Duque de Caxias, estado do Rio de Janeiro.

Em 1998 iniciou o ensino fundamental na Escola Estadual Manoel Joaquim Salgueiro, cidade de Duque de Caxias, sendo transferido ao término do primeiro segmento, no ano de 2002, para o Colégio Estadual Professor José de Souza Herdy para concluir o Ensino Fundamental.

No ano de 2006 ingressou no Colégio Pedro II para o curso do Ensino Médio, finalizando em 2008. Durante o período foi estagiário de Programa de Iniciação Científica Jr (PIBIC Jr.) das instituições Colégio Pedro II e Museu Nacional-UFRRJ, desenvolvendo pesquisas em Plantas Medicinais e Aromáticas/Manejo e Recuperação de Solos e Anatomia Vegetal, respectivamente.

Em 2009 ingressou na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no curso de Bacharel em Medicina Veterinária, graduando-se em 2014. Durante a graduação foi bolsista de Iniciação Científica-CNPq, durante 2 anos consecutivos, pesquisando assuntos relacionados a hematozoários e vetores em animais domésticos e silvestres. Sendo também monitor das disciplinas de Bioquímica geral e Doenças Parasitárias.

Iniciou o curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias em março de 2014.

RESUMO

Os carapatos, em sua maioria, são artrópodes ectoparasitas obrigatórios, sendo importantes veiculadores de agentes patogênicos, dentre estes, vírus, bactérias, protozoários e helmintos. O presente estudo teve como objetivo identificar a presença de bactérias dos gêneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* em carapatos de vida livre coletados em cinco áreas, localizadas nas mesorregiões Sul Fluminense e Metropolitana do Rio de Janeiro. A pesquisa foi conduzida no *campus* Seropédica da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Floresta Nacional Mario Xavier, ambos no município de Seropédica; Parque Nacional do Itatiaia, em Itatiaia; Depósito Central de Munição em Paracambi; e Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia, município de Mangaratiba. Nas coletas foram utilizadas arrasto de flanela, armadilha química de CO₂ e catação manual sobre as vestes e corpo dos pesquisadores. Os carapatos coletados foram identificados e submetidos a PCR para *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. Foram coletados 14.469 espécimes de carapatos em todas as áreas pesquisadas. Foram selecionados 9.353 carapatos para análise, sendo distribuídos em 372 pools, de acordo com a classificação taxonômica, estádio evolutivo, área e ano de coleta. Esse total é composto por 7.273 larvas de *Amblyomma*, 1 larva de *R. (B.) microplus*, 1.952 ninfas de *Amblyomma*, 120 adultos de *A. sculptum*, 4 adultos de *A. brasiliense* e 3 adultos de *A. dubitatum*. Destes pools, apenas 2 foram positivos na triagem, sendo um pool composto por 3 larvas de *Amblyomma* spp. coletados na Floresta Nacional Mario Xavier, e o outro pool de 20 ninfas de *A. sculptum* coletados no local denominado praia do Sino localizado na Ilha da Marambaia. A análise dos dados através do método PCR-RFLP indicou que as bandas verificadas na análise são de *Rickettsia bellii*. A positividade para *R. bellii* encontrada no presente estudo foi de 0,25%. Com esse resultado foi possível verificar que ocorre a circulação de *Rickettsia* em duas áreas de coleta. Em ambas as áreas em que se encontrou circulação de *R. bellii*, existia a presença de capivaras e equinos. A pesquisa molecular para os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* revelou resultados negativos para ambos os gêneros. A ocorrência e a distribuição de carapatos observadas, neste estudo, podem ser atribuídas à composição da cobertura vegetal, às condições ambientais e à atividade dos hospedeiros, estão relacionadas às diferentes ações antrópicas exercidas em cada ponto de coleta, ao longo do estudo.

Palavras-chave: Ixodídeos, Rickettsiales, *Rickettsia bellii*.

ABSTRACT

Ticks are arthropods, mostly obligate ectoparasites, and important pathogens vectors, including viruses, bacteria, protozoa and helminths. This study aimed to identify bacteria of the *Rickettsia*, *Ehrlichia* and *Anaplasma* genus in free-living ticks. The research was conducted in five area located in mesoregions Sul Fluminense and Metropolitana do Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, National Forest Mario Xavier, both in Seropedica; Itatiaia National Park in Itatiaia; Ammunition Deposit Center in Paracambi; and Training Center of Marambaia Island in Mangaratiba. During the collections drag flannel, chemical trap CO₂ and manual scavenging on the clothes and researchers' body were used. The collected ticks were identified and subjected to PCR for *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp. and *Anaplasma* spp. 14,469 samples of ticks were collected in all the surveyed areas. 9,353 ticks were selected to analysis, and distributed in 372 pools, according to taxonomic classification, evolutionary stage, area, and year of collection. This total consists of 7,273 larvae of *Amblyomma*, 1 larvae of *R. (B.) microplus*, 1,952 of *Amblyomma* nymphs, 120 adults of *A. sculptum*, 4 adults of *A. brasiliense*, and 3 adults of *A. dubitatum*. Among these pools, only two were positive in the screening, one pool being composed of three larvae of *Amblyomma* spp. collected in the National Forest Mario Xavier and the other pool of 20 nymphs of *A. sculptum* collected on a place called Sino's beach located in the Island of Marambaia. Data analysis by PCR-RFLP showed that the bands observed in the analysis are *Rickettsia bellii*. The positivity to *R. bellii* found in this study is 0.25%. With this result, is possible to confirm that there is *Rickettsia* circulation in two areas of collection. In both areas which *R. bellii* circulation was found, there was a presence of capybaras and horses. The molecular search for *Ehrlichia* and *Anaplasma* genus revealed negative results for both genus. The occurrence and distribution of ticks observed in this study can be attributed to the environmental conditions, composition of vegetation, and vertebrate hosts' activity; these are related to the different human activities conducted in each collection point throughout the study.

Key words: Ixodides, Rickettsiales, *Rickettsia bellii*.

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Vista parcial da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, do Campus de Seropédica, RJ. Em destaque, os pontos de coletas. Fonte: SILVEIRA; FONSECA, 2011.	09
Figura 2. Vista parcial da Floresta Nacional Mário Xavier, Seropédica, RJ. Em destaque os pontos de coletas. Fonte: GOOGLE EARTH (2013).	10
Figura 3. Vista parcial do Parque Nacional do Itatiaia. Em destaque, os pontos de coletas, Itatiaia, RJ. Fonte: SILVEIRA; FONSECA, 2011.	11
Figura 4. Vista parcial do Depósito Central de Munições do Exército Brasileiro. Em destaque os pontos de coletas, Seropédica, RJ. Fonte: SILVEIRA; FONSECA, 2011.	11
Figura 5. Vista parcial do Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia da Marinha do Brasil. Em destaque os pontos de coletas, Mangaratiba, RJ. Fonte: SILVEIRA; FONSECA, 2011.	12
Figura 6. Técnicas de armadilha de CO ₂ , à esquerda, e arrasto, à direita. Fonte: CASTRO, 2015.	13
Figura 7. Análise do produto da PCR para amplificação de DNA de <i>Rickettsia</i> spp. em carapato. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio.	21
Figura 8. Análise de gel com padrões de banda de PCR-RFLP produzidos por HindIII, MspI e RspI na digestão de amplicons de 17kDa e gltA. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.	22

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Carrapatos separados por estádio evolutivo, gênero, espécie e ano de coleta, coletados entre outubro de 2008 e agosto de 2012, em cinco áreas institucionais, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.	19
Tabela 2. Carrapatos analisados por biologia molecular, separados por estádio evolutivo, gênero, espécie e sexo, coletados entre outubro de 2009 e agosto de 2011, em cinco áreas institucionais, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.	20

LISTA DE ABREVIASÕES

UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
PESAGRO	Empresa de Pesquisa Agropecuária do Estado do Rio de Janeiro
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FLONA	Floresta Nacional Mário Xavier
CETAS-RJ	Centro de Triagem de Animais Silvestres – Rio de Janeiro
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
PNI	Parque Nacional do Itatiaia
DCMun	Depósito Central de Munição
CADIM	Centro de Adestramento da Ilha da Marambaia
CO ₂	Gás carbônico
TE	Tampão de Extração
DNA	Ácido desoxirribonucleico
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
Pb	Pares de bases
RFLP	Polimorfismos dos sítios de restrição
FMB	Febre Maculosa Brasileira
GFM	Grupo da Febre Maculosa
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SUMÁRIO

	Pág.
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	02
2.1 Carapatos – biologia e importância epidemiológica.....	02
2.2 Gênero <i>Rickettsia</i>	04
2.3 Gênero <i>Ehrlichia</i>	05
2.4 Gênero <i>Anaplasma</i>	07
2.5 Diagnóstico laboratorial das rickettsioses e anaplasmoses.....	08
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	09
3.1 Áreas de Estudo.....	09
3.2 Metodologia de coleta de carapatos.....	12
3.3 Extração de ácidos nucleicos dos carapatos.....	14
3.4 Análises moleculares para os gêneros <i>Rickettsia</i> , <i>Anaplasma</i> e <i>Ehrlichia</i>	14
3.4.1 <i>Rickettsia</i> spp.	14
3.4.1.1 PCR convencional.....	15
3.4.1.2 PCR-RFLP.....	16
3.4.2 <i>Ehrlichia</i> spp.	17
3.4.3 <i>Anaplasma</i> spp.	18
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
5. CONCLUSÕES.....	26
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

1. INTRODUÇÃO

O Rio de Janeiro é um dos estados mais visitados do Brasil, seja pelo seu desenvolvimento econômico, visto que já foi a capital federal, seja por suas belezas naturais. Nesse contexto, sua capital sedia eventos nacionais e internacionais de grande renome, como foi a Copa do Mundo de 2014 e serão as Olimpíadas de 2016. Tais eventos trazem ao estado milhares de pessoas, e muitas destas, além de participar dos eventos esportivos, realizam também o ecoturismo, visto que a natureza exuberante do Rio de Janeiro é apreciada em todo mundo.

Além da natureza turística, sabe-se que existem outros perfis de contato com a natureza, por exemplo o trabalho rural, em que o ser humano está intimamente ligado com o solo, vegetais, animais, e mesmo atividades militares, cujos treinamentos incluem isolamento em florestas e matas.

Neste contexto é imperativo que profissionais de Saúde Pública investiguem ativamente a importância e capacidade de transmissão de artrópodes vetores, para que seja conhecido o possível grau de risco associado ao contato com áreas silvestres e rurais.

Com relação à transmissão de bioagentes aos seres humanos, tem-se ciência que os mosquitos são os mais importantes, seguidos dos carapatos; Por outro lado, os carapatos são transmissores da maior variedade de agentes patogênicos para os animais.

O presente estudo teve como objetivo identificar a presença de bactérias dos gêneros *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* em carapatos de vida livre coletados em cinco áreas, localizadas nas mesorregiões Sul Fluminense e Metropolitana do Rio de Janeiro, RJ.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carrapatos – biologia e importância epidemiológica

Os carrapatos, em sua maioria, são artrópodes ectoparasitas obrigatórios, de hábitos hematófagos em pelo menos um estádio evolutivo. A hematofagia é importante para que seu ciclo biológico seja completado, uma vez que o sangue possui elementos importantes para a maturação de ovos (LIU; BONNET, 2014).

O ciclo de vida da maioria dos carrapatos é compreendido por uma fase de vida parasitária, em que o ectoparasito está fixado ao hospedeiro, realizando o repasto sanguíneo, e uma fase de vida livre, que compreende os períodos de oviposição e mudas (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006). O ciclo biológico da maioria dos ixodídeos consiste de um estágio inativo (ovos) e três estágios móveis e hematófagos (larva, ninfa e adulto). As larvas são caracterizadas por não apresentarem estigmas respiratórios, além de serem sexualmente imaturas. Após ecdise dão origem às ninfas, que possuem anatomia semelhante à dos adultos, por exemplo quatro pares de patas, porém com placas espiraculares. Os carrapatos adultos possuem maturidade sexual, diferente das ninfas, e quatro pares de pernas (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006; ANDERSON; MAGNARELLI, 2008).

Os carrapatos são classificados em 3 famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (GUGLIELMONE et al., 2010). A família Ixodidae alberga os espécimes de maior importância econômica e sanitária, a característica principal da família é a presença de um escudo dorsal rígido, formado por quitina, que em fêmeas adultas se restringe apenas a uma parte do idiossoma, com o intuito de possibilitar que a mesma consiga dilatar seu corpo durante o repasto sanguíneo (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

Originalmente os carrapatos são ectoparasitos de animais silvestres, e são extremamente importantes para a manutenção de microrganismos, patogênicos ou não. Relata-se a circulação de agentes etiológicos de zoonoses em pequenos mamíferos silvestres, implicando-os na manutenção destes microrganismos na natureza e na infecção de populações de carrapatos (QUINTERO et al., 2013). A relação vetor (carrapato), patógenos e hospedeiros silvestres tende a ser equilibrada, sendo esse equilíbrio quebrado com ações antrópicas, como desmatamento, ocupações indevidas, introdução de animais domésticos, dentre outros. Tais atitudes quebram a harmonia ecológica e expõe o ser humano e os animais domésticos ao contato com carrapatos

potencialmente infectados, além de uma infinidade de outros patógenos (OGRZEWALSKA et al., 2011; ESTRADA-PEÑA et al., 2014).

Os carapatos são importantes veiculadores de agentes patogênicos, dentre estes, vírus, bactérias, protozoários e helmintos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; OTRANTO et al., 2014). Eles têm características importantes que os qualificam como excelentes vetores, uma destas é o período de fixação no hospedeiro, que geralmente dura horas ou mesmo dias. A ocorrência de transmissão transestadial e transovariana de muitos microrganismos tornam os carapatos excelentes reservatórios de patógenos, como por exemplo rickettsias, que podem ser mantidas na natureza, mesmo na ausência de hospedeiros vertebrados, por várias gerações (STICH et al., 2008; MORAES-FILHO et al., 2015).

Outra característica é a promiscuidade de hospedeiros que algumas espécies têm, principalmente, quando em estádios imaturos (PEREZ et al., 2008). Tal hábito alimentar pode culminar no contato com diversos agentes etiológicos e transmiti-los para diversas espécies de vertebrados (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006; GUGLIELMONE et al., 2006; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; McCOY; LÉGER; DIETRICH, 2013). É relevante citar que além dos hábitos alimentares, existem outros fatores intrínsecos aos carapatos, que os tornam capacitados a adquirir e/ou transmitir (ou mesmo inibir) agentes patogênicos, dentre outros estão proteínas da saliva, anticoagulantes e defensinas (LIU; BONNET, 2014).

Carapatos dos gêneros *Argas*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* já foram descritos parasitando seres humanos (GUGLIELMONE et al., 2006; OTRANTO et al., 2014). Ao pesquisar a presença de hemoparasitos, os mesmos autores detectaram organismos dos gêneros *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Borrelia* e *Babesia*, reiterando assim a importância destes ácaros como vetores de importantes zoonoses.

Amblyomma sculptum, conhecido como carapato estrela, possui baixa especificidade parasitária principalmente em estádios imaturos (chamados popularmente de micuim e vermelhinho), podendo parasitar diversos animais, inclusive o ser humano, já na fase adulta tem preferência por animais de médio e grande porte, como capivaras e equinos (GUGLIELMONE et al., 2006). A espécie ocorre nas regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul do Brasil, além de estar presente no Paraguai e na Argentina (NAVA et al., 2014).

Amblyomma brasiliense já foi descrito no sudeste e sul do Brasil, além de Argentina e Paraguai. Assim como *A. sculptum*, seus estádios imaturos são promíscuos, estão entre os

carapatos mais agressivos para os seres humanos no Brasil, contudo o carapato adulto, diferentemente do *A. sculptum*, tem preferência por mamíferos de pequeno e médio porte, como pacas e cutias (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006; GUGLIELMONE et al., 2006; SANCHES et al., 2008; SZABÓ et al., 2006).

Amblyomma dubitatum foi descrito no Cerrado, Floresta Atlântica, Floresta do Paraná e Floresta *Araucaria angustifolia*, também tem ocorrência no Uruguai. Todos os estádios evolutivos têm preferência pela capivara. Mesmo não sendo tão agressivo quanto o *A. sculptum*, *A. dubitatum* também pode parasitar os seres humanos, e participar da transmissão de hemoparasitos (SZABÓ et al., 2013).

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um carapato monoxêno, exótico, que tem preferência pelo bovino, sendo por isso chamado popularmente de carapato do boi, contudo já foi descrito seu parasitismo em diversas espécies, como caninos (ZHANG et al., 2012), equinos (LABRUNA et al., 2001), roedores (NATEGHPOUR et al., 2013) e humanos (GUGLIELMONE et al., 2006).

2.2 Gênero *Rickettsia*

O gênero *Rickettsia*, pertencente à família Rickettsiaceae, é composto por bactérias gram-negativas, sendo classificado em 5 principais grupos: o Grupo Tifo, que comprehende as espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, associadas a piolhos e pulgas, respectivamente; o Grupo da Febre Maculosa (GFM), composto por mais de 20 espécies,

estando a grande maioria associada a carapatos; o Grupo de *Rickettsia bellii*, em que se encontra, além de *R. bellii* outras rickettsias simbiontes; o Grupo de *Rickettsia canadensis*, em

que se encontra apenas *R. canadensis*; e o Grupo de Outras Rickettsias, sendo presentes os demais microrganismos classificados como do gênero *Rickettsia* (MERHEJ; RAOULT, 2011).

Na América Latina, existem aproximadamente 13 espécies de rickettsias descritas, e dentre todas *R. bellii* é encontrada no maior número de espécies de carapatos (LABRUNA et al., 2007a), a saber: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma sculptum* (complexo *A. cajennense*), *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma neumannii*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculpturatum*, *Amblyomma tigrinum*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Ixodes loricatus* (LABRUNA et al., 2004b; PACHECO et al., 2009; LABRUNA et al., 2011; LOPES

et al., 2014; MOURA-MARTINIANO et al., 2014; McINTOSH et al., 2015), enquanto que na América Central, *R. bellii* foi encontrada em 4 carapatos da espécie *Amblyomma sabanerae*, fixados num quelônio (*Kinosternon* sp.) (BARBIERI; ROMERO; LABRUNA, 2012).

A transmissão destas rickettsias entre os mamíferos se dá principalmente através da picada de carapatos, sendo o gênero *Amblyomma* os mais importantes no Brasil (BRITES-NETO et al., 2013; KRAWCZAK et al., 2014; NUNES et al., 2015). Animais silvestres, como a capivara, e domésticos, como o canino e o equino, são importantes na epidemiologia das rickettsioses, atuando como hospedeiros do carapato vetor, amplificadores das rickettsias e sentinelas (SANGIONI et al., 2005; PACHECO et al., 2007; MIRANDA et al., 2011; CORDEIRO et al., 2015a; CORDEIRO et al., 2015b; SOUZA, PINTER, DONALISIO, 2015). Um outro fator relevante na epidemiologia das rickettsioses são as espécies de *Rickettsia* circulantes, uma vez que mesmo rickettsias de patogenicidade desconhecidas podem interferir na aquisição, estabilização e transmissão de rickettsias sabidamente patogênicas pelo carapato vetor. (BURGDORFER; HAYES; MAVRO, 1981; MACALUSO et al., 2002).

O ser humano é suscetível a rickettsioses, e uma das mais importantes é a Febre Maculosa Brasileira, causada por uma bactéria do gênero *Rickettsia* (*Rickettsia rickettsii*), transmitida principalmente por carapatos do gênero *Amblyomma*, caracterizando-se por ter início abrupto, com febre elevada, cefaleia e mialgia intensa e/ou prostração, seguida de exantema máculo-papular, predominantemente nas regiões palmar e plantar, que pode evoluir para petequias, equimoses e hemorragias, com elevada taxa de letalidade (GUEDES et al., 2011; PAROLA et al., 2013; OTEO et al., 2014; SOUZA, PINTER, DONALISIO, 2015). *R. rickettsii* também é patogênica para o carapato vetor, o que faz com que sua prevalência em pesquisas acarológicas seja baixa (SOARES et al., 2012).

2.3 Gênero *Ehrlichia*

O gênero *Ehrlichia* pertence à família Anaplasmataceae, da ordem Rickettsiales (DUMLER et al., 2001), é composto por bactérias gram-negativas, pleomórficas, intracelulares obrigatórias. O gênero é atualmente composto por 6 espécies: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia chaffeensis*, *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia muris*, *Ehrlichia ruminantium* e *Ehrlichia mineirensis* (CRUZ et al., 2012).

O organismo foi descrito pela primeira vez em cães, na Argélia (DONATIEN; LETOSQUARD, 1935). No Brasil, o primeiro relato data de 1973, e o agente foi encontrado em caninos, na cidade de Belo Horizonte, MG (COSTA et al., 1973). No Estado de Minas Gerais também se descreveu a sexta espécie de *Ehrlichia*, denominada *Ehrlichia mineirensis*, isolada do carapato do boi, *R. (B.) microplus* (CRUZ et al., 2012).

A transmissão dos organismos do gênero *Ehrlichia* se dá pela picada do carapato vetor infectado, o que culmina na epidemiologia dos casos, mais frequentes em regiões tropicais e subtropicais (ANDEREG; PASSOS, 1999; OTEO et al., 2014; PESQUERA et al., 2015).

O gênero *Ehrlichia* é responsável por doenças em seres humanos e animais. *Ehrlichia canis* é o agente etiológico da Erliquiose Monocítica Canina (DONATIEN; LESTOQUARD, 1935), cujo principal vetor é o carapato *Rhipicephalus sanguineus*. A doença é polissistêmica, e o animal pode apresentar alterações inespecíficas, como febre, secreção ocular, anorexia, perda de peso, linfadenopatia, sinais neurológicos, oculares, poliartrite (BELLAH; SHULL; SELCER, 1986). *Ehrlichia ewingii* é o agente etiológico da Erliquiose Granulocítica Canina, cujos principais vetores são o *Amblyomma americanum* e o *Otobius megnini*. O quadro clínico envolve claudicação, edema articular, trombocitopenia. Os seres humanos também podem se infectar com erlíquias; o agente etiológico é bastante semelhante a *E. canis* (MAEDA et al., 1987; FISHBEIN et al. 1987), sendo o quadro clínico caracterizado como doença febril associada a mialgia, fraqueza e confusão mental.

A Erliquiose Monocítica Humana, transmitida principalmente por carapatos dos gêneros *Amblyomma*, *Haemophysalis*, *Ixodes* e *Dermacentor*, cujo agente etiológico é *Ehrlichia chaffeensis*, é uma doença severa, em que 42% dos casos clínicos exigem hospitalização, cuja taxa de mortalidade gira em torno de 3% (ISMAIL; BLOCH; McBRIDE, 2010). Os aspectos clínicos incluem falência cardiovascular, meningite asséptica, hemorragia, insuficiência hepática, pneumonia intersticial, dentre outros (ISMAIL; BLOCH; McBRIDE, 2010). Já a Ehrlichiose Ewingii Humana, cujo agente etiológico é *Ehrlichia ewingii*, tem aspectos clínicos mais brandos, sendo mais importante em pessoas imunocomprometidas (ISMAIL; BLOCH; McBRIDE, 2010); os vetores desta zoonose são os mesmos da Erliquiose Monocítica Humana.

2.4 Gênero *Anaplasma*

O gênero *Anaplasma*, atualmente, abriga 5 espécies: *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma marginale* (e *A. marginale* subsp. *centrale*), *Anaplasma bovis* e *Anaplasma ovis* (RYMASZEWSKA; GRENDÁ, 2008). *Anaplasma phagocytophilum* é o agente etiológico da Anaplasmose Granulocítica Humana, além de causar quadros patogênicos em cães (Anaplasmose Granulocítica Canina), equinos (Anaplasmose Granulocítica Equina) e em bovinos (febre do carapato). *Anaplasma platys* infecta plaquetas, culminando na trombocitopenia cíclica canina, e *A. bovis*, *A. ovis* e *A. marginale* infectam eritrócitos de ruminantes domésticos e selvagens, culminando em quadros febris e hematológicos (RYMASZEWSKA; GRENDÁ, 2008).

Os carapatos dos gêneros *Amblyomma*, *Haemophysalis*, *Ixodes* e *Dermacentor* são os principais vetores biológicos destes agentes entre os animais, e assumem importância epidemiológica na transmissão aos seres humanos (RYMASZEWSKA; GRENDÁ, 2008; PESQUERA et al., 2015).

Casos de febre do carapato em ruminantes domésticos, na Europa, são relatados desde 1780. Um século e meio adiante, descreveu-se o gene etiológico como *Ehrlichia phagocytophila* (atualmente denominado *A. phagocytophilum*) (JENKINS et al., 2001). Já a primeira descrição de *A. marginale* ocorreu em 1894, quando Salmon e Smith detectaram a presença de inclusões em eritrócitos de bovinos. A descrição completa foi feita pelo Sir. Arnold Theiler, em 1910 (KOCAN et al., 2003).

Anaplasma phagocytophilum tem distribuição cosmopolita (ALLISON; LITTLE, 2013), e é agente patogênico para diversas espécies animais, incluindo o ser humano (ATIF, 2015). Com relação à infecção em caninos, observam-se alterações clínicas e hematológicas, como letargia, lesões dermatológicas e trombocitopenia (SANTOS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2015). As manifestações clínicas em seres humanos variam de um quadro febril autolimitado a infecções fatais. Os pacientes geralmente apresentam sintomas não específicos, como febre, dor de cabeça, mialgia e mal estar (STUEN et al., 2013).

A. phagocytophilum foi encontrado em *R. sanguineus* e *A. sculptum* (SANTOS et al., 2013) tais carapatos parasitam animais domésticos, preferencialmente o canino e o equino, respectivamente, mas podem parasitar o ser humano (SZABÓ et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2014), aumentando assim o risco de transmissão desta importante zoonose. Existe

circulação de anticorpos anti-*A. phagocytophilum* em equinos (SALVAGNI et al., 2010), apontando a relevância dessa espécie na epidemiologia desta importante zoonose. Profissões que lidam com ambientes naturais, como jardinagem e ecoturismo expõem o ser humano ao contato com o agente; seres humanos com quadros de imunodeficiência, como portadores de HIV, em tratamentos de câncer ou transplantados, se encontram em situação de risco (ATIF, 2015).

2.5 Diagnóstico laboratorial das rickettsioses e anaplasmoses

Além do diagnóstico clínico, associado à epidemiologia, existem ferramentas diagnósticas laboratoriais, com técnicas de microscopia direta, sorológicas, de cultivo e moleculares (ALLISON; LITTLE, 2013).

A detecção de organismos da ordem Rickettsiales em artrópodes vetores é de grande importância nos estudos epidemiológicos e nas estratégias de controle. Esta detecção pode ser realizada com o uso de ferramentas moleculares, como a PCR, por meio de iniciadores oligonucleotídeos específicos promovendo a detecção e identificação de rickettsias patogênicas em vetores infectados. Genes de interesse nestes tipos de estudos são o gene *htrA* codificador de um antígeno de 17 kilodalton (*17-kDa*), que é uma proteína de superfície, comum às rickettsias do grupo do tifo e da febre maculosa, o *gltA*, *ompA* e *ompB*, 16S rDNA, groESL, MSP2, MSP4, *dsb* e VLPT (de comprimento variável-alvo PCR) (ANDERSON et al., 1987; AZAD et al., 1990; WEBB et al., 1990; MASSUNG et al., 1998; LABRUNA et al., 2004a; ALLISON; LITTLE, 2013; AGUIAR et al., 2014).

No Brasil, a identificação molecular de *R. rickettsii* foi procedida em carapatos por diversos pesquisadores, dentre estes em carapatos da espécie *A. sculptum* (complexo *A. cajennense*) coletados em pastagens e animais (GUEDES et al., 2005; CARDOSO et al., 2006), em *R. sanguineus* coletados em cães (CUNHA et al., 2009), e em *Haemaphysalis leporisalustris* alimentados em coelhos (FREITAS et al., 2009). Experimentalmente foi possível verificar que capivaras atuam como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* para *A. sculptum* (complexo *A. cajennense*) (SOUZA et al., 2009). Outras pesquisas diagnosticaram a presença de *Ehrlichia* e *Anaplasma* em carapatos, incluindo espécies de caráter zoonótico, como *E. ewingii* e *A. phagocytophilum* (LEE et al., 2014; MAYS et al., 2014; WRIGHT et al., 2014; MICHELET et al., 2014; PROBOSTE et al., 2015).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Áreas de Estudo

A pesquisa foi desenvolvida a partir dos dados referentes a coletas de carapatos ixodídeos realizadas no Estado do Rio de Janeiro, durante o período de outubro/2009 a agosto/2011 (SILVEIRA; FONSECA, 2013).

As coletas no Parque Nacional do Itatiaia e na Floresta Nacional Mario Xavier foram autorizadas pelo SISBIO: 16622-1, emitido em 22/07/2008. As atividades nas áreas militares, Marinha do Brasil e Exército Brasileiro foram autorizadas pelos seus respectivos comandos. A cada estação do ano foi realizada, em diferentes horários, uma coleta em seis pontos fixos de cinco áreas amostrais distintas, a saber:

Área 1: UFRRJ Campus Seropédica/PESAGRO/EMBRAPA – Caracterizada pela presença de discentes de graduação, pós-graduação, docentes e técnicos administrativos, localizada no Km 47 da BR 465, município de Seropédica, no estado do Rio de Janeiro. O tipo de vegetação é secundária, sendo presente pastagens, capoeiras, além de fragmentos de mata, composta por espécies nativas e introduzidas (FIGURA 1). O Setor de Zootecnia tem ainda a produção de bovinos, caprinos e aves, o que propicia a imposição de modelos epidemiológicos intimamente relacionados a monoculturas, como por exemplo, a predominância do carapato do boi, *R. (B.) microplus*. Existe ainda a circulação de animais silvestres, como o quero-quero (*Vanellus chilensis*), o gambá (*Didelphis aurita*) e a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (SILVEIRA; FONSECA, 2011).



Figura 1: Vista parcial da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, do Campus de Seropédica, RJ. Em destaque, os pontos de coletas. Fonte: SILVEIRA; FONSECA, 2011.

Área 2: A FLONA, também localizada no município de Seropédica-RJ, fica localizada às margens da BR 465, 3,5km. A área abriga loteamentos urbanos e o CETAS-RJ, este alberga espécimes de animais silvestres e exóticos capturados pelo IBAMA e por outras entidades públicas e privadas (FIGURA 2). Existe ainda circulação de animais silvestres de vida livre, como pequenos mamíferos, capivaras, répteis aves e animais domésticos introduzidos pela população local, como caninos, equinos, bovinos e aves (SILVEIRA; FONSECA, 2011).



Figura 2: Vista parcial da Floresta Nacional Mário Xavier, Seropédica, RJ. Em destaque os pontos de coletas. Fonte: GOOGLE EARTH (2013).

Área 3: O PNI é uma área de proteção ambiental, cuja movimentação turística gira em torno de 100.000 visitantes/ano. Localizada predominantemente no Estado do Rio de Janeiro, mas com parcela abrigada pelo Estado de Minas Gerais (FIGURA 3). Uma das características do Parque é sua variação em altitude, o que tem como consequência, variação nas características eco-epidemiológicas do Parque como um todo. Nas áreas abaixo de 1100m de altitude, se observa fragmentos de florestas secundárias, esta é a área de maior visitação pública. Nas áreas acima de 1100 m de altitude, se observa a presença de espécies endêmicas do Parque, além de espécies ameaçadas de extinção (SANTOS; ZIKAN, 2000).



Figura 3: Vista parcial do Parque Nacional do Itatiaia. Em destaque, os pontos de coletas, Itatiaia, RJ. Fonte: SILVEIRA; FONSECA, 2011.

Área 4: O DCMun é uma unidade do Exército Brasileiro, situada no município de Paracambi-RJ. Localiza-se na rodovia RJ-127, km 6, margeado pelo rio Ribeirão das Lages e contornado por serras. O tipo de vegetação é secundário, e observa-se a presença de pastagens (FIGURA 4). Com relação à fauna, existe circulação de animais silvestres, como pequenos e médios mamíferos, aves, répteis, além de animais domésticos, como caninos, equinos e bovinos. O DCMun é frequentado, predominantemente, por militares de carreira, lotados na própria unidade e de outros batalhões, e recebe anualmente duas turmas de recrutas, com o intuito de realizar treinamento de campo e circulam nas áreas de pastagens e matas (SILVEIRA; FONSECA, 2011).



Figura 4: Vista parcial do Depósito Central de Munições do Exército Brasileiro. Em destaque os pontos de coletas, Seropédica, RJ. Fonte: SILVEIRA; FONSECA, 2011.

Área 5: O CADIM é uma região que se encontra no município de Mangaratiba, tendo a oeste a Ilha da Marambaia, a leste um cordão arenoso que liga a região ao continente, ao norte a Baía de Sepetiba e ao sul o Oceano Atlântico (MENEZES; ARAUJO, 2005) (FIGURA 5). A vegetação característica da área engloba mata atlântica, manguezais, restingas. Na área é possível se observar animais domésticos, como caninos, equinos e aves, e silvestres, como pequenos roedores, marsupiais, primatas, aves e répteis. A Ilha da Marambaia é ocupada por população local e pela Marinha do Brasil. As Forças Armadas também utilizam a região para treinamento militar do seu corpo técnico (SILVEIRA; FONSECA, 2011).



Figura 5: Vista parcial do Centro de Avaliação da Ilha da Marambaia da Marinha do Brasil. Em destaque os pontos de coletas, Mangaratiba, RJ. Fonte: SILVEIRA; FONSECA, 2011.

3.2 Metodologia de coleta de carrapatos

Os 30 pontos amostrais para a coleta de carrapatos foram escolhidos considerando a presença de humanos, animais domésticos e/ou silvestres e de vegetação mista (grama e arbustos). Os carrapatos foram capturados através três técnicas de coleta: armadilha química de CO₂, arrasto de flanela e as roupas dos pesquisadores que participaram das coletas (SILVEIRA; FONSECA, 2011).

A armadilha de CO₂ utilizada foi montada da seguinte forma (SILVEIRA; FONSECA, 2011): Utilizou-se um frasco de acondicionamento de soro fisiológico hospitalar de 500 ml para se colocar o ácido láctico já na diluição prevista, e o ácido foi de encontro ao carbonato de cálcio através de um equipo para infusões endovenosas. O carbonato de cálcio estava em um recipiente plástico, com capacidade de 1,5 L, cuja tampa estava adaptada ao encaixe com a saída do

equipo. As aberturas para saída do CO₂ foram feitas na lateral do pote, com 5 mm de diâmetro e distanciando 1 cm da borda, 4,5 cm entre si. O frasco com ácido lático foi dependurado em uma barra de 1,2 m de altura fixada ao solo pela equipe, enquanto que o pote plástico contendo o carbonato de cálcio foi colocado no centro de uma flanela branca de 1 m² estendida, para que se visualizasse a movimentação dos ixodídeos e se realizasse sua captura manual. Com o intuito de se impedir a fuga dos carapatos, fitas adesivas do tipo dupla-face foram coladas nas extremidades da flanela (FIGURA 6). As armadilhas foram inspecionadas a cada 15 minutos, e a reação aconteceu até o término do carbonato de cálcio e/ou do ácido lático. Em cada coleta, duração aproximada de 2 horas, se utilizou 200 g de carbonato de cálcio e 400 ml de ácido lático.



Figura 6: Técnicas de armadilha de CO₂, à esquerda, e arrasto, à direita. Fonte: CASTRO, 2015.

Além da armadilha de CO₂, uma flanela branca de 1 m², com barras de ferro em suas extremidades (para proporcionar o contato da flanela com o solo), foi arrastada nas áreas adjacentes às que se utilizou a armadilha de CO₂, delimitou-se tal área ao redor das armadilhas de CO₂ nas dimensões 4 x 4 m (FIGURA 6). Sendo assim, a área de abrangência do arrasto girou em torno de 16 m², por ponto de coleta (OLIVEIRA et al., 2000; SILVEIRA; FONSECA, 2011). Os carapatos isolados individualmente foram colocados em seringas descartáveis adaptadas para seu armazenamento, enquanto que as flanelas foram colocadas,

individualmente, em sacos plásticos, para futura catação dos carrapatos em ambiente controlado.

Utilizaram-se chaves específicas para a identificação dos espécimes coletados (ARAGÃO; FONSECA, 1961; BARROS-BATESTI; ARZUA; BECHARA, 2006). Adultos foram identificados até espécie, enquanto que estágios imaturos foram identificados até gênero. As larvas foram separadas em lotes de até no máximo 50 espécimes. As ninfas, em lotes com no máximo 20 e adultos individualmente. Os espécimes foram agrupados de acordo com as áreas de captura, realocados em tubos de polipropileno e congelados a -20°C até a extração de ácidos nucleicos.

3.3 Extração de ácidos nucleicos dos carrapatos

As amostras de carrapatos foram descongeladas, e os carrapatos foram lavados em solução de hipoclorito de sódio 1% por 5 minutos, em seguida foram lavados em solução alcoólica de etanol 70% por 5 minutos e por fim, foram lavados por 3 vezes em HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, larvas e ninfas foram colocadas em novos tubos contendo 50 mg de beads autoclavados, enquanto os adultos foram expostos a 7 esferas de zircônio autoclavadas. Em todos os tubos foi adicionado 200 µL de HBSS sendo então colocado no Mini-Beadbeater por 60 segundos para Trituração. Após a Trituração, adicionou-se 200 µL de Digest buffer 2x, 20 µL de proteinase K e 50 µL de cloreto de cálcio 50 mM. As amostras foram incubadas a 56°C por 3 horas, ao término do tempo, foram centrifugadas por 16000xg por 60 segundos. Deste centrifugado, extraiu-se 400 µL do sobrenadante para um novo tubo, em que foram adicionados 200 µL de HBSS e 600 µL de fenol. Inverteu-se o tubo por 5 vezes, centrifugou-se por 5 minutos a 16000xg e foi aliquotado 550 µL do sobrenadante em novo tubo. Adicionou-se ao novo tubo 550 µL de fenol-clorofórmio, inverteu-se o tubo por 5 vezes, e se centrifugou por 5 minutos a 16000xg. Em seguida, 500 µL do sobrenadante foi aliquotado para outro tubo, e neste se adicionou 500 µL de isopropanol absoluto. Incubou-se a temperatura ambiente por 20 minutos, centrifugou-se por 20 minutos a 16000xg. Observou-se a formação do pellet, e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida adicionou-se 500 µL de etanol 70%, inverteu-se o tubo por 5 vezes, centrifugou-se por 5 minutos a 16000xg e o sobrenadante foi desprezado. Sendo tal processo repetido mais uma vez. Incubou-se o material, com a tampa aberta, a 70°C por 5 minutos, com o intuito de

proporcionar a evaporação do álcool. Adicionou-se então 50 µL de TE 1x, e incubou-se o material por uma hora a 65°C, e o material foi então congelado a -20°C até as análises moleculares (SANTOLIN; FAMADAS; McINTOSH, 2013).

3.4 Análises moleculares para os gêneros *Rickettsia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia*

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à técnica de PCR e eletroforese no Laboratório de Doenças Parasitárias e no Laboratório Multi-Usuário de Biologia Molecular na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

3.4.1 *Rickettsia* spp.

3.4.1.1 PCR convencional

A composição do mix se fez da seguinte forma: 7,6 µL de H₂O ultrapura, 1,25 µL de tampão “buffer” 10 X (Life Technology®), 0,625 µL de MgCl₂ (50 mM) (Life Technology®), nucleotídeos trifosfatados (Dntp 1,25 mM) (Sinapse ®) 1 µL, primers 1 µL, Taq polimerase 0,075 (Life Technology®) e 1 µL do DNA extraído. Para a amplificação da porção de 549 pb do gene *htrA* (17kDa), *Rickettsia* gênero-específico, foram utilizados os iniciadores 17k-5 (5' GCTTACAAAATTCTAAAAACCATA 3') e 17k-3 (5' TGTCTATCAATTACAACTTGCC 3'). E para amplificação da porção de 834 pb do gene *gltA* (citrato cintase) também *Rickettsia* gênero-específico, foram utilizados os iniciadores CS-239 (5'GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT 3') e CS-1069 (5' CAGGGTCTCGTGCATTCTT 3') (LABRUNA et al., 2004c). Estas reações foram utilizadas para triagem dos possíveis positivos. Como controle positivo foi utilizado 1,0 µL de DNA de *R. felis* em concentração de 10⁻⁴, 10⁻⁵ e 10⁻⁶ para *gltA* e 17kDa.

As amostras positivas nas duas reações foram submetidas a uma nova PCR com primers que identificam sequencias de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa. Para a amplificação da porção de 530 pb do gene *ompA* (190 kDa) foram utilizados os iniciadores Rr190,70p (5'ATGGCGAATATTCTCCAAA 3') e Rr190,602n (5'AGTGCAGCATTGCTCCCCCT 3') e para amplificação da porção de 856 pb do gene

ompB (135 kDa) utilizou-se os iniciadores 120-M59 (5'CCGCAGGGTTGGTAAGTGC 3') e o 120.807 (5'CCTTTAGATTACCGCCTAA 3') (LABRUNA et al., 2004c). Para o controle positivo foi utilizado 1,0 µL de DNA de *R. amblyommi*.

As condições de reação para ambas as técnicas foram as seguintes: As amostras foram inicialmente aquecidas a 95 °C durante 5 minutos para desnaturar as fitas de DNA e ativar a DNA polimerase, seguido por 40 ciclos repetidos de desnaturação a 95 °C durante 20 segundos, hibridação a 52 °C por 20 segundos, e extensão a 72 °C durante 25 segundos, seguido por uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel (1,5% de agarose), com confirmação do tamanho amplicon alcançado através de comparação com um marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler 100 bp ADN Ladder, produto # SM024, Thermo Scientific). As bandas foram visualizadas em transiluminador e procedido o registro fotográfico em meio eletrônico.

3.4.1.1 PCR-RFLP

Utilizou-se o banco de dados do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para o acesso às sequências completas ou parciais que codificam para os genes *htrA*, *gltA* e *ompB*, oriundas de todas as espécies de *Rickettsia* descritas até 2014, em carapatos no Brasil. As sequências foram então alinhadas com os iniciadores utilizados nos três ensaios de PCR, para gerar “amplicons” virtuais utilizando o programa Sequencher® (Versão 5.1; Genecodes, Corporation). Os produtos de amplificação resultantes foram então submetidos à digestão com uma série de endonucleases de restrição *in silico*, através do Programa NEBcutter V 2,0 (VINCZE et al., 2003; SANTOLIN; FAMADAS; McINTOSH, 2013).

“Amplicons” derivados das amostras de carapatos positivos nos ensaios de PCR convencional para *Rickettsia* foram submetidos à digestão usando as enzimas de restrição HindIII, MspI e RsaI (New England Biolabs), selecionadas com base na análise de digestão *in silico*. A mistura da digestão continha 0,2 µL da enzima, 1 µL de tampão de amostra, 3,8 µL de H₂O ultrapura e 5 µL de DNA. O volume foi incubado por 3 horas a 37 °C. O produto foi então analisado por eletroforese em gel (2% de agarose) a uma voltagem de 75 W por 1 hora. Os géis foram corados com brometo de etídio, observados e fotografados digitalmente sob iluminação ultravioleta em uma foto documentador Gel Doc XR (Bio-Rad). Padrões de bandas foram comparados entre as amostras e por meio de comparação com um marcador de peso molecular

de DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produtos # SM0371 Thermo Scientific) (SANTOLIN; FAMADAS; McINTOSH, 2013).

3.4.2 *Ehrlichia* spp.

A composição do mix relativo à primeira reação se fez da seguinte forma: 2,75 µL de H₂O ultrapura, 6,25 µL de Master Mix, 0,5 µL de cada primer, 2,5 µL do DNA extraído. Para a primeira amplificação, utiliza-se os iniciadores *dsb* 330 (5' GATGATGCTTGAAGATATSAAACAAAT 3') e *dsb* 720 (5' CTATTACTTCTTAAAGTTGATAWATC 3'), cujo produto tem 401 pb (AGUIAR et al., 2014). As amostras foram inicialmente aquecidas a 95 °C durante 5 minutos para desnaturar as fitas de DNA e ativar a DNA polimerase, seguido por 35 ciclos repetidos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos, hibridação a 50 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C durante 30 segundos, seguido por uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

A composição do mix relativo à segunda reação se fez da seguinte forma: 9,5µL de H₂O ultrapura, 1µL de ambos os primers, 12,5µL de Master Mix e 1 µL do produto amplificado. Para a segunda amplificação, utiliza-se os iniciadores *dsb* 380 (5' ATTTTAGRGATTTCCAATACTGG 3') e o *dsb* 720, já mencionado, e o tamanho do produto amplificado é 349 pb. As amostras foram inicialmente aquecidas a 95 °C durante 5 minutos para desnaturar as fitas de DNA e ativar a DNA polimerase, seguido por 30 ciclos repetidos de desnaturação a 95 °C durante 15 segundos, hibridação a 52 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C durante 30 segundos, seguido por uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Como controle positivo foi utilizado 1,0 µL de DNA extraído de canino naturalmente infectado por *Ehrlichia canis*, no município de Seropédica.

Todos os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5%, com confirmação do tamanho amplicon alcançado através de comparação com um marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler 100 bp ADN Ladder, produto # SM024, Thermo Scientific). As bandas foram visualizadas com auxílio de transiluminador, sendo procedido o registro fotográfico por meio de aparelho eletrônico específico.

3.4.3 *Anaplasma* spp.

A composição do mix relativo à primeira reação se fez da seguinte forma: 13,5 µL de H₂O ultrapura, 2,5 µL de tampão “buffer” 10 X, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), nucleotídeos trifosfatados (Dntp 2,5 mM) 2 µL, primers 0,5µL de cada um, taq polimerase 0,25 e 5 µL do DNA extraído. Para a primeira amplificação, utilizou-se os iniciadores *ge3a* (5' CACATGCAAGTCGAACGGATTATTC 3') e *ge10r* (5' TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC 3'), cujo produto tem 932 pb (MASSUNG et al., 1998). As amostras foram inicialmente aquecidas a 95 °C durante 5 minutos para desnaturar as fitas de DNA e ativar a DNA polimerase, seguido por 40 ciclos repetidos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, hibridação a 55 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C durante 60 segundos, seguida por uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

A composição do mix relativo à segunda reação se fez da seguinte forma: 17,5 µL de H₂O ultrapura, 2,5 µL de tampão “buffer” 10 X, 0,75 µL de MgCl₂ (50 mM), nucleotídeos trifosfatados (Dntp 2,5 mM) 2 µL, primers 0,5µL de cada um, Taq polimerase 0,25 e 1 µL do produto amplificado. Para a segunda amplificação, utilizou-se os iniciadores *ge9f* (5' AACGGATTATTCTTATAGCTTGCT 3') e *ge2* (5' GGCAGTATTAAAAGCAGCTCCAGG 3'), cujo alvo é o gene GE 16S rRNA, com 546 pb. As amostras foram inicialmente aquecidas a 95 °C durante 5 minutos para desnaturar as fitas de DNA e ativar a DNA polimerase, seguido por 30 ciclos repetidos de desnaturação a 94 °C durante 30 segundos, hibridação a 55 °C por 30 segundos, e extensão a 72 °C durante 60 segundos, seguida por uma extensão final a 72 °C durante 5 minutos.

Como controle positivo foi utilizado 1,0 µL de DNA extraído de canino naturalmente infectado por *Anaplasma platys*, no município de Seropédica.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados 14.469 espécimes de carapatos em todas as áreas pesquisadas (TABELA 1). Uma amostra pertencente ao gênero *Rhipicephalus*, enquanto todas as demais amostras pertencem ao gênero *Amblyomma*. Com relação à distribuição dos espécimes em estádio evolutivo, observou-se 73,05% de larvas, 25,84% de ninfas e 0,05% de adultos (TABELA 1).

Tabela 1: Carapatos separados por estádio evolutivo, gênero, espécie e ano de coleta, coletados entre outubro de 2008 e agosto de 2012, em cinco áreas institucionais, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Gênero/Espécie de Ixodidae	2009/2010	2010/2011	Total
<i>Amblyomma</i> spp. - larvas	5.373	5.198	10.571
<i>Amblyomma</i> spp. - ninfas	885	2.854	3.739
<i>Amblyomma cajennense</i> - ♂+♀	66	85	151
<i>Amblyomma brasiliense</i> - ♂+♀	1	3	4
<i>Amblyomma dubitatum</i> - ♂+♀	0	3	3
<i>Rhipicephalus microplus</i> - larvas	1	0	1
Total	6.326	8.143	14.469

Foram selecionados 9.353 carapatos para análise, sendo distribuídos em 372 pools, de acordo com a classificação taxonômica, estádio evolutivo, área e ano de coleta. Esse total é composto por 7.273 larvas de *Amblyomma*, 1 larva de *R. (B.) microplus*, 1.952 ninfas de *Amblyomma*, 120 adultos de *A. sculptum* e 4 adultos de *A. brasiliense* e 3 adultos de *A. dubitatum* (TABELA 2).

O PNI foi o local em que se coletou menos espécimes, sendo 2 ninfas de *Amblyomma* sp., e 4 adultos de *A. brasiliensis*, sendo 2 machos e 2 fêmeas. Neste ponto de coleta não se observou a presença de adultos de *A. sculptum*.

É relevante citar as características ambientais do PNI, que o difere dos ambientes encontrados na UFRRJ, FLONA e DCMun. O clima predominante na região do PNI é o subiente úmido, a temperatura é amena durante todo o ano e a umidade é constante, e tal

ambiente pode limitar o desenvolvimento e sucesso de *A. sculptum*, além de favorecer a prevalência de *A. brasiliensis* (SANCHES et al., 2008; SZABÓ et al., 2013).

Tabela 2: Carapatos analisados por biologia molecular, separados por estádio evolutivo, gênero, espécie e sexo, coletados entre outubro de 2009 e agosto de 2011, em cinco áreas institucionais, no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Gênero/Espécie/Sexo	de	PNI	Marambaia	FLONA	DCMun	UFRRJ	Total
Ixodidae							
<i>Amblyomma</i> spp. - larvas	0	544	538	4.463	1.728	7.273	
<i>Amblyomma</i> spp. - ninfas	6	445	528	295	678	1.952	
<i>Amblyomma sculptum</i> - ♂	0	14	11	16	19	60	
<i>Amblyomma sculptum</i> - ♀	0	12	11	31	6	60	
<i>Amblyomma brasiliense</i> - ♂	2	0	0	0	0	2	
<i>Amblyomma brasiliense</i> - ♀	2	0	0	0	0	2	
<i>Amblyomma dubitatum</i> - ♂	0	0	0	0	0	0	
<i>Amblyomma dubitatum</i> - ♀	0	0	2	1	0	3	
<i>Rhipicephalus microplus</i> -	0	0	0	0	1	1	
larvas							
Total		10	1.015	1.090	4.806	2.432	9.353

PNI: Parque Nacional do Itatiaia; Marambaia: Restinga da Marambaia; FLONA: Floresta Nacional Mário Xavier; DCMun: Depósito Central de Munição; UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Destes pools, apenas 2 foram positivos na triagem (FIGURA 7), sendo um pool composto por 3 larvas de *Amblyomma* spp. coletados na FLONA, durante o outono. Tal ponto de coleta localizava-se a aproximadamente 100 m da BR 465, na margem de um lago. O solo é seco e arenoso, com cobertura vegetal predominante de gramínea. No entorno havia vegetação arbórea, herbácea, arbustiva e bambuzal. Foram observadas pegadas e fezes de capivaras, e também presença de pequenos animais silvestres, como coelhos e pequenos roedores, além de fezes de equinos e bovinos. Neste ponto, também havia evidências de que humanos visitavam a área com frequência. Nos últimos anos essa área foi completamente alterada com a construção do Arco Metropolitano do Rio de Janeiro.

A presença de capivaras, de *A. sculptum*, de pastagens e de carapatos oriundo de equinos são fatores de risco para a FMB (SOUZA; PINTER; DONALISIO, 2015), sendo

encontrado no ambiente em questão anticorpos anti-*R. rickettsii* em equinos (CORDEIRO et al. (2015a) e caninos (CORDEIRO et al., 2015b) e circulação de *A. phagocytophilum* em caninos (SANTOS et al., 2011). Alguns ambientes do município de Seropédica possuem características compatíveis com as exigidas para a ocorrência da FMB, sendo pois relevante a busca de hemoparasitos com potencial zoonótico nos ectoparasitos da região.

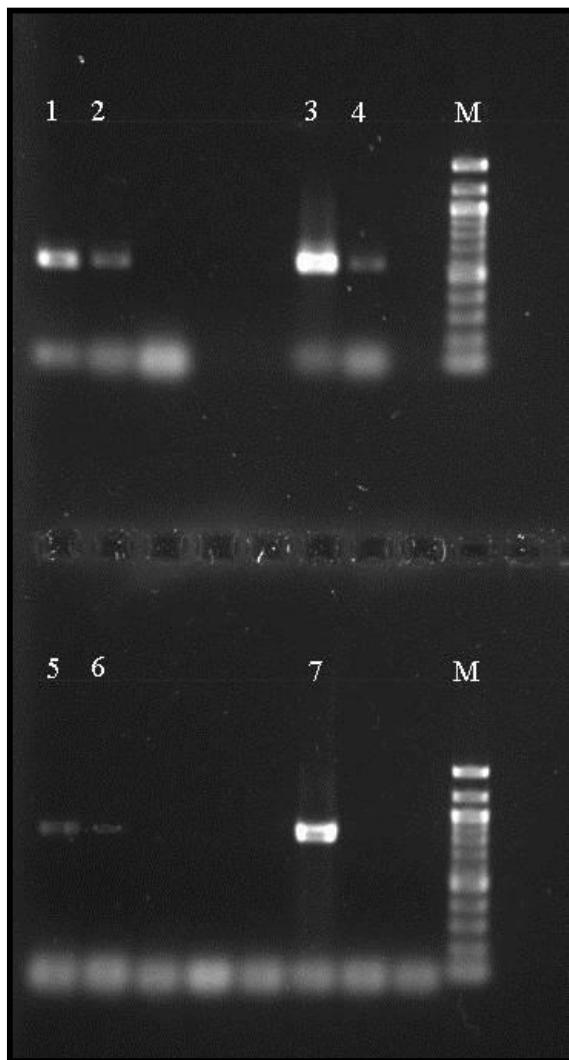


Figura 7: Análise do produto da PCR para amplificação de DNA de Rickettsia spp. em carapato. Eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio. Legenda: 1 e 2 = bandas positivas para Rickettsia spp. utilizando o primer 17kDa; 3 e 4 = controles positivos de *R. felis*, nas diluições 10-4 e 10-5, respectivamente; 5 e 6 = bandas positivas para Rickettsia spp. utilizando o primer gltA; 7 = controle positivo (*R. felis*), na diluição 10-4; M = marcador de peso molecular de DNA.

A outra amostra positiva corresponde a um pool de 20 ninfas de *A. sculptum* coletados no local chamado praia do Sino localizado na Ilha da Marambaia. O ponto de coleta localizava-se a aproximadamente 50 metros da Praia do Sino, em área utilizada como pasto para equinos,

com predominância de gramíneas e com presença de vegetação herbácea e arbustos diversos. O solo era arenoso e seco. O entorno formado por vegetação arbórea densa. A presença humana se dá, eventualmente, durante atividades militares, ocasiões em que se aglomera um número grande de pessoas, num curto espaço de tempo. Além dos militares, moradores, visitantes e equipe de pesquisas eventualmente frequentam o local.

A presença de *Rickettsia* nessa área e estação do ano já foi descrita (SILVEIRA; FONSECA, 2011). Os estádios de desenvolvimento dos carrapatos positivos para *Rickettsia* são frequentemente observados parasitando humanos (SZABÓ et al., 2006).

Quando as amostras foram submetidas à reação por PCR utilizando os primers específicos para febre maculosa (*ompA* e *ompB*) verificou-se que as mesmas foram negativas para esse grupo de *Rickettsia*.

A análise dos dados através do método PCR-RFLP indicou que as bandas verificadas na análise são de *Rickettsia bellii* (Figura 8). A positividade para *R. bellii* encontrada no presente estudo é de 0,25%. Analisando a percentagem no estádio de larva de *Amblyomma*, observou-se 0,04% de positividade, enquanto que o observado para ninfas foi de 0,01%. Não se observou positividade para os estádios adultos.

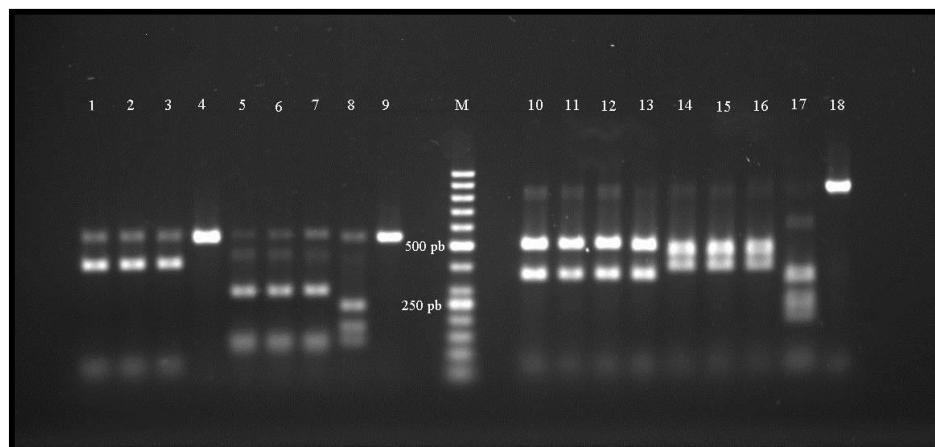


Figura 8: Análise de gel com padrões de banda de PCR-RFLP produzidos por HindIII, MspI e RspI na digestão de amplicões de 17kDa e gltA. Eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio. As faixas 1,2 = amplicons positivos, 3 = *Rickettsia bellii* e 4 = *Rickettsia rickettsii*, amplicões da PCR com o primer 17kDa cada um digerido pela endonuclease de restrição HindIII; As faixas 5, 6 = amplicons positivos, 7 = *R. bellii* e 8 = *R. rickettsii*, amplicões da PCR com o primer 17kDa cada um digerido pela endonuclease de restrição MspI; 9 = 17kDa sem digestão; M = marcador de peso molecular de DNA; 10, e 11 = amplicons positivos, 12 = *R. bellii* e 13 = *R. rickettsii*, amplicões da PCR com o primer gltA cada um digerido pela endonuclease de restrição MspI; 14, 15 = amostras positivas, 16 = *R. bellii* e 17 = *R. rickettsii*, amplicões da PCR com o primer gltA cada um digerido pela endonuclease de restrição RsaI; 18 = gltA sem digestão pela endonuclease de restrição.

Rickettsia bellii já foi identificada em carapatos do gênero *Amblyomma* por diversos autores (PACHECO et al., 2009; LABRUNA et al., 2011; BARBIERI; ROMERO; LABRUNA, 2012; LOPES et al., 2014; MOURA-MARTINIANO et al., 2014; McINTOSH et al., 2015), sendo a espécie de *Rickettsia* mais comum a infectar carapatos no Brasil (LABRUNA et al., 2007a). De acordo com a alta prevalência deste agente em diversas espécies de *Amblyomma*, é possível que haja o que se chama de co-evolução simbiótica entre ambas as espécies (LABRUNA et al., 2004b).

Em uma reserva indígena no Mato Grosso, encontrou-se circulação de *R. bellii* em larvas de *Amblyomma* (12/12) e em *Amblyomma sculptum* (complexo *A. cajennense*) adulto (1/10), enquanto que em áreas de ocorrência de FMB no estado do Rio de Janeiro, foi-se diagnosticado *R. bellii* em um espécime de *A. dubitatum*, além de observar positividade para *Rickettsia* do GFM em *A. sculptum* e *A. dubitatum*, apontando a importância destas espécies de ixodídeos como vetores de rickettsias do GFM em áreas de ocorrência de FMB, além de indicar a presença de *R. bellii* neste cenários o que, *per se*, pode configurar uma ameaça (LOPES et al., 2014; MOURA-MARTINIANO et al., 2014).

Diversos autores já diagnosticaram a presença de *Rickettsia* em *A. sculptum* (GUEDES et al., 2005; GUEDES et al., 2011; NUNES et al., 2015), esta espécie de carapato tem importância na epidemiologia da FMB, dentre outras hemoparasitoses, uma vez que seu estádio imaturo parasita seres humanos, além de estar presente em áreas antropizadas, como áreas rurais, sendo o equino seu principal hospedeiro no ambiente doméstico.

Em contrapartida, é importante citar que *R. rickettsii* é patogênica para o carapato (SOARES et al., 2012), sendo assim, a prevalência de infecção por rickettsias patogênicas tenderá a ser baixa, ou mesmo negativa, como no presente estudo (SANGIONE et al., 2005; BRITES-NETO et al., 2013).

É sabido que existe uma relação ecológica (competição) entre rickettsias no interior do carapato, uma vez infectado por uma *Rickettsia*, o carapato se torna refratário à infecção por uma segunda espécie (BURGDORFER; HAYES; MAVRO, 1981), e experimentalmente se observou também que ao infectar artificialmente um carapato com uma segunda espécie de *Rickettsia*, esta tinha sua transmissão transovariana inibida (MACALUSO et al., 2002), sendo assim, a presença de *R. bellii* pode inibir, por exemplo, sua infecção por rickettsias de patogenicidade conhecida, como *R. rickettsii* e *R. parkeri*. É imprescindível a realização de estudos que objetivem determinar a importância de *R. bellii* na eco-epidemiologia da FMB,

uma vez que tal agente pode interferir na capacidade de veiculação de rickettsias do GFM, por exemplo, sendo um fator de proteção na epidemiologia da FMB (PACHECO et al., 2009).

Com esse resultado é possível verificar que há circulação de *Rickettsia* em duas áreas de coleta. Até o momento a patogenicidade desta espécie para humanos é desconhecida, contudo apenas a circulação pode se constituir uma ameaça (LOPES et al., 2014) sendo, pois, imperativo que a atenção e a vigilância nestas áreas deva ser mantida, já que há circulação de pessoas, animais domésticos e silvestres.

É importante salientar que a FLONA alberga o Centro de Triagem de Animais Silvestres-RJ IBAMA, e tal órgão confina animais silvestres, como répteis, mamíferos e aves, apreendidos e capturados de muitas áreas da região metropolitana do Rio de Janeiro e, uma vez no local, os animais são suscetíveis a carapatos circulantes no local, ou mesmo, tais animais podem carregar consigo ectoparasitos. Sendo assim, a vigilância acarológica da região é de suma importância para a sanidade dos animais enzoóticos e dos animais manejados pelo IBAMA-RJ.

Em ambas as áreas em que se encontrou circulação de *R. bellii*, existia a presença de capivaras. Este mamífero é altamente importante na epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira, uma vez que é importante hospedeiro primário e amplificador dos carapatos vetores, como *A. sculptum* e *A. dubitatum* (SOUZA et al., 2009), além de apresentar anticorpos anti-*Rickettsia* do GFM (MIRANDA et al., 2011; PACHECO et al., 2007). Anticorpos anti-*R. bellii* foram detectados em capivaras, no estado de São Paulo (PACHECO et al., 2007), enquanto que em infecção experimental de *R. bellii* em gambás, observou-se também a soroconversão (HORTA et al., 2010), o que é instigante para uma investigação profunda sobre a possível patogenicidade de *R. bellii* para hospedeiros vertebrados.

A pesquisa molecular para os gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* revelou resultados negativos para ambos os gêneros. Todas as espécies do gênero *Ehrlichia* infectam hospedeiros vertebrados e são transmitidos por carapatos, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* são importantes agentes de doenças para humanos na América do Norte, enquanto que *E. canis* e *E. ruminantium* têm importância veterinária (DUMLER, 2001). Na América do Sul, os estudos epidemiológicos envolvendo a presença de organismos do gênero *Ehrlichia*, exceto *E. canis*, são escassos. O DNA de *E. chaffeensis* foi detectado e caracterizado em cervo-do-pantanal (MACHADO et al. 2006), enquanto que *E. muris* e *E. ruminantium* ainda não foram identificadas no Brasil. Existe

também a evidência molecular da presença de *E. ewingii* em cinco cães no município de Viçosa-MG (OLIVEIRA et al. 2009).

Com o intuito de se detectar molecularmente pela primeira vez, em áreas rurais do Brasil, agentes ehrlichiais em carapatos, animais e humanos, amostras de 347 carapatos, 29 capivaras, 5 cães e 75 humanos foram avaliadas através da PCR em tempo real, entretanto apenas os cães apresentaram-se positivos, com 100% positividade para *E. canis* (LABRUNA et al., 2007b). Na região Nordeste, ao se pesquisar agentes do gênero *Ehrlichia* em caninos e carapatos, por meio da Nested-PCR, encontrou-se circulação de *E. canis* em ambas as espécies, contudo não se evidenciou a circulação de *E. ewingii* e *E. chaffeensis* (SOUZA et al., 2004).

Com relação à circulação de *A. phagocytophilum* na América do Sul, existem dados que comprovam sua presença em caninos e em carapatos na região sudeste do Brasil (SANTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2013). Além deste, um estudo recente de hemoparasitos em carapatos de vida livre no Equador, teve como resultado a constatação de *A. phagocytophlum* em carapatos do gênero *Amblyomma* e *A. marginale* em carapatos *R. (B.) microplus* (PESQUERA et al., 2015); tais autores não detectaram a circulação de *Ehrlichia* nos carapatos estudados, corroborando com os nossos achados.

Ações antrópicas, tais como o desmatamento, ocupação irregular de áreas florestais, introdução de espécies exóticas e domésticas no ambiente, fazem com que se perca o equilíbrio em que se encontram os agentes etiológicos na natureza (ESTRADA-PEÑA et al., 2014). E, uma vez o equilíbrio quebrado, o ser humano pode se tornar vulnerável a infecções. Esse modelo é muito importante para doenças de transmissão vetorial, como a leishmaniose, a Febre Maculosa Brasileira e as arboviroses como, por exemplo, os principais agravos de Saúde Pública hoje no Brasil, Zika e Chikungunya.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados observados, pode-se concluir que:

- A presença de *R. bellii* em carapatos no município de Seropédica e na Ilha de Marambaia confirma a circulação de rickettsias neste local.
- Não foi possível diagnosticar a circulação de organismos dos gêneros *Ehrlichia* e *Anaplasma* em carapatos de vida livre nas regiões estudadas.
- A ocorrência e a distribuição de carapatos observadas, neste estudo, podem ser atribuídas às condições ambientais, à composição da cobertura vegetal e à atividade dos hospedeiros vertebrados, estando estas relacionadas às diferentes ações antrópicas exercidas em cada ponto de coleta, ao longo estudo.
- A identificação de rickettsias em carapatos coletados em ecossistemas de interação entre animais domésticos, silvestres e humanos indica a necessidade que estudos desta natureza devem ser intensificados e, em se tratando de área utilizada para treinamento militar, que medidas de profilaxia e controle sejam incorporadas nas atividades de rotina dos agentes de saúde das unidades militares.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M.; ZILIANI, T.F.; ZHANG, X.; MELO, A.L.T.; BRAGA, I.A.; WITTER, R.; FREITAS, L.C.; RONDELLI, A.L.H.; LUIS, M.A.; SORTE, E.C.B.; JAUNE, F.W.; SANTARÉM, V.A.; HORTA, M.C.; PESCADOR, C.A.; COLODEL, E.M.; SOARES, H.S.; PACHECO, R.C.; ONUMA, S.S.M.; LABRUNA, M.B.; McBRIDE, J.W. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.537-544, 2014.

ALLISON, R.W.; LITTLE, S.E. Diagnosis of rickettsial diseases in dogs and cats. **Veterinary Clinical Pathology**, v.42, n.2, 2013.

ANDEREG, P. I.; PASSOS, L. M. F. Erliquiose canina – Revisão. **Clinica Veterinária**, v. 4, n. 19, p. 31-38, 1999.

ANDERSON, B.E.; REGNERY, R.L.; CARLONE, G.M.; TZIANABOS, T.; MCDADE, J.E.; FU, Z.Y.; BELLINI, W.J. Sequence analysis of the 17-kilodalton-antigen gene from *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Bacteriology**, v.169, n.6, p.2385-2390, 1987.

ANDERSON, J.F.; MAGNARELLI, L.A. Biology of Ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, v.22, p.195-215, 2008.

ARAGÃO, H.B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-148, 1961.

ATIF, F.A. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettiales pathogens of veterinary and public health significance. **Parasitology Research**, v.114, p.3941-3957, 2015.

AZAD, A.F.; WEBB, L.; CARL M.; DASCH, G.A. Detection of *Rickettsia* in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Annals of New York Academy of Science**, v.590, n.1, p.557-563, 1990.

BARBIERI, A.R.M.; ROMERO, L.; LABRUNA, M.B. *Rickettsia bellii* infecting *Amblyomma sabanerae* ticks in El Salvador. **Pathogens and Global Health**, v.106, n.3, p.188-189, 2012.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006, p. 223.

BELLAH, J.R.; SHULL, R.M.; SELCER, E.V.S. *Ehrlichia canis*-related polyarthritis in a dog. **Journal of American Veterinary Medicine Association**, v.189, n.8, p.922-923, 1986.

BURGDORFER, W.; HAYES, S.F.; MAVROS, A.J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: BURGDORFER W, ANACKER RL (eds) **Rickettsiae and rickettsial diseases**, Academic Press, Inc., New York, p.585-594, 1981.

BRITES-NETO, J.; NIERI-BASTOS, F.A.; BRASIL, J.; DUARTE, K.M.R.; MARTINS, T.F.; VERÍSSIMO, C.J.; BARBIERI, A.R.M.; LABRUNA, M.B. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in an area endemic for Brazilian spotted fever. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.3, p.367-372, 2013.

CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L.; NEVES, C.V.B.; FIGUEIRA, F.C.B.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H.; GALVÃO, M.A.M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.22, n.3, p.495-501, 2006.

CORDEIRO, M.D.; RAIA, V.A.; PINTER, A.; CUNHA, N.C.; SOUZA, C.E.; FONSECA, A.H. Seroprevalence of *rickettsia* spp. and a study of the tick fauna in dogs from the municipality of Seropédica, State of Rio de Janeiro. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v.36, n.6, p.3787-3794, 2015b.

CORDEIRO, M.D.; RAIA, V.A.; VALIM, J.R.A.; CASTRO, G.N.S.; SOUZA, C.E.; FONSECA, A.H. Frequência de anticorpos da classe IgG anti-Rickettsia rickettsii em equinos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Campus Seropédica. Revista Brasileira de Medicina Veterinária, v.37, n.1, p.78-82, 2015a.

COSTA, J.O.; SILVA, M.; BATISTA JUNIOR, J.A.; GUIMARÃES, M.P. *Ehrlichia canis* infection in dog in Belo Horizonte – Brazil. Arquivo da Escola de Veterinária, UFMG, v.25, n.2, p. 199-200, 1973.

CRUZ, A.C.; ZWEYGARTH, E.; RIBEIRO, M.F.B.; SILVEIRA, J.A.G.; FUENTE, J.; GRUBHOFFER, L.; VALDÉS, J.J.; PASSOS, L.M.F. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows na ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. Parasitic & Vectors, 2012, v.5, p.291-302, 2012.

CUNHA, N.C.; FONSECA, A.H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.M.; BARREIRA, J.D.; MASSARD, C.L.; LEMOS, E.R.S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. Pesquisa Veterinária Brasileira, v.29, n.2, p.105-108, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Dogs, cats, parasites, and humans in Brazil: opening the black box. Parasites & Vectors, v.7, n.22, p.1-25, 2014.

DONATIEN, A.; LESTOQUARD, F. Existence en Algérie d'une *Rickettsia* du chien. Bulletin de la Société de Pathologie Exotique et de ses filiales de l'Ouest- Africain et de Madagascar, Siege de la société : Institut Pasteur, Paris. Masson & Cie., Éditeurs, Libraires de L'Académie de Medicine, p.418-419, 1935.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and “EGH agent” as subjective

synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v.51, n.6, p.2145- 2165, 2001.

ESTRADA-PEÑA, A.; OSTFELD, R.S.; PETERSON, A.T.; POULIN, R.; FUENTE, J. Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. **Trends in Parasitology**, v.30, n.4, 2014.

FISHBEIN, D.B.; SAWYER, L.A.; HOLLAND, C.J.; HAYES, E.B.; OKOROANYANWU, W.; WILLIAMS, D.; SIKES, K.; RISTIC, M.; McDADE, J.E. Unexplained Febrile Illnesses After Exposure to Ticks. **Journal of American Medical Association**, v.257, n.22, p.3100-3104, 1987.

FREITAS, L.H.; FACCICI, J.L.H.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages. **Experimental and Applied Acarology**, v.47, n.4, p.321-345, 2009.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PACHECO, R.C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M.B. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.4, p.308-311, 2011.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the *Amblyomma cajennense* in a new brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p.841-845, 2005.

GUGLIELMONE, A.A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, J.R.; GONZÁLEZ-ACUNÁ, D.; ESTRADA-PENÁ, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v.40, n.2, p.83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G.; SHAO, R.; BARKER, S.C. The Argasidae, Ixodidae

and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v.2528, p.1-28, 2010.

HORTA, M.C.; SABATINI, G.S.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWAŁSKA, M.; CANAL, R.B.; PACHECO, R.C.; MARTINS, T.F.; MATUSHIMA, E.R.; LABRUNA, M.B.

Experimental Infection of the Opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, n.10, p.959-967, 2010.

ISMAIL, N.; BLOCH, K.C.; McBRIDE, J.W. Human Ehrlichiosis and Anaplasmosis. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.30, p.261-292, 2010.

JENKINS A., KRISTIANSEN B.E., ALLUM A.G., AAKRE R.K., STRAND L., KLEVELAND E.J., VAN DE POL I., SCHOULS L. *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Ehrlichia* spp. in ixodes ticks from southern Norway. **Journal of Clinical Microbiology**, n.39, p.3666–3671, 2001.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v.129, n.7, p.3-14, 2004.

KOCAN K.M., DE LA FUENTE J., GUGLIELMONE A.A., MELENDEZ R.D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, n.16, p.698–712, 2003.

KRAWCZAK, F.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; NUNES, F.P.; SOARES, J.F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v.7, n.7, 2014.

LABRUNA, M.B.; KERBER C.E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H.; WAAL, D.T.; GENNARI, S.M. Risk factors to ticks infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001.

LABRUNA, M.B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J.M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v.16, n.2, 2011.

LABRUNA, M.B.; McBRIDE, J.W.; BOUYER, D.H.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. Molecular Evidence for a Spotted Fever Group *Rickettsia* Species in the Tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.41, n.3, p.533-537, 2004c.

LABRUNA, M.B.; McBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M.J.; DAVIDSON, W.R.; STROMDAHL, E.Y.; WILLIAMSON, P.C.; STICH, R.W.; LONG, S.W.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.143, p.189-195, 2007.

LABRUNA, M.B.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; SZABÓ, M.P.J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, n.3, p.869-873, 2007.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D.H.; McBRIDE, J.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; POPOV, V.; WLKER, D.H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.41, N.6, P.1073-1081, 2004b.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. *Rickettsia* infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted Fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.90-98, 2004a.

LEE, S.; KAKUMANU, M.L.; PONNUSAMY, L.; VAUGHN, M.; FUNKHOUSER, S.; THORNTON, H.; MESHNICK, S.R.; APPERSON, C.S. Prevalence of *Rickettsiales* in ticks removed from the skin of outdoor workers in North Carolina. **Parasites & Vectors**, v.7, p.607-621, 2014.

LOPES, L.B.; GUTERRES, A.; ROZENTAL, T.; OLIVEIRA, R.C.; MARES-GUIA, M.A.; FERNANDES, J.; FIGUEREDO, J.F.; ANSCHAU, I.; JESUS, S.; ALMEIDA, A.B.M.V.; SILVA, V.C.; VIA, A.V.G.M.; BONVICINO, C.R.; D'ANDREA, P.S.; BARREIRA, J.D.; LEMOS, E.R.S. *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. **Parasites & Vectors**, v.7, n.1, p.191-197, 2014.

LIU, X.Y.; BONNET, S.I. Hard Tick Factors Implicated in Pathogen Transmission. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.1, p.1-8, 2014.

MACALUSO, K.R.; SONENSHINE, D.E.; CERAUL, S.M.; AZAD, A.F. Rickettsial Infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Inhibits Transovarial Transmission of a Second *Rickettsia*. **Journal of Medical Entomology**, v.39, n.6, p.809-813, 2002.

MACHADO, R.Z.; DUARTE, J.M.B.; DAGNONE, A.S.; SZABÓ, M.P.J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v.139, p.262-266, 2006.

MAEDA, K.; MARKOWITZ, N.; HAWLEY, R.C.; RISTIC, M.; COX, D.; MCDADE, J.E. Human infection with *Ehrlichia canis*, a leukocytic rickettsia. **The New England Journal of Medicine**, v.316, n.14, p.853-856, 1987.

MASSUNG, R.F.; SLATER, K.; OWENS, J.H.; NICHOLSON, W.L.; MATHER, T.N.; SOLBERG, V.B.; OLSON, J.G. Nested PCR Assay for Detection of Granulocytic Ehrlichiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v.26, n.4, p.1090-1095, 1998.

MAYS, S.E.; HENDRICKS, B.M.; PAULSEN, D.J.; HOUSTON, A.E.; FRYXELL, R.T.T. Prevalence of five tick-borne bacterial genera in adult *Ixodes scapularis* removed from white-tailed deer in western Tennessee. **Parasites & Vectors**, v.7, p.473-479, 2014.

McCOY, K.D.; LÉGER, E.; DIETRICH, M. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p.1-12, 2013.

McINTOSH, D. BEZERRA, R.A.; LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H.; GAIOTTO, F.A.; GINÉ, G.A.F.; ALBUQUERQUE, G.R. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.3, p.879-883, 2015.

MENEZES, L.F.T.; ARAÚJO, D.S.D. **Formações vegetais da Restinga da Marambaia**. In: MENEZES, L.F.T.; PEIXOTO, A.L.; ARAUJO, D.S.D., (Org). História Natural da Marambaia. Seropédica: Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2005, p. 67-120.

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biological reviews**, n.86, p.379-405, 2011.

MICHELET, L.; DELANNOY, S.; DEVILLERS, E.; UMHANG, G.; ASPAN, A.; JUREMALM, M.; CHIRICO, J.; WAL, F.J.V.D.; SPRONG, H.; PIHL, T.P.B; KLITGAARD, K.; BODKER, R.; FACH, P.; MOUTAILLER, S. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.4, p.1-13, 2014.

MIRANDA, J.; CONTRERAS, V.; NEGRETE, Y.; LABRUNA, M.B.; MÁTTAR, S. Vigilancia de la infección por *Rickettsia* sp. en capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) un modelo potencial de alerta epidemiológica en zonas endémicas. **Biomédica**, v.31, p.216-221, 2011.

MORAES-FILHO, J.; KRAWCZAK, F.S.; COSTA, F.B.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B. Comparative Evaluation of the Vector Competence of Four South American Populations of the *Rhipicephalus sanguineus* Group for the Bacterium *Ehrlichia canis*, the Agent of Canine Monocytic Ehrlichiosis. **PLoS One**, v.10, n.9, p.1-16, 2015.

MOURA-MARTINIANO, N.O.; MACHADO-FERREIRA, E.; CARDOSO, K.M.; GEHRKE, F.S.; AMORIM, M.; FOGAÇA, A.C.; SOARES, C.A.G.; GAZÊTA, G.S.; SCHUMAKER, T.T.S. *Rickettsia* and Vector Biodiversity of Spotted Fever Focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n.3, p.498-500, 2014.

NATEGHPOUR, M.; AKHAVAN, A.A.; HANAFI-BOJD, A.A.; TELMADARRAIY, Z.; AYAZIAN, M.S.; HOSSEINI-VASOUKOLAEI, N.; MOTEVALLI-HAGHI, A.; AKBARZADEH, K. Wild rodents and their ectoparasites in Baluchistan area, southeast of Iran. **Tropical Biomedicine**, v.30, n.1, p.72-77, 2013.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp, and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida:Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.252-276, 2014.

NUNES, E.C.; VIZZONI, V.F.; NAVARRO, D.L.; IANI, F.C.M.; DURÃES, L.S.; DAEMON, E.; SOARES, C.A.G.; GAZETA, G.S. *Rickettsia amblyommi* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.8, p.1058-1061, 2015.

OGRZEWAŁSKA, M.; UEZU, A.; JENKINS, C.N.; LABRUNA, M.B. Effect of forest fragmentation on tick infestations of birds and tick infection rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. **Ecohealth**, v. 8, n. 3, p. 320–331, 2011.

OLIVEIRA, L.S.; OLIVEIRA, K.A.; MOURÃO, L.C.; PESCATORE, A.M.; ALMEIDA, M.R.; CONCEIÇÃO, L.G.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C. First report of *Ehrlichia ewingii* detected by molecular investigation in dogs from Brazil. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.15, n.2, p.55-56, 2009.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on

pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 295-301, 2000.

OTEO, J.A.; NAVA, S.; SOUSA, R.; MATTAR, S.; VENZAL, J.M.; ABARCA, K.; LABRUNA, M.B.; ZAVALA-CASTRO, J.. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. **Revista Chilena de Infectología**, v.31, p.54-65, 2014.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; GIANNELLI, A.; LATROFA, M.S.; CASCIO, A.; CAZZIN, S.; RAVAGNAN, S.; MONTARSI, F.; ZANZANI, S.A.; MANFREDI, M.T.; CAPELLI, G. Ticks infecting humans in Italy and associated pathogens. **Parasites & Vectors**, n.7, p.328-336, 2014.

PACHECO, R.C.; HORTA, M.C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A.C.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, n.27, p.364-371, 2007.

PACHECO, R.C.; HORTA, M.C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO J.; MARTINS, T.F.; NARDI, M.S.; SOUZA, S.S.A.L.; SOUZA, C.E.; SZABÓ, M.P.J.; RICJTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.3, p.351-353, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; SOCOLOVSCHI, C.; LABRUNA, M.B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M.Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Update on Tick- Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, p.657-702, 2013.

PESQUERA, C.; PORTILLO, A.; PALOMAR, A.M.; OTEO, J.A. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. **Parasites & Vectors**, v.8, p.46-55, 2015.

PEREZ, C.A.; ALMEIDA, A.F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V.H.B.; BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S.; COSTA, J.C.; RAMOS, L.A.; ARRUDA-SANTOS, A.D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C.P.; BARROS-BATTESTI, D.M. Carapatos do gênero *Amblyomma* (acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para Febre Maculosa no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, n.4, p.210-217, 2008.

PROBOSTE, T.; KALEMA-ZIKUSOKA, G.; ALTET, L.; SOLANO-GALLEGO, L.; MERA, I.G.F.; CHIRIFE, A.D.; MURO, J.; BACH, E.; PIAZZA, A.; CEVIDANES, A.; BLANDA, V.; MUGISHA, L.; FUENTE, J.; CARACAPPA, S.; MILLÁN, J. Infection and exposure to vector-borne pathogens in rural dogs and their ticks, Uganda. **Parasites & Vectors**, v.8, p.306-314, 2015.

QUINTERO, J.C.; LONDOÑO, A.F.; DÍAZ, F.J.; AGUDELO-FLÓREZ, P.; ARBOLEDA, M.; RODAS, J.D. Ecoepidemiología de la infección por rickettsias en roedores, ectoparásitos y humanos en el noroeste de Antioquia, Colombia. **Biomédica**, v.33, n.1, p.38-51, 2013.

RYMASZEWSKA, A.; GRENDÁ, S. Bacteria of the genus *Anaplasma* – characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. **Veterinarní Medicina**, v. 53, n.11, p. 573–584, 2008.

SALVAGNI, C.A.; DAGNONE, A.S.; GOMES, T.S.; MOTA, J.S.; ANDRADE, G.M.; BALDANI, C.D.; MACHADO, R.Z. Serologic evidence of equine granulocytic anaplasmosis in horses from central West Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.3, p.135-140, 2010.

SANCHES, G.S.; BECHARA, G.H.; GARCIA, M.V.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v.44, p.43-48, 2008.

SANGIONI, L.A.; HORTA, M.C.; VIANNA, M.C.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.; GALVÃO, M.A.; SCHUMKER, T.T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n.2, p.265-270, 2005.

SANTOLIN, I.D.A.C.; FAMADAS, K.M.; McINTOSH, D. Detecção e identificação de espécies de *Rickettsia* em carapatos coletados de aves silvestres no Brasil pela PCR-RFLP. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, n.2, p.68-73, 2013.

SANTOS, A.A.; ZIKAN, C.E. **Descrição geral do parque nacional Itatiaia.** In: O parque nacional do Itatiaia, Cadernos para o desenvolvimento sustentável, Rio de Janeiro: FBDS 3, 2000, p. 21-30.

SANTOS, H.A.; PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H.; BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD, C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.23, n.4, p.70-774, 2011.

SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.G.; BALDANI, C.D.; SILVA, C.B.; PEIXOTO, M.P.; PIRES, M.S.; VITARI, G.L.V.; COSTA, R.L.; SANTOS, T.M.; ANGELO, I.C.; SANTOS, L.A.; FACCINI, J.L.H.; MASSARD, C.L. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasites & Vectors**, v.6, p.348-357, 2013.

SILVEIRA, A.K; FONSECA, A.H. Caracterização de ambientes com potencial para ocorrência de carapatos transmissores de agentes patogênicos para humanos. **Boletim do PARNA ITATIAIA**, v.13, 2011, 87 p.

SILVEIRA, A.K.; FONSECA, A.H. Distribuição, diversidade e sazonalidade de carapatos em ambientes institucionais com diferentes graus de intervenção humana no estado do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n.2, p. 1-12, 2013.

SILVEIRA, J.A.; VALENTE, P.C.; PAES, P.R.; VASCONCELOS, A.V.; SILVESTRE, B.T.; RIBEIRO, M.F. The first clinical and laboratory evidence of co-infection by *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia canis* in a Brazilian dog. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.6, n.3, p.242-245, 2015.

SOARES, J.F.; SOARES, H.S.; BARBIERI, A.M.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v.26, n.2, p.139-151, 2012.

SOUZA, B.M.P.S.; LEAL, D.C.; BARBOZA, D.C.P.M.; UZÉDA, R.S.; ALCÂNTARA, A.C.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M.B.; GONDIM, L.F.P.; FRANKE, C.R. Prevalence of ehrlichial infection among dogs and ticks in Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.19, n.2, p.89-93, 2010.

SOUZA, C.E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWAŁSKA, M.; UCHOA, F.C.; HORTA, M.C.; SOUZA, S.S.L.; BORBA, R.C.M.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v.161, n.1-2, p.116-121, 2009.

SOUZA, C.E.; PINTER, A.; DONALISIO, M.R. Risk factors associated with the transmission of Brazilian spotted fever in the Piracicaba river basin, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.48, n.1, p.11-17, 2015.

STICH, R.W.; SCHAEFER, J.J.; BREMER, W.G.; NEEDHAM, G.R.; JITTAPALAPONG, S. Host surveys, ixodid tick biology and transmission scenarios as related to the tick-borne pathogen, *Ehrlichia canis*. **Veterinary Parasitology**, v.158, n.4, p.256-273, 2008.

STUEN, S.; GRANQUIST, E.G.; SILAGHI, C. *Anaplasma phagocytophilum* — a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p.1-33, 2013.

SZABÓ, M.P.J. LABRUNA, M.B.; CASTAGNOLLI, K.C.; GARCIA, M.V.; PINTER, A.; VERONEZ, V.A.; MAGALHÃES, G.M.; CASTRO, M.B.; VOGLIOTTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 4, p. 339-346, 2006.

SZABÓ, M.P.J.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, p.1-9, 2013.

VINCZE, T., POSFAI, J., ROBERTS, R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 3688-91, 2003.

WEBB, L.; CARL, M.; MALLOY, D.C.; DASCH, G.A.; AZAD, A.F. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 530-534, 1990.

WRIGHT, C.; GAFF, H.D.; HYNES, W.L. Prevalence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Ehrlichia ewingii* in *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis* collected from southeastern Virginia, 2010–2011. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, n.6, p.978-982, 2014.

ZHANG, L.; LIU, H.; XU, B.; LU, Q.; LI, L.; CHANG, L; ZHANG, X.; FAN, D.; LI, G.; JIN, Y.; CUI, F.; SHI, Y.; LI, W.; XU, J.; YU, X.J. *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Domestic Animals in Ten Provinces/Cities of China. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, n.1, p.185-189, 2012.