

Universidade Federal de Juiz de Fora
Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Frederico Rodrigues Ramalho

Rickettsia rickettsii EM *Amblyomma sculptum* BERLESE, 1888 (IXODIDA: IXODIDAE)
EM ÁREA DE TRANSIÇÃO ENTRE O BIOMA CERRADO E MATA ATLÂNTICA,
ENDÊMICA PARA FEBRE MACULOSA, NO SUDESTE DO BRASIL

Juiz de Fora

2017

Frederico Rodrigues Ramalho

***Rickettsia rickettsii* EM *Amblyomma sculptum* BERLESE, 1888 (IXODIDA: IXODIDAE)
EM ÁREA DE TRANSIÇÃO ENTRE O BIOMA CERRADO E MATA ATLÂNTICA,
ENDÊMICA PARA FEBRE MACULOSA, NO SUDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Comportamento e Biologia Animal.

Orientador: Professor Doutor Gilberto Salles Gazêta

Co-orientador: Professor Doutor Erik Daemon de Souza Pinto

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática
da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Ramalho, Frederico Rodrigues.

Rickettsia rickettsii EM *Amblyomma sculptum* BERLESE, 1888 (IXODIDA:
IXODIDAE) EM ÁREA DE TRANSIÇÃO ENTRE O BIOMA CERRADO E MATA
ATLÂNTICA, ENDÊMICA PARA FEBRE MACULOSA, NO SUDESTE DO
BRASIL / Frederico

Rodrigues Ramalho. -- 2017.

54 f. : il.

Orientador: Gilberto Salles Gazêta

Coorientador: Erik Daemon

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora,
Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências
Biológicas: Comportamento Animal, 2017.

1. Febre Maculosa. 2. Carrapato. 3. Bioma. 4. Rickettsiose. 5. Ciclo Epidêmico.
I. Gazêta, Gilberto Salles, orient. II. Daemon, Erik, coorient. III. Título.

Frederico Rodrigues Ramalho

***Rickettsia rickettsii* EM *Amblyomma sculptum* BERLESE, 1888 (IXODIDA: IXODIDAE)
EM ÁREA DE TRANSIÇÃO ENTRE O BIOMA CERRADO E MATA ATLÂNTICA,
ENDÊMICA PARA FEBRE MACULOSA, NO SUDESTE DO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração em Comportamento e Biologia Animal.

Aprovado em 20 de Fevereiro de 2017.

Banca Examinadora

Doutor Gilberto Salles Gazêta (Orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora
Fundação Oswaldo Cruz

Doutor Erik Daemon de Souza Pinto (Co-orientador)
Universidade Federal de Juiz de Fora

Doutor Marcus Vinicius Xavier Senra
Universidade Federal de Juiz de Fora

Doutor Vinícius Figueiredo Vizzoni
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Agradecimentos

À minha família por todo apoio, para que eu pudesse me dedicar exclusivamente a esse projeto. Ao meu pai Lauro, minha mãe Mônica e a minha irmã Simone, muito obrigado!

À Liliane, por conceder minha participação em todas as fases do seu trabalho de mestrado, dando bases importantes para a realização do meu próprio trabalho. Além da ajuda (grande) direta no meu mestrado!

À Karla Bitencourth Garcia pela enorme disponibilidade em doar parte do seu tempo para revisar meus escritos. Paciência por ensinar e acompanhar todos meus passos no laboratório.

A todos os professores do programa de mestrado, que através de suas disciplinas me ensinaram coisas importantes que se acham presentes nesse trabalho.

Em especial ao professor Doutor Gilberto por ter me aceito como seu orientado, contribuindo para meu crescimento e dando alicerces para confecção deste.

Aos colegas de turma, pela companhia durante o percurso, sugestões e ensinamentos.

A todos que me acolheram no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Rickettsias (LIRN), em especial a professora Doutora Marinete Amorim e Ms. Karen Medeiros Cardoso.

Finalizo agradecendo a Universidade Federal de Juiz de Fora, em seu Programa de Pós Graduação em Comportamento e Biologia Animal, pelos laboratórios, salas de aula, professores e auxílio financeiro. À CAPES pela bolsa concedida!

Resumo

A Febre Maculosa é uma doença infecciosa aguda, causada por bactérias do gênero *Rickettsia* e transmitida pela picada de carrapatos infectados. Não transmitida de pessoa a pessoa, sendo humanos hospedeiros acidentais dentro da cadeia ecoepidemiológica. A evolução da doença pode ocorrer de forma assintomática, sintomatologia discreta até formas graves com elevada taxa de letalidade.

O presente trabalho objetiva elucidar a ecoepidemiologia da doença no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil, que possui ocorrência da doença, inclusive com óbito. Foram analisadas áreas predispostas (presença de humanos, hospedeiros vertebrados e carrapatos positivos) e áreas de transmissão (casos de FM confirmados).

Quatro áreas foram escolhidas para coleta, duas de transmissão e duas predispostas, todas pertencentes à mancha de transição entre bioma Cerrado e Mata Atlântica.

Foram coletados 5.706 carrapatos com padrão sazonal bem definido, tendo maior incidência de larvas no outono e inverno, ninfas na primavera e adultos no verão. Os espécimes foram identificados através de chaves dicotômicas específicas e através de biologia molecular, sendo todos da espécie *Amblyomma sculptum*. Alíquotas foram destinadas a ensaios moleculares para detecção de *Rickettsia* spp. resultando em uma fêmea positiva para *Rickettsia rickettsii* para os genes *gltA* (gênero *Rickettsia*) e *ompA* (Grupo da Febre Maculosa), fato este demonstrado pela primeira vez no referido município. Reforçando a importância de mais estudos e atenção da vigilância epidemiológica nessas áreas.

Palavras-chave: Febre maculosa, Carrapato, Bioma, Rickettsiose, Ciclo Epidêmico.

Abstract

Spotted Fever is an acute infectious disease caused by bacteria of the genus *Rickettsia* and transmitted by the bite of infected ticks. Not transmitted from person to person, being accidental human hosts within the ecoepidemiological chain. The evolution of the disease can occur asymptotically, discrete symptomatology to severe forms with a high lethality rate.

The present study aims to elucidate the epidemiology of the disease in the municipality of Divinópolis, Minas Gerais, Brazil, which has an occurrence of the disease, including death. Predisposing areas (presence of humans, vertebrate hosts and positive ticks) and transmission areas (confirmed SF cases) were analyzed.

Four areas were selected for collect, two for transmission and two predisposed, all belonging to the transition spot between Cerrado and Atlantic Forest.

A total of 5.706 ticks were collected with a well defined seasonal pattern, with a higher incidence of larvae in autumn and winter, nymphs in spring and adults in summer. Specimens were identified through specific dichotomous keys and through molecular biology, all of them being *Amblyomma sculptum*. Aliquots were assigned to molecular assays for the detection of *Rickettsia* spp. resulting in a female positive for *Rickettsia rickettsii* for the genes *gltA* (genus *Rickettsia*) and *ompA* (Spotted Fever Group), a fact that was demonstrated for the first time in said municipality. Reinforcing the importance of further epidemiological surveillance studies and attention in these areas.

Keywords: Spotted fever, Tick, Biome, Rickettsiosis, Epidemic Cycle.

Lista de Figuras

- Figura 1:** *Rickettsia rickettsii* parasitando células do endotélio vascular de mamífero, corada pela técnica de Giemsa. (Fonte:cdc.gov/ncidod/dvrd/rmsf/images/rick-ihc.jpg)..... 15
- Figura 2:** Espécie de carrapato *Amblyomma sculptum*, sendo: (A) macho e (B) fêmea. (Fonte: Nava *et al.*, 2014) 17
- Figura 3:** Dinâmica sazonal do *Amblyomma sculptum* no Sudeste brasileiro. (Fonte: Vieira *et al.*, 2004)..... 18
- Figura 4:** (A) Biomas terrestres brasileiros; (B) Município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil; (C) Imagem de satélite do município de Divinópolis com destaque para as áreas de coletas de carrapatos. (Fonte: Google Maps, 2016; Prefeitura Municipal de Divinópolis, 2016)..... 20
- Figura 5:** Área 1: Área de transmissão onde foram coletados carrapatos para caracterização e detecção de *Rickettsia* spp. 21
- Figura 6:** Área 2: Área de transmissão onde foram coletados carrapatos para caracterização e detecção de *Rickettsia* spp. Trilhas a cerca de 5m do Rio Itapeçerica. Em destaque fezes de capivara..... 22
- Figura 7:** Área 3: Área predisposta onde foram coletados carrapatos para caracterização e detecção de *Rickettsia* spp. Em destaque fezes de capivara e seta destacando o Rio Itapeçerica..... 22
- Figura 8:** Área 4: Área predisposta onde foram coletados carrapatos para caracterização e detecção de *Rickettsia* spp. Lote vago com presença de entulho, cavalos de trabalho e carrapatos..... 23
- Figura 9:** (A) Arrasto de flanela sobre a vegetação para coleta de carrapatos e (B) Medidas para confecção do arrasto. 25
- Figura 10:** (A) Inspeção da flanela para coleta dos carrapatos que se aderiram a ela e (B) Caminho percorrido com o arrasto. 25
- Figura 11:** (A) Armadilha de CO₂ montada na área de coleta de carrapatos sobre flanela e (B) (C) Armadilha esquematizada. 26
- Figura 12:** (A) Ácido Lático e (B) Carbonato de Cálcio utilizados na armadilha de CO₂. 27

Figura 13: Identificação de carrapatos realizada no Laboratório I do prédio de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.	28
Figura 14: Aplicação das amostras extraídas de DNAg para quantificação de DNA em espectôfotometro.	29
Figura 15: (A) Eletroforese. (B) Imagem do gel de agarose obtida através do scanner de gel.	30
Figura 16: Distribuição sazonal dos estádios dos carrapatos coletados na cidade de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.	35
Figura 17: Filogenia inferida por análise de Máxima Verossimilhança, de sequências parciais do gene mitocondrial 12S rDNA (395pb), representando as relações entre as amostras coletas e as espécies do complexo <i>Amblyomma cajennense</i> , de diferentes locais das Américas. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% <i>cut-off</i>).	36
Figura 18: Filogenia inferida por análise de Máxima Verossimilhança, de sequências parciais do gene mitocondrial COII (490pb), representando as relações entre amostras coletas e espécies do complexo <i>Amblyomma cajennense</i> de diferentes locais das Américas. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% <i>cut-off</i>).	37
Figura 19: Inferência filogenética baseada nas sequências de nucleotídeos de fragmento do gene <i>gltA</i> (382 pb) de <i>Rickettsia</i> , construída através de análise de Máxima Verossimilhança. Os números nos ramos indicam o valor de suporte, baseado no teste aLRT com 1000 réplicas (70% <i>cut-off</i>). Os números de acesso do <i>GenBank</i> das sequências analisadas são indicados nos parênteses. Árvore foi enraizada por <i>midpoint rooting</i>	38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Data das coletas de carrapatos nas quatro áreas investigadas no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.	23
Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para pesquisa de genes de <i>Rickettsia</i>	29
Tabela 3: Ciclos da PCR para os oligonucleotídeos <i>gltA</i> , <i>ompA</i> , <i>ompB</i> e <i>geneD</i>	30
Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para pesquisa de genes de carrapatos.....	31
Tabela 5: Ciclos da PCR para os oligonucleotídeos 12S rDNA e COII.....	31
Tabela 6: Amostras com seus respectivos estádios de desenvolvimento, gene utilizado e números de acesso <i>GeneBank</i>	32
Tabela 7: Carrapatos coletados através do arrasto de flanela e armadilha de CO ₂ no período de fevereiro a novembro de 2015 em Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.	34

Lista de Abreviaturas e Siglas

%	Por cento
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
aLRT	<i>Approximate Likelihood Ratio Test</i> - Teste Razão Aproximado de Verossimilhança
C ₃ H ₆ O ₃	Ácido Lático
CaCO ₃	Carbonato de Cálcio
cm	Centímetro
CO ₂	Gás Carbônico
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucléico
DNase	<i>Desoxyribonuclease</i> Nase – Quebra do Ácido Desoxirribonucléico
DNAg	<i>genomic Desoxyribonucleic Acid</i> - Ácido Desoxirribonucléico genômico
dNTP	<i>Deoxynucleotidetriphosphates</i> – Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
<i>e.g.</i>	Por exemplo
<i>et al.</i>	E colaboradores
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FM	Febre Maculosa
FMB	Febre Maculosa Brasileira
g	Gramma
GA	Grupo Ancestral
GFM	Grupo Febre Maculosa
GT	Grupo Tifo
h	Hora
HCl	Ácido Clorídrico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
kDa	Kilodalton
Km	Quilômetro
L	Litro
LIRN	Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses
LPI	Local de Provável Infecção
m	Metro
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
n°	Número
N ₂	Nitrogênio
NaCl	Cloreto de Sódio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
pmol	Picomoles
RMSF	<i>Rocky Mountain Spotted Fever</i> – Febre das Montanhas Rochosas
rpm	Rotação por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> - Dodecil Sulfato de Sódio
sp.	Espécie
spp.	Espécies
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
<i>Taq</i>	<i>Thermusaquaticus</i>
TAE	Tris-acetato-EDTA

Sumário

1	Introdução	13
2	Revisão de Literatura	15
3	Objetivos	19
3.1	Objetivo Geral	19
3.2	Objetivos Específicos	19
4	Material e Métodos	20
4.1	Área de Estudo	20
4.1.1	Área 1	21
4.1.2	Área 2	21
4.1.3	Área 3	22
4.1.4	Área 4	23
4.2	Metodologia de Coleta	23
4.2.1	Esforço Amostral	24
4.2.2	Coleta de Vetores	24
4.2.2.a	Arrasto de Flanela	24
4.2.2.b	Armadilha de Gás Carbônico (CO₂)	26
4.2.2.c	Busca Visual	27
4.3	Identificação Taxonômica dos Carrapatos	27
4.4	Ensaio Molecular	28
4.4.1	Extração de DNAg	28
4.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	29
4.4.2.a	Deteccão de <i>Rickettsia</i> spp.	29
4.4.2.b	Identificação Molecular dos Carrapatos	31
4.4.3	Purificação e Sequenciamento	31
4.4.4	Análise das Sequências	32
4.4.5	Análise Filogenética	33
5	Resultados	34
6	Discussão	39
7	Considerações Finais	42
8	Conclusão	43
	Referências Bibliográficas	44
	Anexo A	54

1 Introdução

Rickettsia é um gênero de bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, responsável por várias doenças conhecidas como rickettsioses que podem ser zoonoses e são mundialmente distribuídas e transmitidas ao homem por meio da picada de artrópodes ápteros hematófagos (ácaro, carrapato, pulga e piolho) (Pascale, 1946; Acha e Szyfres, 1986; Parola *et al.*, 2013).

O Brasil apresenta histórico de doença rickettsial desde a década de 20, com casos notificados e confirmados em todas as regiões do país (Piza, 1932; Lemos *et al.*, 1997; Oliveira *et al.*, 2016b). *Rickettsia rickettsii* é o agente mais severo e letal das rickettsioses humanas e, no Brasil, produz uma doença grave, denominada Febre Maculosa Brasileira (FMB), possui alto índice de morbimortalidade, com bioagente mais letal para humanos depois do vírus da raiva (Lemos, 1991; Barci e Nogueira, 2005; Labruna e Machado, 2006), ocorrendo na região Sudeste e parte da região Sul (Oliveira *et al.*, 2016a, b). É reconhecidamente transmitida por *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (= *Amblyomma cajennense*, Nava *et al.* 2014) em área de Cerrado e parte antropizada da Mata Atlântica, podendo envolver em seu ciclo a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) e equino (*Equus caballus* Linnaeus, 1758). *Amblyomma aureolatum* Pallas, 1772 é também transmissor de *R. rickettsii* em áreas de Mata Atlântica preservada, tendo o cão doméstico (*Canis familiaris* Linnaeus, 1766) como principal vertebrado envolvido. Já *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, de caráter mais brando, ocorre em área de Mata Atlântica na região Sul, Nordeste e no Estado de São Paulo, sendo *Amblyomma ovale* (Kock, 1844) incriminado pela transmissão, e o cão como principal hospedeiro vertebrado envolvido (Szabó *et al.*, 2013; Moerbeck *et al.*, 2016).

De 2007 a 2015, o Brasil apresentou casos confirmados de Febre Maculosa (FM) em 12 Estados: São Paulo (n = 550, 44.2%), Santa Catarina (n = 276, 22.2%), Minas Gerais (n = 104, 8.5%), Rio de Janeiro (n = 90, 7.2%), Espírito Santo (n = 32, 2.5%), Paraná (n = 25, 2.0%), Ceará (n = 11, 0.9%), Rio Grande do Sul (n = 9, 0.7%), Goiás (n = 7, 0.5%), Bahia (n = 4, 0.3%), Mato Grosso do Sul (n = 4, 0.3%) e Rondônia (n = 1, 0.1%) (Oliveira *et al.*, 2016b).

O Estado de Minas Gerais registra desde a década de 80 a ocorrência de inúmeros casos da doença na forma de epidemias. É o segundo Estado com maior número de óbitos, porém por conter três biomas distintos (Cerrado, Mata Atlântica e Caatinga), a

ecoepidemiologia é pouco conhecida (Cardoso *et al.*, 2006; Guedes *et al.*, 2011; Soares, 2012; Moerbeck *et al.*, 2016).

O município de Divinópolis encontra-se em área de transição entre o bioma Cerrado e Mata Atlântica. Com oito casos confirmados (quatro apenas em 2016), a cidade possui áreas predispostas (presença de humanos, hospedeiros vertebrados e carrapatos positivos) e áreas de transmissão (casos de FM confirmados) (SUCEN, 2016).

Outros municípios pertencentes à secretaria regional de saúde de Divinópolis registraram nove casos da doença entre 2000 a 2015.

A antropização é um fenômeno amplamente observado nas grandes cidades, fato este que também ocorre em Divinópolis e municípios adjacentes, criando assim, recente relação entre humanos, animais e parasitos, dando origem a novos nichos ecológicos na cadeia de transmissão de patologias (Corrêa e Passos, 2001), como as rickettsioses.

Este fenômeno propicia contato estreito entre homens e seus animais domésticos com animais silvestres em seu habitat, resultando em surtos epidêmicos de zoonose por disseminação de animais susceptíveis e o aumento da propagação espacial da doença (Barlett e Judge, 1997). Como a FM é infecção típica de vetores e de seus hospedeiros naturais e reservatórios, a transmissão para o homem dá-se de maneira acidental, não tendo nenhuma importância na manutenção da infecção na natureza (Lemos, 1996; Lemos, 2005).

Perante o exposto, o objetivo do presente estudo foi analisar biodiversidade de vetores e realizar pesquisa de *Rickettsia* sp. em áreas predispostas e de transmissão no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

2 Revisão de Literatura

As rickettsias pertencem ao filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales, Família Rickettsiaceae, gênero *Rickettsia* (ncbi, 2017). As rickettsias patogênicas são bactérias Gram-negativas, sem motilidade e apresentam polimorfismo (cocóides, cocobacilares, e a mais comum, a forma de pequenos bacilos), medem aproximadamente 0,3 a 0,5 μ m de diâmetro por 0,8 a 2,0 μ m de comprimento, não se corando pelo Gram, e sim pelas técnicas de coloração de Giménez ou Giemsa; são parasitos intracelulares obrigatórios, podendo se localizar no citoplasma da célula hospedeira (e.g. Gimenez, 1964; Burgdorfer, 1970; Elisberg e Bozeman, 1979; Weiss e Moulder, 1984; Walker e Dasch, 1994; Billings *et al.*, 1998; Eremeeva e Dasch, 2000; Dumler *et al.*, 2001; Yu e Walker, 2003; Souza *et al.*, 2004; Lemos, 2005; Raoult *et al.*, 2005; Greene e Breitschwerdt, 2006; Valbuena e Walker, 2006).

A composição de sua parede celular apresenta lipopolissacarídeos, peptídeoglicanos, *Outher Membrane Protein B (ompB)* de 135kDa e de *Outher Membrane Protein A (ompA)* 190kDa, específica para as rickettsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) (Elisberg e Bozeman, 1979; Weiss e Moulder, 1984; Olson e McDade, 1994; Walker e Bouyer, 2003; Lemos, 2005) (Figura 1).

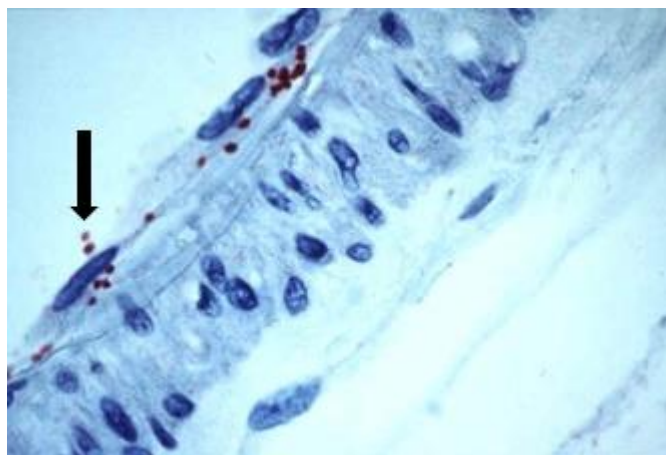


Figura 1: *Rickettsia rickettsii* parasitando células do endotélio vascular de mamífero, corada pela técnica de Giemsa. (Fonte:cdc.gov/ncidod/dvrd/rmsf/images/rick-ihc.jpg)

As espécies são classificadas entre as subdivisões: Grupo Tifo (GT) – composto por *Rickettsia prowazekii* transmitida por piolhos (Tifo Epidêmico) e *Rickettsia typhi* veiculada por pulgas (Tifo Murino), de ampla distribuição mundial; Grupo Ancestral (GA) – composto por bactérias de patogenicidade desconhecida, que inclui *Rickettsia canadensis* e *Rickettsia*

belli; GFM – composto por *Rickettsia parkeri* (carrapato), *Rickettsia rickettsii* (carrapato), entre outras e Grupo de Transição – composto por *Rickettsia felis* entre outras (Stothard *et al.*, 1994; Roux *et al.*, 1997; Roux e Raoult, 2000).

As rickettsioses causadas por organismos do Gênero *Rickettsia*, são zoonoses presentes em todos os continentes e estão associadas a diversos grupos de artrópodes. São mantidas na natureza em focos endêmicos, mas podem causar surtos epidêmicos na população humana. A doença apresenta febre aguda, podendo conduzir o indivíduo infectado à morte se não for tratado precocemente (Raoult e Roux, 1997; Azad e Beard, 1998).

A *R. rickettsii* é a principal representante do GFM no Brasil, tendo como principal hospedeiro invertebrado os carrapatos do Gênero *Amblyomma*; porém outros Gêneros, como por exemplo *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, podem servir de hospedeiros invertebrados, como também a pulga e o piolho (Galvão *et al.*, 2006; Gehrke *et al.*, 2009; Gehrke, 2010; Moura, 2011).

Casos humanos de infecção por *Rickettsia* sp. têm sido descritos em vários países da América do Sul nos últimos vinte anos (Galvão *et al.*, 2006). No Brasil em 1929, pela primeira vez, a FMB foi reconhecida por José Toledo Piza no Estado de São Paulo, em áreas circunscritas às regiões suburbanas da capital, onde atualmente são os Bairros de Sumaré e Perdizes; ainda neste ano, Piza deu início à diferenciação da FMB dentre outras doenças exantemáticas no Brasil, exibindo sua similaridade com *Rocky Mountain Spotted Fever* (RMSF) descrita pelos norte-americanos. (*e.g.* Piza, 1932; Dias e Martins, 1939; Magalhães, 1952; Tiriba, 1972; Silva e Galvão, 2004).

Estudo realizado em foco peri-urbano no Vale do Rio Doce, Minas Gerais, focam características epidemiológicas de casos suspeitos e confirmados de FMB nos anos 80 e 90 e cita diversos municípios desse Estado que apresentaram tais relatos (Galvão *et al.*, 2006).

Os anos 90 e o início dos anos 2000 foram caracterizados pela efetivação de múltiplos inquéritos soros-epidemiológicos na população humana e animal nos Estados de Minas Gerais (Galvão *et al.*, 2002; Galvão *et al.*, 2003), Rio de Janeiro, São Paulo (Lemos *et al.*, 1996; Del Guercio *et al.*, 1997) e Espírito Santo (Sexton *et al.*, 1993), os quais apontaram Minas Gerais como sendo o Estado com maior prevalência de FMB (Lemos *et al.*, 1994; Galvão, 1996; Calic *et al.*, 1998), como também São Paulo (Melles *et al.*, 1992; Lemos *et al.*, 1996; Lemos *et al.*, 2001).

Os carrapatos são considerados o segundo maior grupo de transmissores de patógenos (vírus, bactérias, protozoários e helmintos) para animais e homens, sendo superados apenas pelos culicídeos (Balashov, 1972; Schwan, 1996, Labruna, 2004).

O *A. sculptum* é conhecido popularmente como “carrapato do cavalo”, “carrapato estrela” ou “carrapato rodolego”. Devido seu comportamento eclético, tem capacidade de parasitar diversas espécies de hospedeiros, sendo frequentemente visto parasitando humanos em suas fases larvária e ninfal, as quais são vulgarmente denominadas de “micuim” ou “carrapatinho” e “carrapato pólvora” ou “vermelhinho”, respectivamente (e.g. Travassos e Vallejo-Freire, 1944-1945; Magalhães, 1952; Aragão e Fonseca, 1961; Serra-Freire, 1991; Lemos *et al.*, 1997; Barci e Nogueira, 2005; Souza *et al.*, 2006) (Figura 2).

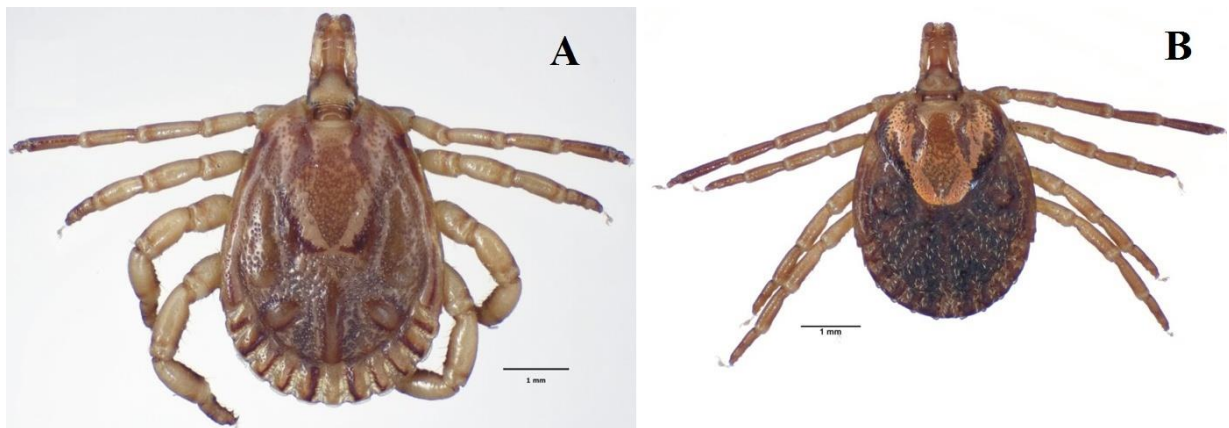


Figura 2: Espécie de carrapato *Amblyomma sculptum*, sendo: (A) macho e (B) fêmea. (Fonte: Nava *et al.*, 2014)

Os hospedeiros primários desse vetor são os cavalos, antas (*Tapirus terrestres* Linnaeus, 1758) e capivaras (Aragão, 1936; Souza *et al.*, 2006), e para que se haja o pronto estabelecimento da população desse artrópode, é necessário dois pré-requisitos: presença de hospedeiros primários e condições ambientais favoráveis à fase não parasitária (Vieira *et al.*, 2004). Essa população se estabelece em regiões de pastos sujos, locais em que a vegetação densa estabelece microclima adequado (Oliveira, 2004; Vieira *et al.*, 2004).

A ocorrência de numerosas populações do *A. sculptum* nas áreas endêmicas para FMB é um achado comum. Completa uma geração por ano no Sudeste brasileiro, com os estádios bem definidos durante o ano (Souza, 1990, Oliveira, 1998). As larvas predominam de abril a julho, as ninfas de julho a novembro e os adultos de novembro a março (Labruna *et al.*, 2002) (Figura 3).

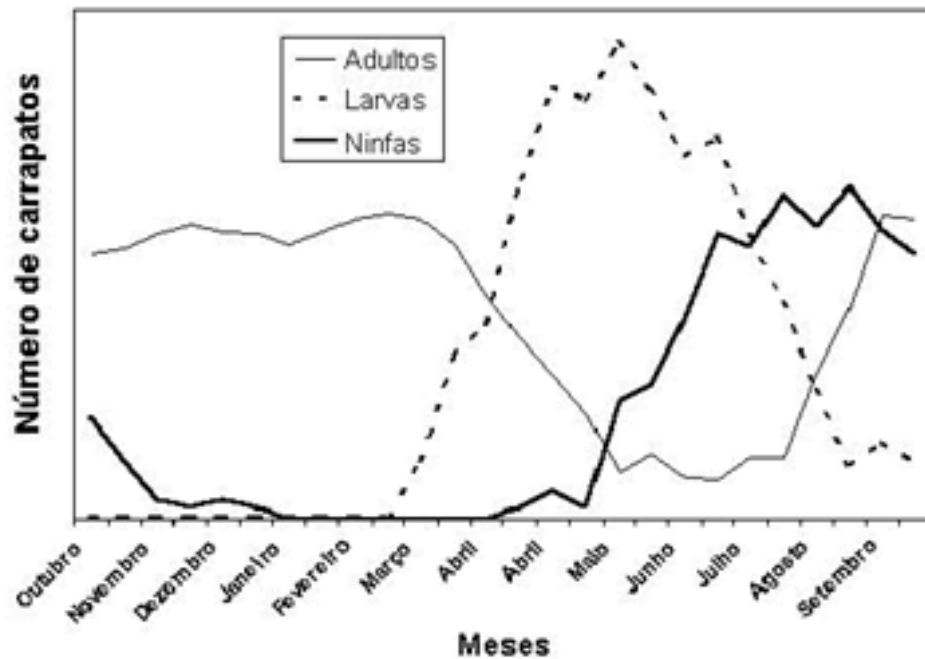


Figura 3: Dinâmica sazonal do *Amblyomma sculptum* no Sudeste brasileiro. (Fonte: Vieira *et al.*, 2004)

A doença possui prevalência sazonal definida, apresentando números de casos mais abundantes de setembro a novembro, abrangendo a primavera e início do verão (Dias e Martins, 1939; Galvão, 1996; Lemos *et al.*, 1997; Vieira *et al.*, 2004; Guedes e Leite, 2008).

Para identificação de infecção por *Rickettsia* sp. são utilizados métodos moleculares. A Reação em Cadeia da Polimerase – *Polymerase Chain Reaction* (PCR) – proporciona ensaios rápidos, sensíveis e altamente específicos para detecção destas (Azad, 1990). Além de permitir posterior realização do sequenciamento de nucleotídeos do gene amplificado. Assim a identificação molecular adjunta ao sequenciamento tornaram-se o método de eleição, vastamente utilizada em inquéritos epidemiológicos ou surtos, para precoce identificação e análise filogenética das diferentes espécies de *Rickettsia* (Regnery *et al.*, 1991; La Scola e Raoult, 1997), que são realizados em laboratórios de referência, como por exemplo o Laboratórios de Referência Nacional em Vetores das Rickettsioses (LIRN) no Instituto Oswaldo Cruz (IOC) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

- Analisar a circulação de rickettsias em áreas de transmissão e predispostas à FM, em ambiente de transição entre o bioma cerrado e Mata Atlântica, no Estado de Minas Gerais/Brasil.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a espécie de *Rickettsia* spp. circulante nas áreas de estudo.
- Avaliar aspectos epidemiológicos de *Rickettsia* spp. circulante e artrópodes vetores.
- Determinar a biodiversidade de vetores nas áreas de estudo.

4 Material e Métodos

4.1 Área de Estudo

A pesquisa foi realizada no município de Divinópolis (20° 8' 21" latitude sul e 44° 53' 17" longitude oeste), localizado a 121 km de distância da capital Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil (IBGE, 2016).

As áreas selecionadas são de transição entre bioma Cerrado e Mata Atlântica, com fragmentos de mata antropizados, pastos sujos e mata ciliar, próximas à cursos d'água, com presença de hospedeiros sentinelas (cão e equino), hospedeiros amplificadores (capivara), outros animais silvestres e da população humana, todos com livre acesso e em contato estreito entre si. São áreas destinadas ao lazer – quadras poliesportivas, pista de *Cooper* e skate, trilhas – bem como para o trabalho – carroceiros. (Figura 4).

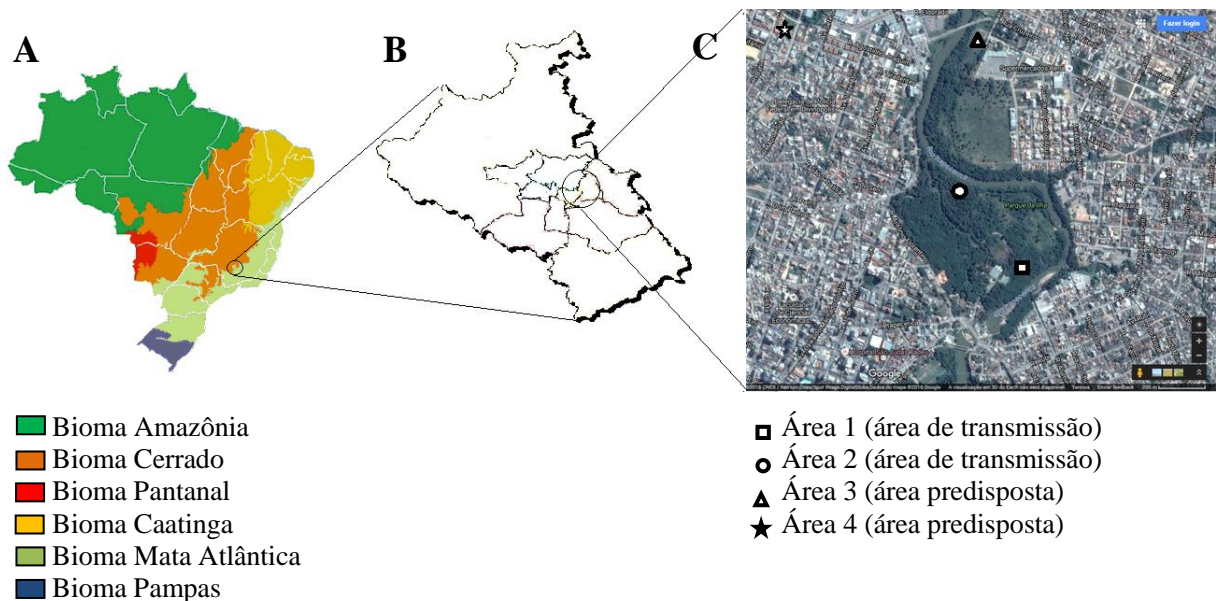


Figura 4: (A) Biomas terrestres brasileiros; (B) Município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil; (C) Imagem de satélite do município de Divinópolis com destaque para as áreas de coletas de carrapatos. (Fonte: Google Maps, 2016; Prefeitura Municipal de Divinópolis, 2016)

Das quatro áreas de vulnerabilidade¹ para FM escolhidas, três estão situadas às margens do Rio Itapecerica e uma afastada, em trechos que cortam a região urbana da cidade.¹

¹ vulnerabilidade: alto número de notificações do estado, com casos ocorrentes no perímetro urbano, que detém elevada densidade populacional, área de preservação, ocupação de áreas limítrofes com fragmento de mata, possibilitando o intercâmbio de artrópodes vetores com mamíferos hospedeiros, ambientes esses que propiciam a desenvolvimento e mantimento dos ciclos enzoótico e epidêmico para FM

4.1.1 Área 1

O Parque Ecológico Doutor Sebastião Gomes Guimarães é uma região considerada como Local de Provável Infecção (LPI) pela secretaria municipal de saúde de Divinópolis. É apelidado como Parque da Ilha por ser rodeada pelo Rio Itapecerica. Local para lazer e prática de atividades esportivas, onde a população tem hábito de fazer caminhadas, muitas vezes com seus cães, numa trilha próximo ao rio. Possui ainda quadras poliesportivas e pista de skate, estreitando contato da população e de animais domésticos com áreas de mata ciliar, capivaras e carrapatos (Figura 5).



Figura 5: Área 1: Área de transmissão onde foram coletados carrapatos para caracterização e detecção de *Rickettsia* spp.

4.1.2 Área 2

Assim como a Área 1, também se localiza no ‘Parque da Ilha’ e é um LPI, porém em uma região mais afastada do centro de lazer. Embora seja mais isolada e de difícil acesso, ainda assim há presença de pessoas nas trilhas rudimentares existentes, aumentando o risco de contato com carrapatos (Figura 6).



Figura 6: Área 2: Área de transmissão onde foram coletados carrapatos para caracterização e detecção de *Rickettsia* spp. Trilhas a cerca de 5m do Rio Itapecerica. Em destaque fezes de capivara.

4.1.3 Área 3

Campo de futebol aberto à população como área de lazer nos finais de semana. Dista da margem do Rio Itapecerica cerca de 5m. Encontra-se nesse ambiente: capivaras, equinos, carrapatos e trânsito de pessoas, sendo caracterizada como área predisposta (Figura 7).



Figura 7: Área 3: Área predisposta onde foram coletados carrapatos para caracterização e detecção de *Rickettsia* spp. Em destaque fezes de capivara e seta destacando o Rio Itapecerica.

4.1.4 Área 4

Área de pasto sujo, onde carroceiros deixam equinos de trabalho pastando. Embora não fique perto da margem do rio e não tenha presença de capivaras, é preciso levar em consideração que os cavalos tem acesso, durante o trabalho, a diversos pontos da cidade, disseminando carrapatos, inclusive em matas ciliares (Figura 8).



Figura 8: Área 4: Área predisposta onde foram coletados carrapatos para caracterização e detecção de *Rickettsia* spp. Lote vago com presença de entulho, cavalos de trabalho e carrapatos.

4.2 Metodologia de Coleta

Em cada uma das quatro áreas foi realizada uma coleta por estação climática (verão, primavera, outono e inverno), totalizando 16 coletas feitas no auge de cada, nos dias 4, 5 e 6 dos meses de fevereiro, maio, julho e novembro de 2015, respectivamente (Tabela 1).

Tabela 1: Data das coletas de carrapatos nas quatro áreas investigadas no município de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

	Verão	Outono	Inverno	Primavera
Área 1	1ª coleta (4/2/16)	2ª coleta (4/5/16)	3ª coleta (4/7/16)	4ª coleta (4/11/16)
Área 2	1ª coleta (4/2/16)	2ª coleta (4/5/16)	3ª coleta (4/7/16)	4ª coleta (4/11/16)
Área 3	1ª coleta (5/2/16)	2ª coleta (5/5/16)	3ª coleta (5/7/16)	4ª coleta (5/11/16)
Área 4	1ª coleta (6/2/16)	2ª coleta (6/5/16)	3ª coleta (6/7/16)	4ª coleta (6/11/16)

4.2.1 Esforço Amostral

Para padronizar as coletas nas diferentes áreas, foi estipulado o tempo de coleta em 2h por ambiente. Sendo quatro áreas de coletas realizadas quatro vezes em cada área (uma vez por estação climática), totalizou-se 32 horas de esforço de captura para cada método (2 utilizados). Esforço total de 64 horas.

4.2.2 Coleta de Vetores

No total, foram realizadas 16 coletas de campo em quatro áreas (área 1 e 2 – área de transmissão, área 3 e 4 – área predisposta), não sendo feita coletas em hospedeiros, apenas na vegetação. Os potenciais vetores foram coletados através do arrasto de flanela branca (Oliveira *et al.*, 2000), armadilha de Gás Carbônico (CO₂) (Butler *et al.*, 1984) e inspeção visual; sendo posteriormente acondicionados em microtubos contendo álcool isopropílico.

4.2.2.a Arrasto de Flanela

Uma das técnicas utilizadas para coleta de carrapatos é o arrasto de flanela branca sobre a vegetação. A técnica desenvolvida por Oliveira (1998) e Oliveira *et al.* (2000) consiste em: uma flanela branca tendo 1,50m de comprimento por 0,80m de largura, fixada em duas hastes de madeira de 1,20m de comprimento em cada extremidade da flanela e uma corda de Nylon® de 2,5m de comprimento para amarrar em uma das hastes para que pudesse ser deslizada sobre a vegetação (Figura 9).



Figura 9: (A) Arrasto de flanela sobre a vegetação para coleta de carrapatos e (B) Medidas para confecção do arrasto.

Para padronizar as coletas nas diferentes áreas, foi estipulado o tempo de 2h por ambiente, como citado no item ‘esforço amostral’, além de um trajeto que abrangesse as áreas estudadas de maneira homogênea. A inspeção da flanela era feita a cada 5 minutos de arrasto (Figura 10).



Figura 10: (A) Inspeção da flanela para coleta dos carrapatos que se aderiram a ela e (B) Caminho percorrido com o arrasto.

4.2.2.b Armadilha de Gás Carbônico (CO₂)

A técnica da armadilha de CO₂ descrita por Butler *et al.* (1984) e adaptada por Cançado (2006) se baseia na reação química entre o carbonato de cálcio (CaCO₃) e o ácido láctico (C₃H₆O₃), produzindo CO₂ que atrai o carrapato. Ficou exposta por 2h em cada ambiente e era visitada a cada 30 minutos.

Para confecção da armadilha, foram utilizadas duas vasilhas plásticas de aproximadamente 1L de volume (7cm de altura X 13,5cm de diâmetro), as quais foram sobrepostas e unidas entre si pelo fundo perfurado centralmente da vasilha superior e tampa da inferior, que também continha perfuração central para o perfeito encaixe de um microtubo de plástico de 0,5mL, sem tampa e com um pequeno orifício realizado com agulha (25x7), precisamente fixado nas perfurações supracitadas, funcionando como conector entre as vasilhas, permitindo o gotejamento da vasilha superior (C₃H₆O₃) sobre a inferior (CaCO₃), onde se dá a reação, e a posterior liberação do produto desta, o CO₂, que é lentamente eliminado por perfurações de 5mm de diâmetro em sua lateral, e a 5mm de distância da tampa. Para melhor visualização do carrapato, a armadilha foi posta sobre flanela branca de 1m² (Figura 11).



Figura 11: (A) Armadilha de CO₂ montada na área de coleta de carrapatos sobre flanela e (B) (C) Armadilha esquematizada.

Foi colocado 500 ml de $C_3H_6O_3$ a 20% e 300g de $CaCO_3$. Quantidade suficiente para manter a reação por no mínimo 2h (Figura 12).



Figura 12: (A) Ácido Lático e (B) Carbonato de Cálcio utilizados na armadilha de CO_2 .

4.2.2.c Busca Visual

Ao chegar no ambiente de coleta, algumas gramíneas eram analisadas nas partes de baixo de suas folhas à procura de carrapatos, que por vezes eram encontrados em posição de busca por hospedeiros. Antes de passar o arrasto eram empregados em média 5 minutos por cada área nesta busca visual próximo a trilhas.

4.3 Identificação Taxonômica dos Carrapatos

A identificação dos espécimes coletados foi realizada no Laboratório I do prédio de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), no Estado de Minas Gerais, Brasil. Todos os carrapatos foram mantidos em microtubo contendo álcool isopropílico. Foi utilizado o microscópio estereoscópio com iluminação incidente (Figura 13), separando os espécimes coletados e agrupando-os de acordo com estágio de desenvolvimento, para utilização das chaves dicotômicas propostas por Aragão e Fonseca (1961) e Onofrio *et al.* (2006) para ixodídeos adultos, Martins *et al.* (2010) para ninfas e Amorim e Serra-Freire (1999) para larvas; além dos trabalhos de Nava *et al.*

(2014) e Martins *et al.* (2016) para estas últimas. Para diagnose de larvas, estas foram preparadas permanentemente entre lâminas e lamínulas. Alguns espécimes (sobretudo larvas), preservadas em álcool isopropílico, foram ainda submetidos à PCR para confirmação da espécie.



Figura 13: Identificação de carrapatos realizada no Laboratório I do prédio de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.

Do total de espécimes coletados, 25% foram separados em alíquotas – individualmente (adultos) ou em *pools* (larvas com no máximo dez e ninfas com no máximo cinco) e encaminhados para pesquisa de genes de *Rickettsia* por biologia molecular.

4.4 Ensaios Moleculares

4.4.1 Extração de DNAg

A extração foi realizada no LIRN do IOC da FIOCRUZ no município do Rio de Janeiro, e o Ácido Desoxirribonucléico genômico (*genomico DesoxyribonucleicAcid* – DNAg) foi obtido através da técnica de extração por NaCl (Aljanabi e Martinez, 1997).

Do total extraído, 10% foi submetido à quantificação de DNAg em espectrofotômetro GeneQuant® (Amersham Pharmacia Biotech, Cambrige, Londres), para avaliar a qualidade

do DNAg extraído e posteriormente todos os *templates* foram armazenado à temperatura de -20°C até a próxima etapa, a PCR (Figura 14).

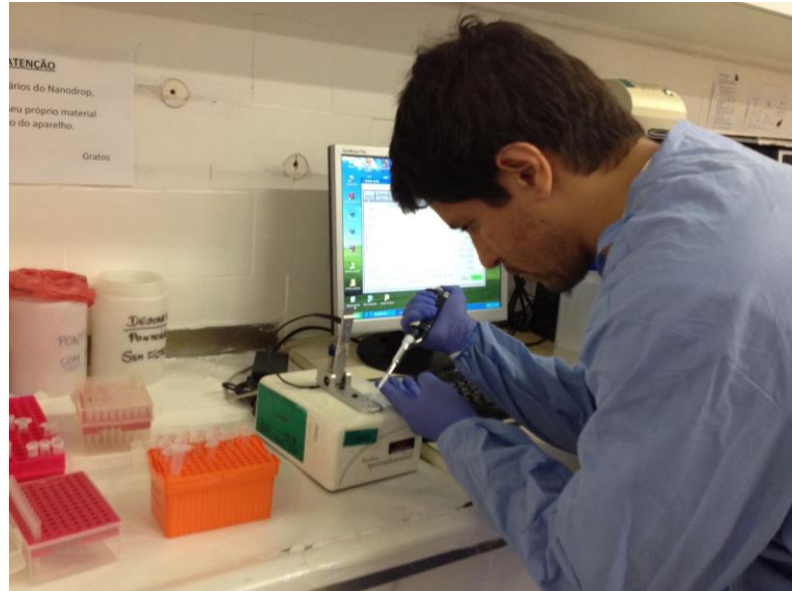


Figura 14: Aplicação das amostras extraídas de DNAg para quantificação de DNA em espectôfotometro.

4.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.4.2.a Detecção de *Rickettsia* spp.

Na PCR foram utilizados oligonucleotídeos gênero-específicos (*gltA*) para detecção de *Rickettsia* spp. (Azad *et al.*, 1990) e grupo-específicos, para detecção de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa (RGFM) (*ompA*), (ambos a 10pmol) (Regnery *et al.*, 1991) (Tabela 2). Como controle positivo foi utilizado DNAg de *R. rickettsii* e como controle negativo água destilada. As amostras positivas foram submetidas novamente à PCR com outros marcadores (*geneD* e *ompB*) para melhor identificação da *Rickettsia* detectada.

Tabela 2: Oligonucleotídeos utilizados para pesquisa de genes de *Rickettsia*.

Genes	Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
<i>ompA</i> ¹	190.70 <i>forward</i> 190.602 <i>reverse</i>	ATGGCGAATATTTCTCCAAA AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	532
<i>gltA</i> ²	CS2-78 <i>forward</i> CS2-323 <i>reverse</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401
<i>geneD</i> ³	D1738F D2482R	GTATCTGAATTAAGCAATGCG CTATAACAGGATTAACAGCG	744
<i>ompB</i> ⁴	120-M59 120-807	CCGCAGGGTTGGTAACTGC CCTTTTAGATTACCGCCTAA	862

Fonte: 1 Regnery *et al.*, 1991; 2 Labruna *et al.*, 2004; 3 Sekeyova *et al.*, 2001; 4 Roux e Raoult, 2000.

Cada reação de PCR (25µL de volume final) foi realizada adicionando-se 2µL da amostra de DNAg a 17µL de água Milli-Q, 2,5µL de buffer, 1µL de Cloreto de Magnésio (MgCl₂ -50mM), 0,5µL de dNTPs (10mM), 0,75µL de oligonucleotídeos forward (*f*) e 0,75µL de oligonucleotídeos reverse (*r*), e por fim foi adicionado 0,5µL de Taq DNA polimerase (Fermentas, Vilnius County, Lituânia). As amostras foram levadas ao termociclador conforme as condições descritas para cada gene (Tabela 3).

Tabela 3: Ciclos da PCR para os oligonucleotídeos *gltA*, *ompA*, *ompB* e *geneD*.

Etapas	<i>gltA</i> ¹	<i>ompA</i> ²	<i>ompB</i> ³	<i>geneD</i> ⁴
Desnaturação inicial	95°C – 3min	95°C – 5min	94°C – 3:30min	94°C – 3:30min
Nº de ciclos	40	35	40	40
Desnaturação	95 °C – 15seg	95 °C – 40seg	94 °C – 30seg	94 °C – 30seg
Anelamento	48 °C – 30seg	58 °C – 30seg	55 °C – 30seg	54 °C – 30seg
Extensão	72 °C – 30seg	65 °C – 45seg	72 °C – 1min	72 °C – 1:30min
Extensão Final	72 °C – 7min	72 °C – 10min	72 °C – 7min	72 °C – 7min

Fonte: 1Azad *et al.*, 1990;2 Regnery RL *et al.*,1991; 3 Sekeyova *et al.*, 2001; 4 Roux e Raoult, 2000.

Os fragmentos de DNAg amplificados na PCR, para serem visualizados, foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 2% (100mL de TAE 1X; 2g de agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™) à 89Volts durante 60 minutos. Depois foram coradas com brometo de etídio e observadas em scanner de gel com luz de ultravioleta (Sambrook e Russel, 2001) (Figura 15).

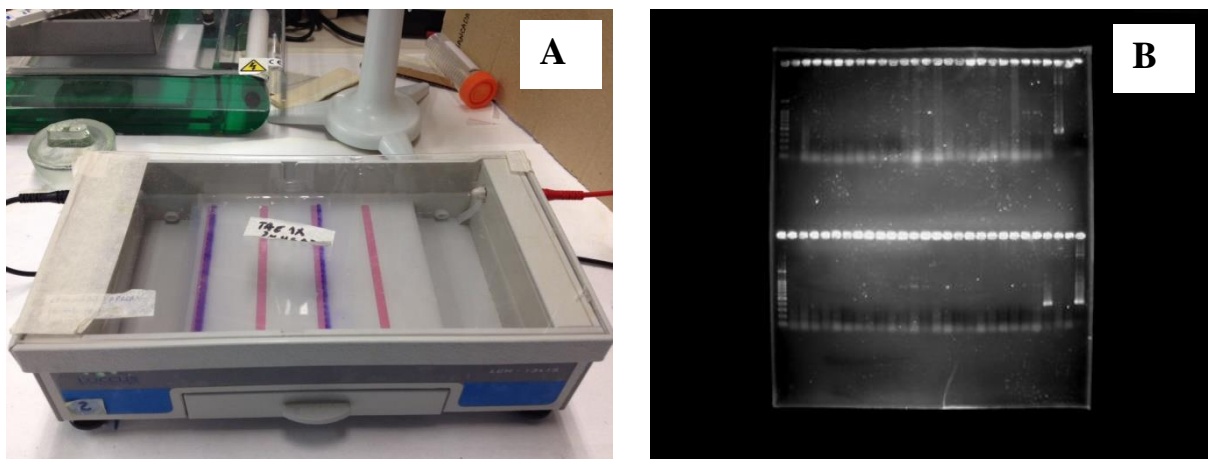


Figura 15: (A) Eletroforese. (B) Imagem do gel de agarose obtida através do scanner de gel.

Os *amplicons* que geraram produto amplificado do tamanho esperado foram encaminhados para purificação e sequenciamento.

4.4.2.b Identificação Molecular dos Carrapatos

Devido não haver chaves para diferenciação entre larvas de *A. sculptum* e *A. cajennense sensu stricto*, foram utilizados dois marcadores – 12S rDNA e Citocromo Oxidase subunidade II (COII) – para confirmar os resultados taxonômicos (Tabela 4).

Tabela 4: Oligonucleotídeos utilizados para pesquisa de genes de carrapatos.

Genes	Oligonucleotídeos	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Fragmento amplificado (pb)
12S rDNA ¹	T1B	AAACTAGGATTAGATACCCT	360
	T2A	AAAGAGTGACGGGCGATATGT)	
COII ²	AcCOXIIF	AATGTYTGRTTWARTCGNCCTGGRA	501
	AcCOXIIR	AAATTCWCCHATYATRSARCAAAT	

Fonte: 1 Beati e Keirans, 2001; 2 Bitencourth *et al.*, 2016.

As amostras foram levadas ao termociclador conforme as condições descritas para cada gene (Tabela 5).

Tabela 5: Ciclos da PCR para os oligonucleotídeos 12S rDNA e COII.

Etapas	12S rDNA	COII
Desnaturação inicial	94°C – 5min	93°C – 5min
Desnaturação	94 °C – 25seg	93 °C – 20seg
Anelamento	50 °C – 35seg	55 °C – 30seg
Extensão	68 °C – 30 seg	72 °C – 1min
Desnaturação	94 °C – 25seg	93 °C – 20seg
Anelamento	53 °C – 30seg	50 °C – 45seg
Extensão	70°C – 30 seg	70 °C – 45seg
Desnaturação	-----	93 °C – 20seg
Anelamento	-----	40 °C – 55seg
Extensão	-----	67 °C – 1min
Extensão Final	70 °C – 5min	67 °C – 5min

Após a eletroforese os *amplicons* que geraram produto amplificado do tamanho esperado foram encaminhados para purificação e para sequenciamento.

4.4.3 Purificação e Sequenciamento

Como preparação para o sequenciamento de DNAg, os *amplicons* que corresponderam ao tamanho esperado de produto amplificado, para cada gene analisado, foram purificados

utilizando o kit NucleoSpin Extract II (Macherey Nagel, Duren, Colonia, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante.

O sequenciamento do DNAg foi realizado na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS- Redes de Plataformas Tecnológicas), do IOC da FIOCRUZ.

As amostras foram submetidas a reações de sequenciamento utilizando o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, California, U.S.A.), de acordo com as instruções do fabricante. Foram empregados os mesmos oligonucleotídeos (à 3,2pmol) utilizados na PCR, para determinação das sequências em ambas as direções (3'- 5' e 5'- 3'). Posteriormente as amostras foram precipitadas, resuspendidas em formamida e aplicadas em sequenciador automático ABI 3730xl (Applied Biosystems, Carlsbad, California, U.S.A.).

Todas as sequências obtidas, para cada gene, foram depositadas no *GenBank* (Tabela 6).

Tabela 6: Amostras com seus respectivos estádios de desenvolvimento, gene utilizado e números de acesso *GeneBank*.

Espécime (s)	Amostra	Gene	Nº de acesso <i>GeneBank</i>
Larva	LIC 7621P	12S rDNA	KY490983
Larva	LIC 7621F	12S rDNA	KY490984
Ninfa	LIC 7616C	12S rDNA	KY490985
Macho	LIC 7616B	12S rDNA	KY490986
Macho	LIC 7610N	12S rDNA	KY490987
Larva	LIC 7610H	12S rDNA	KY490988
Fêmea	LIC 7616E	COII	KY490989
Larva	LIC 7610C	COII	KY490990
Larva	LIC 7609M	COII	KY490991
Larva	LIC 7609J	COII	KY490992
Ninfa	LIC 7609I	COII	KY490993
Macho	LIC 7609D	COII	KY490994
Ninfa	LIC 7609C	COII	KY490995
Larva	LIC 7609B	COII	KY490996
Fêmea	LIC 7616E	<i>gltA</i>	KY490997

4.4.4 Análise das Sequências

Todas as sequências adquiridas para cada gene foram editadas e sequências contíguas geradas no programa Chromas Pro 1.5 (Technelysium, Queensland, Austrália). Inicialmente as sequências de nucleotídeos obtidas foram identificadas por avaliação de similaridade, através de análise comparativa com as sequências depositadas no banco de dados do *GenBank*, com auxílio do programa *BLASTN* (Nacional Center For Biotechnology Information, 2017). Posteriormente, a sequência de rickettsia foi alinhada com sequências de

outras espécies depositadas no banco de dados *GenBank*, e as sequências de carrapato foram alinhadas utilizando sequências disponíveis no *GenBank* para espécies do complexo *A. cajennense*. Os alinhamentos foram executados utilizando o algoritmo ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) disponível no programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente e nos genes codificantes de proteínas não foi observada a presença de *stop códons*. Foi criado um arquivo com o alinhamento de cada gene analisado.

4.4.5 Análise Filogenética

Para aprofundar o conhecimento das relações filogenéticas entre a rickettsia detectada e outras espécies de rickettsia, bem como entre os carrapatos identificados e outros do complexo *A. cajennense*, foi feita a reconstrução filogenética, através de análise de máxima verossimilhança no PhyML 3.0 (Guindon *et al.*, 2010), utilizando modelos evolutivos indicados pelo programa MEGA 6.0 (Tamura *et al.*, 2013) para cada gene analisado (*gltA* e 12S rDNA-T92+G, e COII- HKY+G). Valores de confiança nos ramos internos foram estimados com o teste *approximate likelihood ratio test* (aLRT) com 1000 réplicas (Anisimova e Gascuel, 2006).

5 Resultados

Foram coletados 5.706 carrapatos, todos identificados como *A. sculptum*; tanto taxonomicamente quanto através de biologia molecular (para confirmação taxonômica, principalmente de larvas que não possuem chaves atualizadas) (Tabela 7) (Figura 17 e 18). A maioria dos espécimes foram coletados pela técnica de arrasto de flanela, já que a armadilha de CO₂ mostrou-se pouco produtiva nesse estudo (poucas capturas).

Tabela 7: Carrapatos coletados através do arrasto de flanela e armadilha de CO₂ no período de fevereiro a novembro de 2015 em Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

	LIC	Áreas	Ectoparasitos				Total
			Larva	Ninfa	Adulto		
					Macho	Fêmea	
1ª Coleta (verão) 1Dez-28Fev	7608	Área 1	85	1	–	–	86
	7609	Área 2	–	1	24	25	50
	7610	Área 3	2	4	32	25	63
	7611	Área 4	–	–	12	15	27
				87	6	69	64
2ª Coleta (outono) 1Mar-31Mai	7612	Área 1	27	–	–	–	27
	7613	Área 2	21	–	13	12	46
	7614	Área 3	550	2	–	1	553
	7615	Área 4	619	–	–	–	619
				1.217	2	13	13
3ª Coleta (inverno) 1Jun-31Ago	7616	Área 1	2	73	–	1	76
	7617	Área 2	770	13	–	–	783
	7618	Área 3	231	68	–	–	299
	7619	Área 4	2251	89	–	–	2.340
				3.254	243	–	1
4ª Coleta (primavera) 1Set-30Nov	7620	Área 1	14	159	1	–	174
	7621	Área 2	293	104	12	10	419
	7622	Área 3	1	75	8	6	90
	7623	Área 4	–	54	–	–	54
				308	392	21	16
Total			4.866	643	103	94	5.706

Na flutuação sazonal evidenciou-se o predomínio de larvas no inverno, ninfas na primavera e adultos no verão (Figura 16).

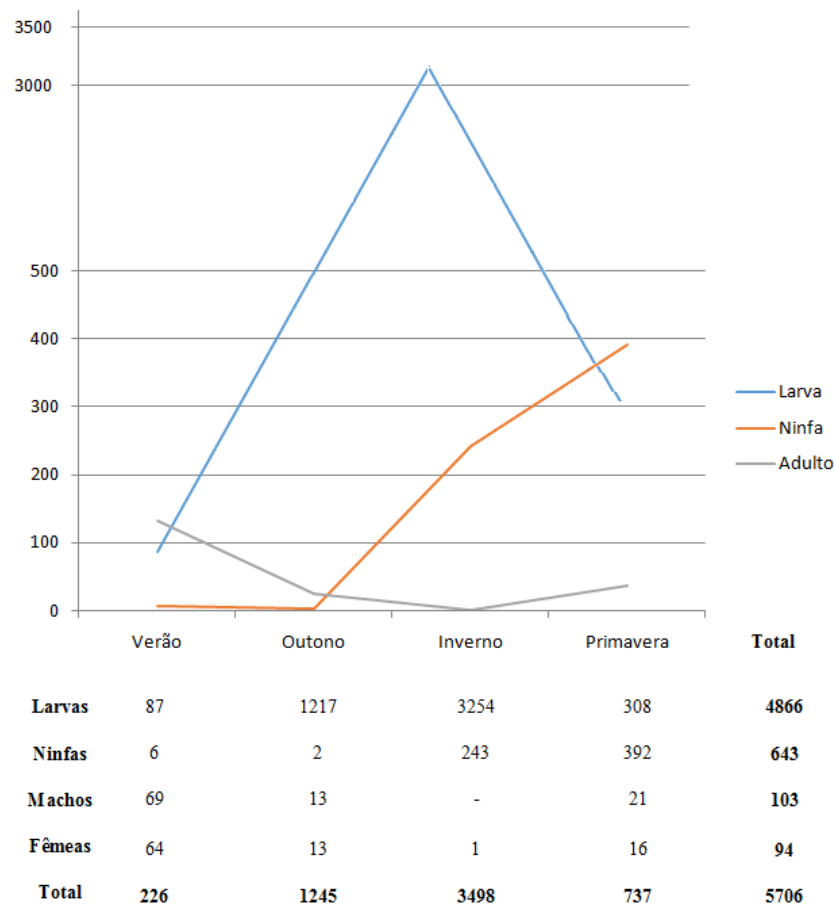


Figura 16: Distribuição sazonal dos estádios dos carrapatos coletados na cidade de Divinópolis, Minas Gerais, Brasil.

Antes das amostras serem encaminhadas à biologia molecular, o material foi para quantificação, onde apresentou resultado satisfatório – presença suficiente de DNA. Do total de carrapatos coletados, 802 foram submetidos à pesquisa do bioagente, distribuídos em 155 amostras. Destas, a amostra LIC7616E, referente a uma fêmea da Área 1 considerada como área de transmissão apresentou-se positiva para ambos genes rickettsiais pesquisados (*gltA* e *ompA*) e posteriormente com *geneD* e *ompB* (resultados insatisfatórios).

Essa amostra apresentou 100% de similaridade com sequências de *R. rickettsii* depositadas no *GeneBank* (Números de acesso *GeneBank* CP006010.1, CP006009.1) para *gltA*, para *ompA* não obtivemos resultados satisfatórios (está em processo de repetição).

As amostras analisadas para 12S rDNA e COII apresentaram 98-99% de similaridade com sequências de *A. sculptum* (Números de acesso *GenBank* KF614695-96, KF614677-78).

Nas reconstruções filogenéticas, a *Rickettsia* e os carrapatos identificados molecularmente ficaram no mesmo clado das espécies com as quais tiveram similaridade (Figura 17, 18 e 19).

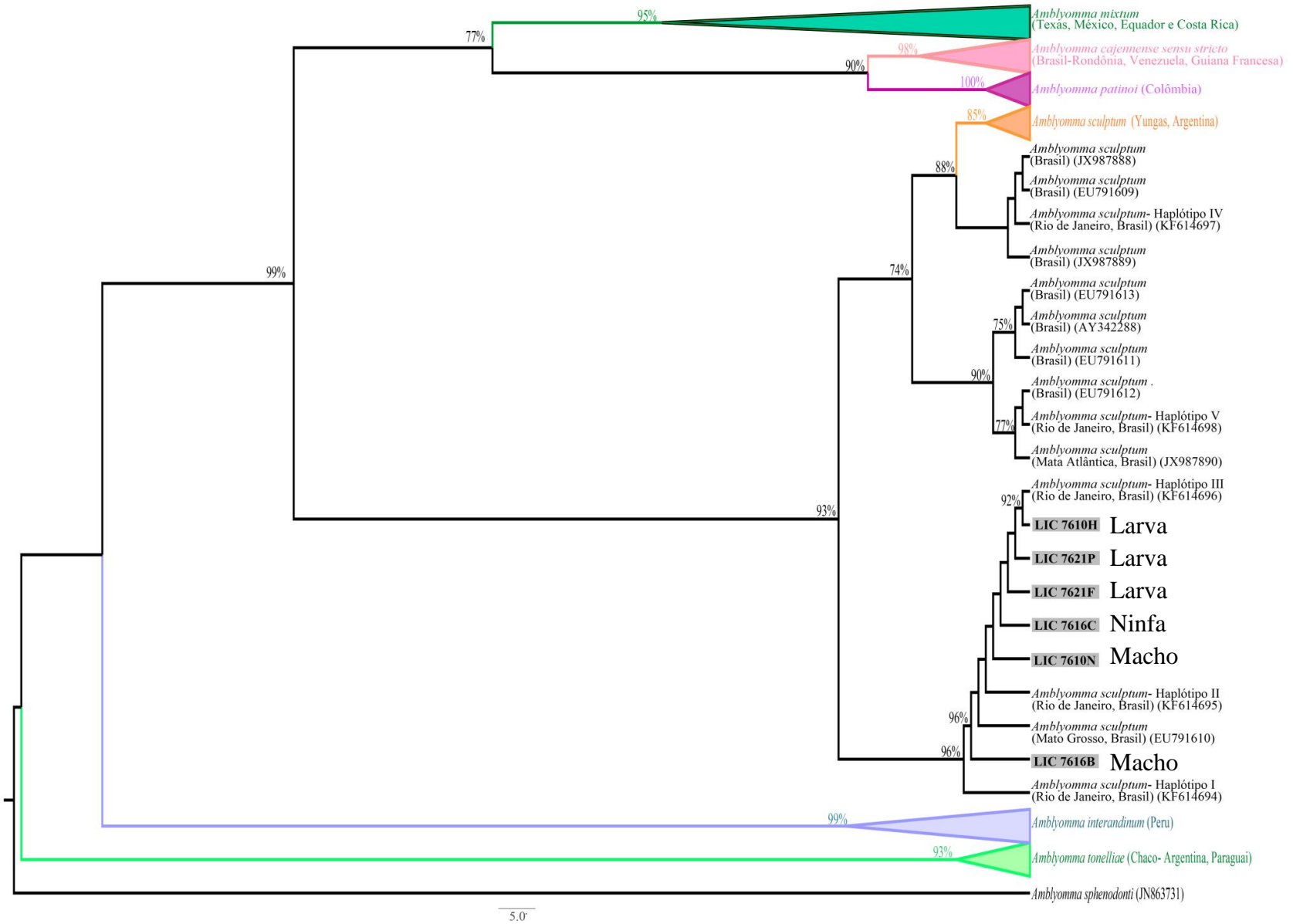


Figura 17: Filogenia inferida por análise de Máxima Verossimilhança, de seqüências parciais do gene mitocondrial 12S rDNA (395pb), representando as relações entre as amostras coletas e as espécies do complexo *Amblyomma cajennense*, de diferentes locais das Américas. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*).

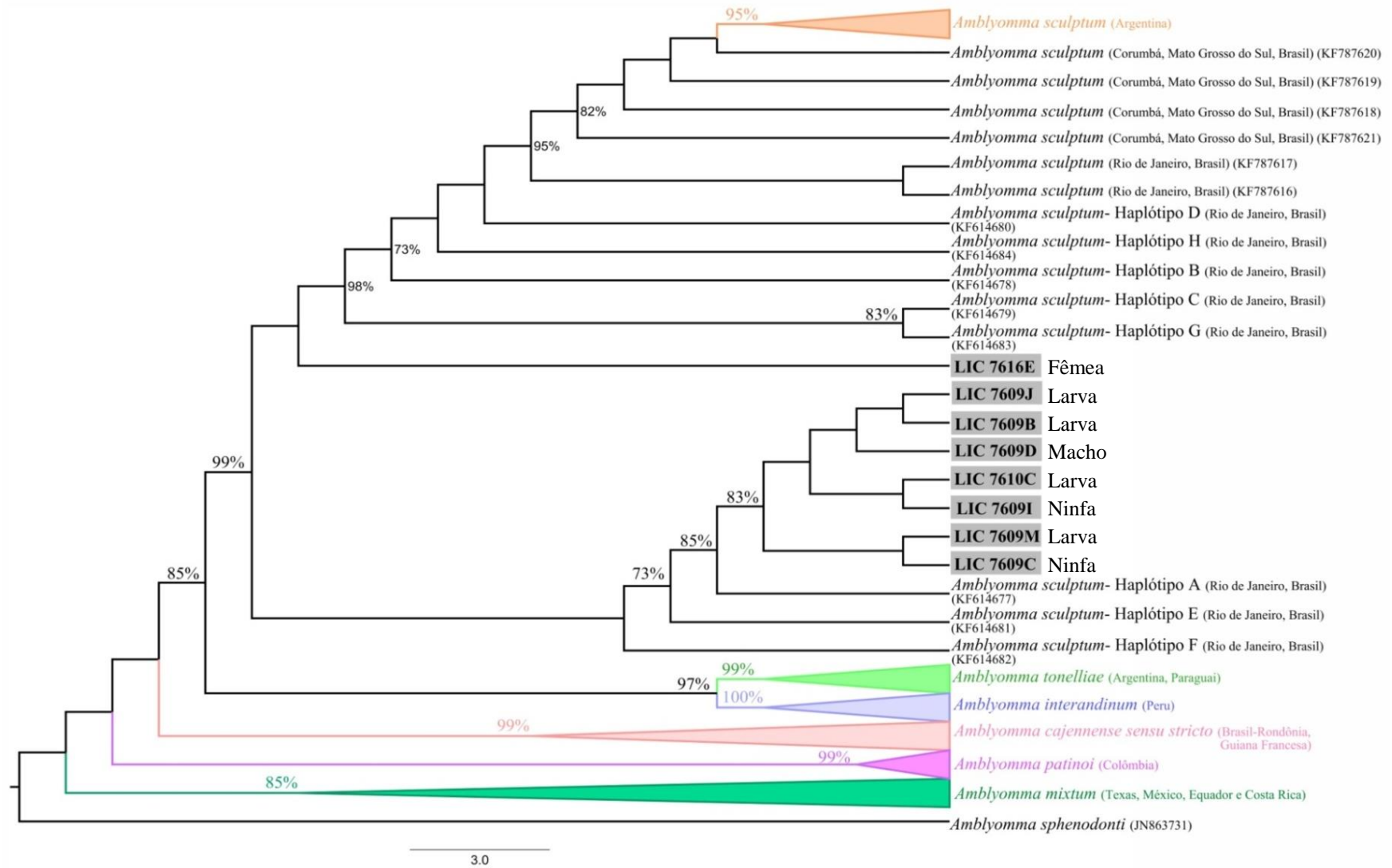


Figura 18: Filogenia inferida por análise de Máxima Verossimilhança, de seqüências parciais do gene mitocondrial COII (490pb), representando as relações entre amostras coletas e espécies do complexo *Amblyomma cajennense* de diferentes locais das Américas. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*).

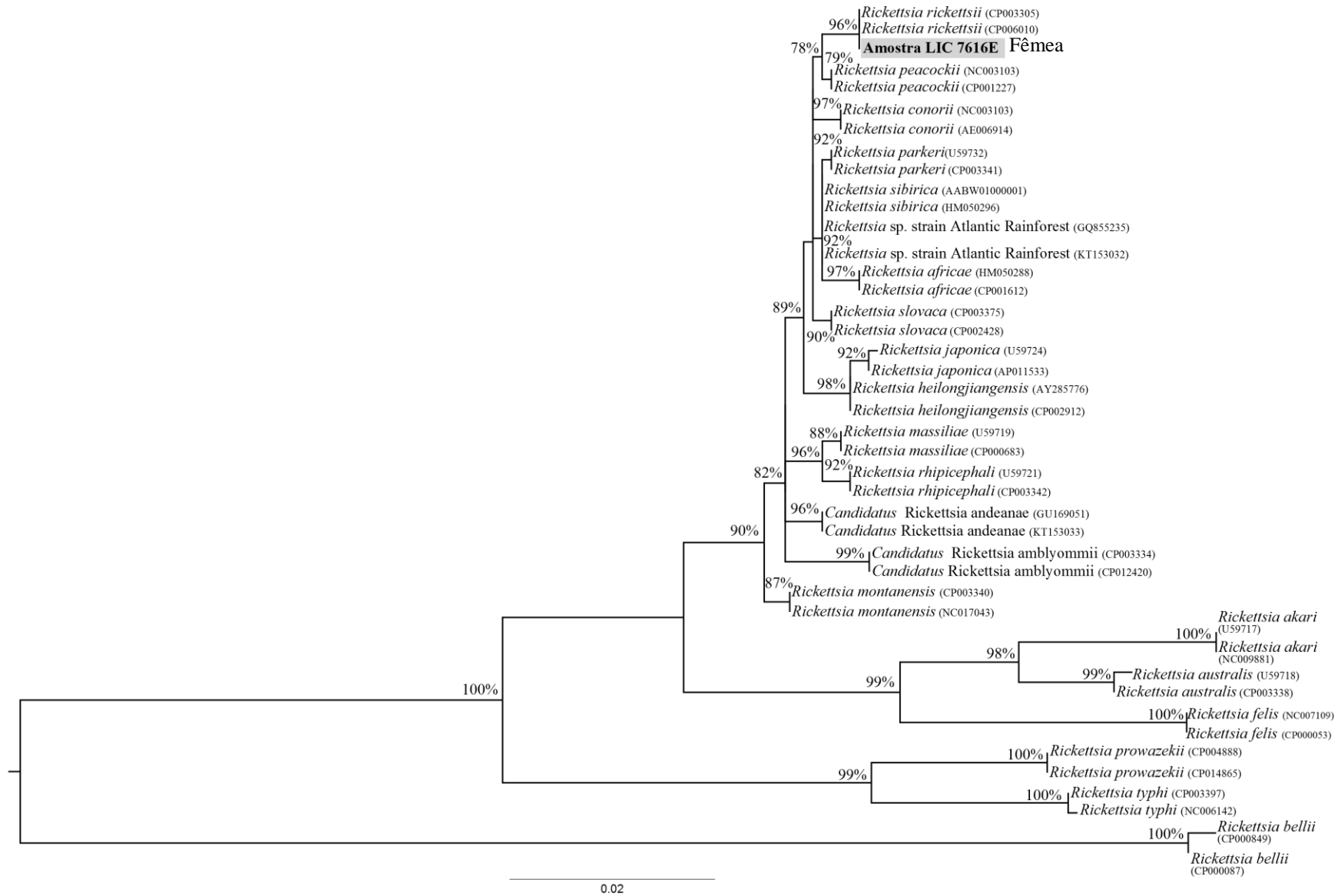


Figura 19: Inferência filogenética baseada nas seqüências de nucleotídeos de fragmento do gene *gItA* (382 pb) de *Rickettsia*, construída através de análise de Máxima Verossimilhança. Os números nos ramos indicam o valor de suporte, baseado no teste aLRTcom 1000 réplicas (70% cut-off). Os números de acesso do *GenBank* das seqüências analisadas são indicados nos parênteses. Árvore foi enraizada por *midpoint rooting*.

6. Discussão

O Brasil é um país de dimensões continentais, o que propicia a diversidade tanto da fauna quanto da flora, realidade demonstrada em seus biomas terrestres – Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Pampas – bem como em suas manchas de transição. Devido a essa riqueza, várias são as condições ecoepidemiológicas observadas (Dantas-Torres *et al.*, 2009; Labruna e Venzal, 2009; Nava *et al.*, 2010; Dantas-Torres *et al.*, 2012).

Neste contexto, as doenças rickettsiais são registradas desde a década de 1920, quando se deu o primeiro relato no estado de São Paulo (Piza, 1932; Dias e Martins, 1939); até os anos 2000, somente um bioagente era reconhecido, a *R. rickettsii*, causadora da FMB, a mais patogênica das Rickettsias circulantes mundialmente, apresentando altos índices de morbimortalidade, tendo como seu principal vetor *A. sculptum* (*e.g.* Lemos *et al.*, 1997; Guedes *et al.*, 2005; Labruna, 2009; Labruna *et al.*, 2011).

Desde então, nos últimos anos foram detectadas mais de seis Rickettsia do GFM: *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rhipicephali*, *Candidatus Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia monteiroi*, *Candidatus Rickettsia andeanae* e outras (Paddock *et al.*, 2004; Labruna, 2009; Labruna *et al.*, 2011; Pacheco *et al.*, 2011; Moerbeck *et al.*, 2016). Este aumento deve-se ao avanço técnico-científico de ferramentas diagnósticas, como também a promoção de ações de programas de vigilância epidemiológica.

Estes bioagentes estão correlacionados com os biomas em que se encontram, criando assim uma ecoepidemiologia específica (Szabó *et al.*, 2013). Neste cenário, a área do presente estudo trata-se de transição entre bioma Cerrado e Mata Atlântica, determinando uma particularidade da dinâmica ecoepidemiológica rickettsial, reunindo condições para manutenção e formação dos ciclos enzoótico e epidêmico.

Em áreas preservadas ou com menor grau de antropização do bioma Mata Atlântica, a transmissão de *R. rickettsii* é comprovadamente feita por *A. aureolatum*. Esse ciclo de transmissão é estabelecido quando humanos entram na mata e se infestam com *A. aureolatum*, ou quando cães entram na mata e transportam o carrapato vetor para o ambiente antrópico, especialmente o peridomicílio.

Nessas áreas pode também acontecer o ciclo epidêmico de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, espécie genotipicamente próxima à *R. parkeri*, *Rickettsia sibirica* e *Rickettsia africae*, que possui menor grau de patogenicidade quando comparada a *R. rickettsii*. A

infecção humana acontece pela picada de *A. ovale*, que infesta o homem de forma semelhante a *A. aureolatum*, podendo envolver, igualmente, cães. (Padock *et al.*, 2004)

Por outro lado, *A. sculptum* está associado com a transmissão de *R. rickettsii* em áreas do cerrado dos Estados de São Paulo e Minas Gerais, e em áreas degradadas do bioma Mata Atlântica da região Sudeste do país. Nessas áreas a antropização pode diminuir a biodiversidade e aumentar a presença de alguns de seus hospedeiros preferenciais, como capivara e equino. Entretanto, é interessante observar que em outras áreas do Cerrado, com menor grau de antropização, *A. sculptum*, mesmo sendo espécie comprovadamente existente, não tem sido apontado como vetor. Além disso, a forma clínica dos casos confirmados nessas áreas parece ser diferente daquelas registradas para as áreas onde *A. sculptum*, *A. aureolatum* e *A. ovale* são considerados vetores (Szabó *et al.*, 2013; Moerbeck *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2016b).

Nesse sentido, nosso estudo permite considerar que áreas de transição entre Cerrado e Mata Atlântica parece permitir o estabelecimento do ciclo epidêmico da FMB, por apresentarem condições ecoepidemiológicas mais homogêneas a partir da perda gradual de sua matriz natural, parecendo, assim, ter influência direta na espécie ou linhagem de vetor e/ou *Rickettsia* circulantes em uma determinada área.

Logo, a contínua degradação ambiental permitirá o aumento das áreas de focos da FMB em locais onde haja uma profunda fragmentação da vegetação natural (Szabó *et al.*, 2013).

Das quatro áreas avaliadas neste estudo, duas são predispostas e duas de transmissão. Não foi possível averiguar outras áreas de transmissão, devido ao preenchimento incompleto das fichas de notificação de agravos para FM da secretaria regional de saúde do município.

Como resultado das coletas, encontramos somente *A. sculptum*. Uma possível explicação para este fato, é que mesmo se tratando de área rica em biodiversidade (área de transição entre biomas) o local é fortemente antropizado, favorecendo o aumento da presença deste carrapato, como sugerido por Szabó *et al.* (2009).

A espécie encontrada apresentou padrão sazonal definido, com menor número de estágio adulto encontrado ao longo do ano e número elevado de espécimes durante o verão, fato que corrobora os resultados de Serra-Freire (1982) no Rio de Janeiro, Lemos *et al.* (1997) em São Paulo, Oliveira *et al.* (2000), Guedes e Leite (2008) e Durães (2015) em Minas Gerais e Toledo *et al.* (2008) no Paraná. Os estádios larvais foram mais encontrados durante outono e inverno, enquanto que ninfas no inverno e primavera, concordando com os resultados de Souza *et al.* (2006) em São Paulo e Toledo *et al.* (2008) e Durães (2015); porém discorda do encontrado por Serra-Freire (1982), Lemos *et al.* (1997), Oliveira *et al.* (2000) e Labruna *et*

al. (2002) em São Paulo. Uma hipótese para achados distintos no padrão sazonal pelos demais autores, pode ser dividido ao bioma: em cada bioma ou região, a variação de temperatura, umidade, entre outros fatores, pode influenciar o padrão sazonal desses artrópodes.

Embora tenhamos testado um número de amostras relativamente grande de *A. sculptum*, a baixa taxa de infecção para pesquisa dos genes *gltA* e *ompA* encontrada (uma amostra oriunda de área de transmissão) é um achado comum, fato este que concorda com Labruna (2009) e Soares *et al.* (2012). Outro fator significativo para tal taxa são os efeitos deletérios da bactéria no ectoparasito, o qual apresenta decréscimo em seu *fitness*, bem como aumento de sua mortalidade. Apesar dessa taxa, não podemos descartar a possibilidade de que a população deste ixodídeo esteja infectada, pois essa área é considerada altamente endêmica – *hot spot* – com relato de caso em 2011 por infecção de *R. rickettsii*, evoluindo para o óbito.

Neste contexto, nossa preocupação se volta para a real possibilidade de se instaurar um surto, pois esta área é de transição entre ambientes naturais e antropizados, com circulação da população humana, em suas atividades de lazer e trabalho, como também trânsito livre de cães e cavalos, os quais certamente apresentam maior frequência de parasitismo, permitindo o intercâmbio de ectoparasitos, favorecendo a formação e manutenção do ciclo epidêmico.

Apesar de não termos encontrado nenhuma outra espécie de carrapato nas áreas investigadas, a presença de equinos e capivaras indica a provável existência de outras, como *Dermacentor nitens* e *Amblyomma dubitatum*, respectivamente. Dado que, Almeida *et al.* (2011) em trabalho em município próximo, encontraram alta taxa de infecção em *A. dubitatum* por *Rickettsia* sp., com relato de nova cepa, a cepa Pampulha; não seria impossível a circulação desta na área do presente estudo, visto que são relativamente próximas e possuem similar perfil ecoepidemiológico.

É fato que o cenário estabelecido nas áreas coletadas, requer atenção por parte da vigilância epidemiológica, como também a implementação de estudo sobre circulação de *Rickettsia*, uma vez que encontramos amostra positiva nessas área de transição entre biomas, podendo ser consideradas como foco natural de FM.

7 Considerações Finais

Na amostra positiva para rickettsia serão realizadas novas PCRs para os genes *gltA* [usando os oligonucleotídeos CS4 239 (GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT) e CS4 1069 (CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT), 834 pb (Labruna *et al.*, 2004)], *ompB* (Nunes *et al.*, 2015) e *geneD* (Sekeyova *et al.*, 2001), com novas combinações de oligonucleotídeos, e para o gene *htrA* (através de *nested PCR*) (Webb *et al.*, 1990, Labruna *et al.*, 2004).

Com relação a identificação molecular dos carrapatos, cada amostra foi submetida a amplificação de mais de um gene mitocondrial (12S rDNA, COII, D-loop). Porém esses resultados não são mostrados porque estão em fase de sequenciamento.

A partir do momento que tivermos mais de uma sequência de marcadores diferentes para rickettsia e para carrapatos, será realizada análise concatenada das sequências obtidas para inferência da filogenia de cada um desses organismos.

Faz-se necessário que as autoridades estejam alerta, pois somando-se os achados e a baixa especificidade do vetor, contribui para instalar-se um surto. Sugere-se então, o preparo de profissionais do Sistema Único de Saúde (SUS) para um diagnóstico precoce da doença.

Em virtude disso, torna-se de extrema importância a implantação por parte do governo, de programas de saúde pública alertando e conscientizando a população dos riscos que o contato com carrapato pode acarretar, uma vez que a FM pode ser letal. É, também, de responsabilidade governamental a realização de ações que incentivem o controle do vetor na natureza, seja em âmbito urbano, peri-urbano ou rural.

Programas sociais voltados para usuários de drogas que frequentam área de transmissão de FM e programas junto a carroceiros para combate a carrapatos nos animais são medidas que poderiam diminuir o número de casos no município.

8 Conclusão

Com base nos resultados, podemos concluir que:

- *Amblyomma sculptum* foi a única espécie de vetor encontrada na área analisada.
- *Rickettsia rickettsii* foi a única espécie de rickettsia encontrada na área de transmissão estudada.
- As áreas predispostas devem ser entendidas como áreas de alerta, uma vez que ocorre disponibilidade de *A. sculptum* nessas áreas.
- O ambiente de transição entre biomas Cerrado e Mata Atlântica parece não influenciar sobre o perfil do doença.

Referências Bibliográficas

- ACHA, P.N. and SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles communes al hombre y a los animales. Washington: **Organización Panamericana de la Salud**, p.502-26, 2nd ed., 1986.
- ALJANABI, S.M. and MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. **Nucl. Acids. Res.**, v.25, n.22, p.4692-4693, 1997.
- ALMEIDA, A.P.; CUNHA, L.M.; BELLO, A.C.P.P.; CUNHA, A.P.; DOMINGUES, L.N.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.2. p.209-212, 2011.
- AMORIM, M. and SERRA-FREIRE, N.M. Chave dicotômica para identificação de larvas de algumas espécies do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Etomol. Vect.**, v.6, n.1, p.75-90, 1999.
- ANISIMOVA, M. and GASCUEL, O. Approximate Likelihood-Ratio Test for Branches: A Fast, Accurate, and Powerful Alternative. **Systematic Biology**, v. 55, p539-552, 2006
- ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.31, n.4, p.759-845, 1936.
- ARAGÃO, H.B. e FONSECA, F. Notas de Ixodologia, VIII: Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.59, n.2, p.115-129, 1961.
- AZAD, A.F.; WEBB, L.; CARL, M.; DASCH, G.A. Detection of *Rickettsiae* in Arthropod Vectors by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. **Ann NY Acad. Sci.**, v.590, p.557-63, 1990.
- AZAD, A.F. and BEARD, C.B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emer. Infect. Dis.**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.
- BALASHOV, Y.S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) -Vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v.8, p.160-376, 1972.
- BARCI, L.A.G. e NOGUEIRA, A.H.C. Artigo técnico febre maculosa brasileira. **Biológico**, v.67, n.1 e 2, p.23-29, 2005.
- BARLETT, P.C. and JUDGE, L.J. The role of epidemiology in public health. **Office International des Epizooties Scientific and Technical Review**, v.16, n.2, p.331-36, 1997.
- BEATI, L. and KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **Journal of Parasitology**, 87, 32-48, 2001.

BILLINGS, A.N.; YU, X.J.; TEEL, P.D.; WALKER, D.H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **J. Med. Entomol.**, n.35, p.474-78, 1998.

BITENCOURTH, K.; VOLOCH, C.M.; SERRA-FREIRE, N.M.; MACHADO-FERREIRA, E.; AMORIM, M.; and GAZÊTA, G. S. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, 30, 342–350, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892116&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/febremaculosa>. Acesso em: 16 ago. 2016.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. **Am.J. Trop. Med. Hyg.**, v.12, p.1010-14, 1970.

BUTLER, J.F.; HOLSCHER, K.H.; ADEYEYE, O.; GIBBS, E.P.J. Sampling techniques for burrow dwelling ticks in reference to potential African swine fever virus vectors. In: Griffiths, D.A. and Bowman, C.E. (ed.), **Acarology**. VI. Ellis Horwood, Chichester, v.2, p.165-74, 1984.

CALIC, S.B.; GALVÃO, M.A.M.; CHAMONE, C.B. Inquérito sorológico para febre maculosa em Belo Horizonte, Minas Gerais no ano de 1997. In: **Congr. Soc. Bras. Med. Trop., Manaus**. Anais p.34, 1998.

CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N.; MAFRA, C.L.; NEVES, C.V.; FIGUEIRA, F.C.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. and GALVÃO, M.A.M. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Cad. Saúde Publ.**, v.22, n.3, p.495-501, 2006.

CORRÊA, S.H.R. AND PASSOS, E.C. Wild animals and public health. In: Fowler, M.E.; Cubas, Z.S. *Biology, medicine and surgery of South American wild animals*. Ames: **Iowa University Press**, p.493-99, 2001.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. AND BARROS-BATTESTI, D.M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Syst. Appl. Acarol.**, v.14, p.30-46, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; VENZAL, J.M.; BERNARDI, L.F.; FERREIRA, R.L.; ONOFRIO, V.C.; A. MARCILI; *et al.* Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **J. Parasitol.**, v.98, p.36-45, 2012.

DEL GUERCIO, V.M.F.; ROCHA, M.M.M.; MELLES, H.H.B.; LIMA, V.C.L.; PIGNATTI, M.G. F. Febre maculosa no município de Pedreira, SP, Brasil. Inquérito sorológico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.30, n.1, 1997.

DIAS, E. and MARTINS, A.V. Spotted fever in Brazil. **Am. J. Trop. Med.**, v.19, p.103-08, 1939.

DIVINÓPOLIS. Prefeitura Municipal de Divinópolis. Disponível em: <http://www.divinopolis.mg.gov.br/portal/cidade/12/Geografia>. Acesso em: 13 Ago. 2016.

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 the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.51, n.6, p.2145-65, 2001.

DURÃES, L.S. **Biodiversidade de Potenciais Vetores de Rickettsias em Áreas de Vulnerabilidade para Febre Maculosa no Município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil.** Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Juiz de Fora – 144p, 2015

ELISBERG, B.L. AND BOZEMAN, F.M. The rickettsiae. In EH Lennet, Diagnostic Procedure, **Am. Publ. Health Assoc.** p.1061-1108, 1979.

EREMEEVA, M. and DASCH, G. A. Rickettsiae. In: Lederberg, J. (ed.). **Encycl. Microbiol.** 2a ed. New York: Academic Press, v. 4, p. 140-180, 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence Limits on Phylogenies: Na Approach Using the Bootstrap. **Evolution** [The bootstrap first applied to phylogenies], v.39, p.783-91, 1985.

GALVÃO, M.A.M. **Febre maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no Estado e seu comportamento em área de foco peri-urbano.** Tese- Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

GALVÃO, M.A.M.; LAMOUNIER, J.A.; BONOMO, E.; TROPIA, M.S.; REZENDE, E.G.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; MACHADO, M.C.; OTONI, M.E.; LEITE, R.C.; CARAM, C.; MAFRA, C.L.; WALKER, D.H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Públ.**, Rio de Janeiro, p.1593-97, nov/dez, 2002.

GALVÃO, M.A.M.; CALIC, S.B.; CHAMONE, C.B.; MAFRA, C.L.; FILHO, G.C.; OLANO, J.P.; WALKER, D.H. Spotted fever rickettsioses in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36, n.4, p.479-81, 2003.

GALVÃO, M.A.M.; CARDOSO, L.D.; MAFRA, C.L.; CALIC, S.B.; WALKER, D.H. Revisiting Brazilian spotted fever focus of Caratinga, Minas Gerais State, Brazil. **Ann. NY Acad. Sci.**, v.1078, p.255-56, 2006.

GERHKE, F.S. **Deteção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da Região Sudeste do Brasil.** 100p. Tese- Instituto de Ciência Biomédica da Universidade de São Paulo, Brasil, 2010.

GEHRKE, F.S.; GAZETA, G.S.; SOUZA, E.R.; RIBEIRO, A.; MARRELLI, M.T.; SCHUMAKER, T.T.S. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and, *Rickettsia* sp TwKM03 infecting *Rhipicephalussanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a

Brazilian Spotted Fever focus in the state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clin. Microbiol. Infect. Dis.**, v.15, n.2, p.267-68, 2009.

GIMENEZ, D.F. Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. **Stain Technol.**, v.39, p.135-40, 1964.

GOOGLE MAPS. Imagem por satélite. Disponível em: <https://www.google.com.br/maps/place/Parque+da+Ilha/@-20.1357015,44.8902472,3302m/data=!3m1!1e3!4m5!3m4!1s0x0:0xc2e23483f49c22d2!8m2!3d-20.1356499!4d-44.8784637>. Acesso em: 13 Ago. 2016.

GREENE, C.E. and BREITSCHWERDT, E.B. Rocky Mountain spotted fever, murine typhuslike disease, rickettsialpox, typhus and Q fever. In: **Infec. Dis. Dogs and Cats**. (3rd ed.) Canadá: Sauders Elsevier, cap. 29, p.232-43, 2006.

GUEDES E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H. and LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100, p.841-845, 2005.

GUEDES, E. e LEITE, R.C. Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, p.78-82, suplemento 1, 2008.

GUEDES E.; LEITE, R.C.; PACHECO, R.C.; SILVEIRA, I. and 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.

GUINDON, S.; DUFAYARD, J.F.; LEFORT, V.; ANISIMOVA, M.; HORDIJK, W. and GASCUEL, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, 59(3):307-21, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – Minas Gerais – Divinópolis. Cidades. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/xtras/perfil.php?lang=&codmun=313670&search=minas-gerais|divinopolis>. Acesso em: 13 de Ago. 2016.

LA SCOLA, B. and RAOULT, D. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. **J. Clin. Microbiol.**, v.35, n.11, p.2715-27, 1997.

LABRUNA, M.B. Biologia-ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). In: XIII Congres. Bras. Parasitol. Vet., e Simp. Latino-Americanos de Rickettsioses, Ouro Preto, Minas Gerais, 2004. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, n.1, p.123-24, 2004.

LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1166, p.156-166, 2009.

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.H. and GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.105, n.1, p.65-77, 2002.

LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; BOUYER, D.H.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P. and WALKER, D.H. Molecular evidence for a spotted fever group Rickettsia species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v.41, n.3, p.533-537, 2004.

LABRUNA, M.B. E MACHADO, R.Z. Agentes transmitidos por carrapatos na região Neotropical. In: Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. (Org.). **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para a identificação de espécies**. 1ª ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, p.155-63, 2006.

LABRUNA, M.B. and VENZAL, J.M. *Carios fonsecai* sp. Nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. **Acta Parasitol.**, v.54, p.355-363, 2009.

LABRUNA, M.B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J.M.; DOLZ, G.; *et al.* Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Rev. MVZ Córdoba**. v.16, p.2435-2457, 2011.

LEMOS, E.R.S. **Aspectos epidemiológicos da riquetsiose do grupo da febre maculosa em uma área endêmica do estado de Minas Gerais, Brasil**, 164p. Dissertação – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 1991.

LEMOS, E.R.S. **Febre Maculosa Brasileira em uma área endêmica no município de Pedreira, São Paulo, Brasil**, 124p. Tese – Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, 1996.

LEMOS, E.R.S. Rickettsioses. In: COURA, J.R., (1ª ed.). **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., p.1598-1609, 2005.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. Rocky Mountain spotted fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.89, n.4, p.497-501, 1994.

LEMOS, E.R.S.; ALVARENGA, F.B.F.; CINTRA, M.L.; RAMOS, M.C.; PADDOCK, C.D.; FEREBEE, T.L.; ZAKI, S.R.; FERREIRA, F.C.C.; RAVAGNANI, R.C.; MACHADO, R.D.; GUIMARÃES, M.A.A.M.; COURA, J.F. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area the state of São Paulo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, n.4, p.329-34, 1996.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; DERRA-FREIRE, N.M.; AMORIM, M. and GAZETA, G.S. Epidemiological aspects of the Brazilian Spotted Fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v 30, p.181-185, 1997.

LEMOS, E.R.S.; ALVARENGA, F.B.; CINTRA, M.L.; RAMOS, M.C.; PADDOCK, C.D.; FEREBEE, T.L. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the State of São Paulo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.65, n. 4, p.329-34, 2001.

MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo do tifo exantemático. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, n.6, 1952.

MARTINS, T.F.; ONOFRIO, V.C.; D.M.; BARROS-BATTESTI and LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions and identification key. **Ticks and Tick-borne diseases**, v.1, p.75-99, 2010.

MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; SILVA, M.V. Febre maculosa: isolamento e *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. **Rev. Inst. Med. Trop. SP.**, v.34, n.1, p.37-41, 1992.

MOERBECK, L.; VIZZONI, V.F.; MACHADO-FERREIRA, E.; CVALCANTE, R.C.; OLIVEIRA, S.V.; SOARES, C.S.G.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G.S. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**. In press, 2016.

MOURA, N.O. **Deteção e Caracterização Molecular de Riquétias em Potenciais Vetores Procedentes de Focos Ativos de Febre Maculosa do estado de Rio de Janeiro**, 78p. Dissertação – Universidade de São Paulo, 2011.

NCBI - NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. BLAST Assembled Ref Seq Genomes. Nucleotide Blast. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

NCBI - NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=1105104&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>>. Acesso em: 10 jan. 2017.

NAVA, S.; VENZAL, J.M.; TERASSINI, F.A.; MANGOLD, A.J.; CAMARGO, L.M. and LABRUNA, M.B. Description of a new argasid tick (Acari:Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. **J. Parasito.**, v.96, p.1089-1101, 2010.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A. J., and 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*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis.**, 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. e GAZÊTA, G.S. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n.8, p.1058–1061, 2015.

OLIVEIRA, P.R. ***Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e biotecnologia**. Dissertação- Escola de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, 1998.

OLIVEIRA, P.R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Ouro Preto, v.23, supl.1, p.118-22, 2004.

OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L. and LEITE, R.C. Population dynamics of 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.

OLIVEIRA, S.V.; CALDAS, E.P.; COLOMBO, S.; GAZETA, G.S.; LABRUNA, M.B.; SANTOS, F.C.P.; ANGERAMI, R.N. A fatal case of Brazilian spotted fever in a non-endemic area in Brazil: the importance of having health professionals who understand the disease and its areas of transmission. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** 49(5):653-655. 2016a.

OLIVEIRA, S.V.; SOARES, C.A.G.; AMORIM, M. and GAZÊTA, G.S. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v.22, n.22, 2016b.

OLSON, J.G. and MCDADE, J.E. *Rickettsia* and *Coxiella*. In: Murray P. R. **Man. Clin. Microbiol.**, 6^aed. Washington: Asm Press, p.678-84, 1994.

ONOFRIO, V.C., LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F.G.; BARROS-BATTESTI, D.M. Comentários e chaves paras as espécies do gênero *Amblyomma*, p.53-113. In: Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3 Butantan, 2006.

PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L.J.; LEITE, R.C. e LABRUNA, M.B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Med. Vet. Entomol.**, v.25, p.148-155, 2011.

PADDOCK, C.D.; SUMMER, J.W.; COMER, J.A.; *et al.* *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v.38, p.805-11, 2004.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; SOCOLOVSKI, 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, n.4, p.657-702, 2013.

PASCALE, H. Rickettsiosis in São Paulo. Contribuição ao estudo da epidemiologia da febre maculosa e do tifo murino. In: **First Inter American Congress of Medicine**, Rio de Janeiro, RJ, p. 5-37, 1946.

PIZA, J.T. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o Tifo Exantemático de São Paulo. In: *Tifo Exantemático de São Paulo* (Piza, J.T.; Meyer, J.R.; e Salles-Gomes, L. org.), São Paulo: **Sociedade Impressora Paulista**, p.11-119, 1932.

PIZA, J.T; MEYER, J.R. e GOMES L.S. Typho Exanthematico de São Paulo. São Paulo: **Sociedade Impressora Paulista**, p.11-119, 1932.

RAOULT, D. and ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

RAOULT, D.; PAROLA, P.; PADDOCK, C. D. Tick-bourne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Am. Soc. Microbiol.**, v.18, n.4, p.719-56, 2005.

REGNERY, R.L.; SPRUILL, C.L. and PLIKAYTIS, B.D. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J. Bacteriol.**, v.173, n.5, p.1576-1589, 1991.

ROUX, V.; RYDKINA, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic analysis, and its application for the Rickettsiae. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, n. 2, p. 252-261, 1997.

ROUX, V. and RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus Rickettsia using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (OmpB). **Internat. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1449-1455, 2000.

SAMBROOK, J. and RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3th, New York: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 2001.

SCHWAN, T.G. Ticks and *Borrelia*: model systems for investigating pathogen-arthropod interactions. **Infect. Agents Dis.** v.5, n.3, p.167-81, 1996.

SERRA-FREIRE, N.M.S. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do estado do Rio de Janeiro. **Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, v.5, n.2, p.187-193, 1982.

SEKEYOVA Z, ROUX V, RAOULT D. Phylogenu of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'geneD', which encodes an intracytoplasmic protein. **Int J Syst Evol Microbiol.** 51: 1353-60, 2001.

SERRA-FREIRE, N.M. Acari: Os carrapatos. In: Rey, L. (ed.). **Parasitologia**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.650-56, 1991.

SEXTON, D.J.; MUNIZ, M.; COREY, G.R.; BREITSCHWERDT, E.B.; HEGARTY, B.C.; DUMLER, S.; WALKER, D.H.; PEÇANHA, P.M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.49, n.2, p.222-26, 1993.

SILVA, L.J. e GALVÃO, M.A.M. Epidemiologia das riquetsioses do gênero Rickettsia no Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.13, supl.1, 2004.

SOARES, J.F.; SOARES, H.S.; BARBIERI, A.M. and 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, p.139-151, 2012.

SOUZA, A.P. **Variação Populacional do Principais ixodídeos Parasitas de Bovinos e Equinos em Diferentes Condições de Manejo, nos municípios de Paracambi e Itaguaí no estado do Rio de Janeiro.** 103p. Tese- Doutorado em Parasitologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 1990.

SOUZA, C.E.; CALLE, S.B.; CAMARGO, M.C. G.O. Opapel da *Capivara Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia Epidemiológica da Febre Maculosa Brasileira. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Ouro Preto, v. 23, supl.1, p.203-04, 2004.

SOUZA, S.S.A.L.; SOUZA C.E.; RODRIGUEZ NETO, E.J. e PRADO, A.P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v.36, n.3, p.887-891, 2006.

STOTHARD, D. R.; CLARK, J. B.; FUERST, P. A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of Rickettsia and antiquity of the genus *Rickettsia*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, n.4, p. 798-804, 1994.

SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias. Governo do Estado de São Paulo. Publicada no Doe de 25/03/2016, Seção I, p.56/57. Resolução Conjunta SMA/SUCEN, nº 01, de 24 de março de 2016.

SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B.; GARCIA, M.V.; PINTER, A.; CASTAGNOLLI, K.C.; PACHECO, R.C.; *et al.* Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. **Ann. Trop. Med. Parasit.**, v.103, p.57-72, 2009.

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 article27, 2013.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. **MEGA6**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molec. Biol. Evol.**, v.28, n.10, p.2731-39, 2013.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T.; CLUSTAL, W. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucl. Acids. Res.**, v.22, p.4673-90, 1994.

TIRIBA, A.C. Geografia médica das riquetsioses. In: Lacaz, C.S.; Baruzzi, R.G.; Siqueira, Jr. W.(eds). **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo: Edgard Blücher/Edusp; p. 388-97, 1972.

TOLEDO, R.S.; TAMEKUNI, K.; HAYDU, V.B.; VIDOTTO, O. Dinâmica sazonal de carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) em um parque urbano da cidade de Londrina, Paraná. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.17, supl.1, p.50-54, 2008

TRAVASSOS, J. e VALLEJO-FREIRE, A. Criação artificial de *Amblyomma* para preparo vacina contra febre maculosa **Mem. Inst. Butantã**, v.18, p.145-235, 1944-1945.

VALBUENA, G.; WALKER, D.H. The Endothelium as a Target for Infections. **Ann. Rev. Pathol. Mechan. Dis.**, v.1, p.171-98, 2006.

VIEIRA, A.M.L.; SOUZA; C.E; LABRUNA, M.B.; MAYO, R.C; SOUZA, S.S.A.L; CAMARGO_NEVES, V.L.F. Dinâmica sazonal do carrapato *Amblyomma cajennense* no Sudeste do Brasil in **Man. Vig. Acarol.** Estado de São Paulo. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2004.

WALKER, D.H. and DASCH, G.A. Classification and identification of *Chlamydia*, *Rickettsia*, and related bacteria. In: Murray, P.R. **Man. Clin. Microbiol.** ASM Press. Washington. 6^a ed., p.665-68, 1994.

WALKER, D. and BOUYER, D.H. *Rickettsia*. In: Murray, P.R.; Baron, E.J.; Jorgensen, J.H.; Tenover, M.C.; Tenover, F.C. (eds.) **Man. Clin. Microbiol.** Washington: ASM Press, p.1005-14, 2003.

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

WEISS, E. and MOULDER, J.W. Order I. Rickettsiales, Gieszczycki 1939, 25AL. N.R. Krieg (Ed.), **Bergey's Man. Syst. Bacteriol.** The Williams and Wilkins Co., Baltimore: v.1, p.687-727, 1984.

YU, X.J. and WALKER, D.H. The Order Rickettsiales. In: Dworkin, M. (ed.) **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community.** 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2003. Disponível no site: <<http://link.springer.ny.com/link/service/books/10125>> Acesso em 3 de jan. de 2017.

Anexo A

Tabela 1: Números de acesso do *GenBank* das sequências dos genes 12S rDNA e Citocromo oxidase subunidade II (COII) utilizadas na reconstrução filogenética do complexo *Amblyomma cajennense*.

Espécie	Gene	Números de acesso <i>GenBank</i>	Procedência
<i>Amblyomma tonelliae</i>	12Sr DNA	EU791602- EU791604, JX987868- JX987873 JX987874, JX987875	Argentina (Chaco) Paraguai
	COII	KF787622, KF787624- KF787626 KF787623	Argentina (Chaco) Paraguai
<i>Amblyomma sculptum</i>	12Sr DNA	JX987883- JX987887, EU791607, EU791608 EU791609, EU791611- EU791613, JX987888- JX987890 EU791610	Argentina (Yungas) Brasil (Mata Atlântica) Brasil (Corumbá/ Mato Grosso do Sul)
	COII	KF787617 KF787618- KF787621 KF787611- KF787615	Brasil (Mata Atlântica) Brasil (Corumbá/ Mato Grosso do Sul) Argentina (Yungas)
<i>Amblyomma cajennense sensu stricto</i>	12Sr DNA	EU791605, JX987809 JX987807, JX987808 JX987796- JX987806, EU791606	Brasil (Rondônia) Venezuela Guiana Francesa
	COII	KF787609, KF787610 KF787599- KF787608	Brasil (Rondônia) Guiana Francesa
<i>Amblyomma interandinum</i>	12Sr DNA	JX987850- JX987867, EU791594- EU 791601	
	COII	KF787627- KF787631	Peru
<i>Amblyomma patinoi</i>	12Sr DNA	JX987877- JX987882	
	COII	KF787596- KF787598	Colômbia
<i>Amblyomma mixtum</i>	12Sr DNA	JX987838- JX987842 JX987845- JX987849, EU791583, EU791585, EU791590 JX987810- JX987834, JX987837, EU791584, EU791586- EU791589 JX987835, JX987836, JX987843, JX987844, EU791591- EU791593	Texas México Equador Costa Rica
	COII	KF787591- KF787595 KF787582, KF787587- KF787590 KF787572- KF787581 KF787583- KF787586	Texas México Equador Costa Rica