FELIPE DA SILVA KRAWCZAK

Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em área endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul

FELIPE DA SILVA KRAWCZAK

Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em área endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2016

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.3361
FMVZ

Krawczak, Felipe da Silva

Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em área endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul / Felipe da Silva Krawczak. -- 2016.
165 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2016.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. Sorologia para riquetsias. 2. Ixodofauna RS. 3. Detecção molecular de riquetsias do RS. 4. Isolamento de riquetsias do RS. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em áreas endêmicas e não endêmicas nos biomas de Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul", protocolado sob o nº 2908/2013, utilizando Cães, equinos, pequenos mamíferos e carrapatos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, foi aprovado em reunião de 4/9/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Survey for rickettsial infection of the spotted fever group in dogs, small mammals and ticks in endemic and non-endemic areas of the Pampa and Atlantic forest biomes in the state of Rio Grande do Sul", protocol number 2908/2013, utilizing Dogs, horses, small mammals and ticks, under the responsibility Marcelo Bahia Labruna, was approved in the meeting of day 9/4/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 5 de maio de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: ceuavet@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KRAWCZAK, Felipe da Silva

Título: Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em área endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento** _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento** _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento** _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento** _____

Prof Dr. _____

Instituição: _____ **Julgamento** _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que fez tudo isto se tornar possível, pela minha vida e pelo restabelecimento total da minha saúde, depois do problema que tive em 2008 e também pela oportunidade de estar concluindo com êxito mais esta etapa da minha vida,

Aos meus pais Sr. Mauri Krawczak e Sra. Elaine da Silva Krawczak pelo amor incondicional, incentivo aos meus estudos e por serem meu maior exemplo de vida,

Ao meu estimado estado do Rio Grande do Sul, que da serra ao litoral da fronteira às missões é rico em tradições. Terra querida, onde todos, alfabetizados ou não, estudantes ou não, conhecem e cantam seu hino de coração,

Ao povo gaúcho que abriu as portas de suas casas com respeito e humildade, possibilitando assim o desenvolvimento do presente estudo,

Ao professor Dr. Marcelo Bahia Labruna, por confiar em meu potencial e por todas as oportunidades, ensinamentos, pelo exemplo de profissionalismo e pela grande amizade,

Ao professor Dr. Fábio Gregori, obrigado por auxiliar diretamente na minha formação profissional através das explicações, ensinamentos, pela paciência e amizade,

À professora Dra. Solange Maria Gennari por todas oportunidades, ensinamentos e pelo exemplo de profissionalismo,

Ao professor Dr. Ricardo Augusto Dias, pela amizade e dicas no projeto inicial que resultou o presente estudo,

Ao Dr. Arlei Marcili pelos ensinamentos relacionados a técnicas de coleta de campo e amizade,

A MSc. Gina Polo pelo auxílio na elaboração dos mapas e amparo nas análises estatísticas,

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP, em que durante estes 5 anos de convivência foram minha família em SP, pela amizade e por todos os ensinamentos compartilhados,

Especialmente ao Dr. Thiago Fernandes Martins, Dr. Jonas Moraes-Filho, Dr. João Fábio Soares, Dr. Francisco Costa Borges, Dra. Andréa Pereira da Costa, Dra. Fernanda Nieri-Bastos, MSc. Danilo Saraiva (*in memoriam*), MSc. Diego Garcia Ramirez, Dra. Amália Regina Mar Barbieri, MSc. Monize Gerardi, M.V Sebastian Muñoz Leal, MSc. Igor da Cunha Lima Acosta, MSc. Alejandro Ramírez Hernández, Srta. Lina de Campos Binder, muito obrigado a todos vocês,

Aos Funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ/USP: Sr. Danival, Sra. Cristina, Sra. Virgínia, Sra. Vanessa, Sr. Pedro, Sr. Renato, Sr. Marcio, Sr. Washington, Sra. Carlota e Dra. Hilda, muito obrigado por toda ajuda e auxílio quando solicitados que não foram poucas vezes, sempre atendendo com agilidade e cordialidade
meu muito obrigado a todos vocês,

À toda equipe que fez parte do presente estudo, em especial aos que contribuíram diretamente nas coletas de campo, Dr. Francisco Costa Borges, Dr. Jonas Sponchiado, Dr. Marcelo Bahia Labruna, MSc. Caroline Soboty de Oliveira, Srta. Lina de Campos Binder, M.Sc Cíntia Fogliatto Kronbauer, meu muito obrigado sem o auxílio direto de vocês este projeto jamais teria sido realizado com êxito,

À Cíntia Fogliatto Kronbauer meu muito obrigado pelo carinho, amor, incentivo e apoio nestes três anos em que estive ao meu lado, durante esta trajetória do meu doutorado,

Ao guarda parque Sr. Maurício Pereira, por toda ajuda nas coletas no Parque Estadual do Turvo-RS,

Aos senhores gestores do Parque Estadual do Turvo: engenheiro agrônomo Sr. Telmo João Rosa Lopes e ao MSc. Dante Andres Meller por todo apoio nas coletas realizadas no Parque Estadual do Turvo,

Ao biólogo Sr Felipe Kohls Rangel responsável pela Coordenação de Pesquisa e Manejo do Departamento de Unidades de Conservação do RS pela emissão das autorizações de coletas, permitindo assim a entrada no Parque Estadual do Turvo e Parque Estadual do Espinilho,

À prefeitura do município de Cerro Largo-RS, pelo incentivo ao desenvolvimento do projeto na área,

Às funcionárias da biblioteca da FMVZ/USP Sra. Elza Faquim e Sra. Evadne Azeredo Will pelo auxílio na formatação da presente tese,

Aos amigos, colegas e mestres que conheci no Centers for Disease Control and Prevention (CDC) de Atlanta, EUA: Dr. Christopher Paddock e Dr. Sandor Karphaty, Sra. Michelle Allerdice, Sra. Joy Hecht muito obrigado pela paciência e por todos os ensinamentos,

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo ao qual tenho muito orgulho de fazer parte, por toda a infraestrutura cedida,

À FAPESP pelo auxílio financeiro a partir do processo 2012/21915-4,

À CAPES pelo auxílio financeiro, proporcionando a oportunidade de apresentação dos resultados do presente estudo em eventos internacionais,

E a todas as pessoas que fizeram parte desta etapa de enorme aquisição de conhecimentos durante o meu doutorado e que não foram citadas diretamente.

MUITO OBRIGADO A TODOS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

À minha família, pois devo todas as minhas conquistas ao apoio de vocês, seja para comemorar nos momentos de vitória e alegria como também o amparo nos momentos difíceis.

Minha dedicatória é em especial ao meu pai Sr. Mauri Krawczak por ser meu melhor amigo e conselheiro e a minha mãe Sra. Elaine da Silva Krawczak por ser meu anjo guardião e sempre acreditar em mim,

Às minhas queridas avós Sra. Anilda Amaral da Silva e Sra. Hilda Krawczak (*in memorian*) por todo amor e carinho,

À minha irmã Srta. Francieli da Silva Krawczak pela amizade e por sempre torcer pelo meu sucesso,

Aos demais familiares:

Tios e Padrinhos: Sr. Leonir Krawczak, Sra. Danila Wolf, Sra. Selenir Maria Krawczak, Sr. Ereni Krawczak (*in memorian*), Sr. Marcelo Amaral da Silva e Sr. Jairo Amaral da Silva,

Aos primos e primas: Sra. Fabiana Krawczak Paz, Sra. Lidiane Krawczak Borges, Sr. Tiago Krawczak, Srta. Katianne Wolf Krawczak, Srta. Kaoanne Wolf Krawczak, Sr. Lucas Krawczak Paz, Srta. Luana Krawczak Paz, Srta. Juliani Krawczak Borges,

Aos meus avôs Sr. Arno Ervin Krawczak (*in memorian*) e Sr. Manoel Antônio da Silva (*in memorian*).

Obrigado família por toda ajuda nos momentos que precisei de vocês e por saber que sempre que precisar poderei contar com o amor de todos.

Sem eles, nada seria possível.....

“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância” (Hípócrates)

“Não conheço nenhuma fórmula infalível para obter o sucesso, mas conheço uma forma infalível de fracassar: tentar agradar a todos” (John F. Kennedy)

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”(Louis Pasteur)

RESUMO

KRAWCZAK, F. S. **Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em área endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul** [Survey for rickettsial infection of the spotted fever group in dogs, small mammals and ticks in endemic and non-endemic areas of the Pampa and Atlantic forest biomes in the state of Rio Grande do Sul]. 2016. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Em 2005 o primeiro caso de Febre Maculosa Brasileira (FMB) foi reconhecido no estado do Rio Grande do Sul (RS), Brasil. Desde então até abril de 2016 doze casos foram confirmados, sendo que quatro destes são autóctones do município de Cerro Largo, área considerada endêmica para a enfermidade riquetsial. Neste mesmo período o RS também notificou 58 casos suspeitos ao Ministério da Saúde. No RS são encontrados dois biomas, Mata Atlântica e Pampa, este último não ocorrendo em outras unidades federativa do país. Até o momento, inexistem estudos relatando a infecção por riquetsias na ixodofauna gaúcha. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a infecção de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) em cães, pequenos mamíferos e carrapatos; através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), qPCR e tentativa de isolamento de riquetsias em cultivo celular dos ixodídeos coletados em área endêmica (Cerro Largo) e áreas não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no RS. Na sorologia (RIFI), 33,5 % (55/164), 2,9% (1/33), 40% (16/40) dos pequenos mamíferos e 8,3% (3/36), 13,9% (5/36) e 20,4 (28/137) dos cães coletados na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB, respectivamente, foram sororreagentes para pelo menos um dos seis antígenos de riquetsias testados. Oito espécies de carrapatos foram coletadas no local de Mata Atlântica, sendo: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma ovale*, *Haemaphysalis juxtakochi*, *Ixodes loricatus*, *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma yucumense* com destaque para esta última que foi descrita como uma espécie nova. Já para o fragmento de Pampa quatro espécies foram encontradas (*A. aureolatum*, *A. ovale*, *Amblyomma tigrinum* e *Rhipicephalus sanguineus*) e na área endêmica para FMB no RS, coletamos cinco espécies de carrapatos, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma longirostre*, *A. ovale*, *I. loricatus* e *R. microplus*. Detectamos molecularmente pela primeira vez no RS, *Candidatus Rickettsia amblyommii* em *A. longirostre* e *A. brasiliense*, *Candidatus Rickettsia*

andeanae em *A. aureolatum* e *A. tigrinum*, *Rickettsia bellii* em *I. loricatus*, *Rickettsia rhipicephali* em *A. yucumense* e *H. juxtakochi*, *Candidatus Rickettsia asemboensis* em pulgas no Brasil e de extrema importância para o conhecimento da epidemiologia da FMB no RS, detectamos *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica em *A. ovale* oriundos de Cerro Largo (área endêmica para FMB no RS). Como primeiros isolamentos de riquetsia para o estado do RS, isolamos *R. bellii* de *I. loricatus* coletados na Mata Atlântica e área endêmica para FMB no RS. O presente estudo é pioneiro em relação a investigação comparativa sobre FMB nos biomas Pampa e Mata Atlântica e também o primeiro estudo molecular e isolamento de riquetsias em cultivo celular de amostras coletadas no RS, Brasil.

Palavras chave: Sorologia para riquetsias. Ixodofauna RS. Detecção molecular de riquetsias do RS. Isolamento de riquetsias do RS.

ABSTRACT

KRAWCZAK, F. S. Survey for rickettsial infection of the spotted fever group in dogs, small mammals and ticks in endemic and non-endemic areas of the Pampa and Atlantic forest biomes in the state of Rio Grande do Sul [Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em área endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul]. 2016. 165 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

In 2005 the first Brazilian Spotted Fever (BSF) case was confirmed in the Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil. Ever since until April 2016, twelve cases have been confirmed, and four of them are native from Cerro Largo city, an area considered endemic to the rickettsial illness. During the same period, RS also notified 58 suspected cases to the Ministry of Health. There are two distinct biomes in RS, Atlantic Forest and Pampa, the later restricted to RS within the Brazilian land. Until now, no studies reported rickettsial infection in the ixodofauna of RS. Thus, this study aimed to investigate the rickettsial infection of Spotted Fever Group (SFG) in dogs, small mammals and ticks; by immunofluorescence assay (IFA), qPCR and attempted rickettsial isolation in cell culture from ticks collected in an endemic area (Cerro Largo) and non-endemic areas in Pampa and Atlantic Forest biomes of RS. Through serology (IFA), 33.5% (55/164), 2.9% (1/33) and 40% (16/40) small mammals, and 8.3% (3/36), 13.9 % (5/36) and 20.4 (28/137) dogs from the Atlantic Forest, Pampa, and BSF-endemic area, respectively, were seroreactive (titer ≥ 64) to at least one of the six rickettsia antigens tested. Eight species of ticks were collected in the Atlantic Forest: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma ovale*, *Haemaphysalis juxtakochi*, *Ixodes loricatus*, *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma yucumense*, the later described as a new species. In the Pampa fragment, four tick species were found (*A. aureolatum*, *A. ovale*, *Amblyomma tigrinum* and *Rhipicephalus sanguineus*), and five tick species (*Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma longirostre*, *A. ovale*, *I. loricatus*, *R. microplus*) in the BSF-endemic area of RS. We performed the first molecular detection in the RS state of "*Candidatus* Rickettsia amblyommii" in *A. longirostre* and *A. brasiliense*; "*Candidatus* Rickettsia andeanae" in *A. aureolatum* and *A. tigrinum*; *Rickettsia bellii* in *I. loricatus*; *Rickettsia rhipicephali* in *A. yucumense* and *H. juxtakochi*; and "*Candidatus* Rickettsia asemboensis" in fleas in Brazil. Noteworthy, we detected the pathogen *Rickettsia* sp.

strain Atlantic rainforest in *A. ovale* ticks from Cerro Largo (endemic area for BSF in RS). We also performed the first isolation in cell culture of rickettsia from RS state, which comprised *R. bellii* from *I. loricatus* collected in the Atlantic Forest and the BSF-endemic area. This study is the first comparative research about rickettsiae among Pampa and Atlantic Forest biomes, and also the first molecular detection and isolation in cell culture of rickettsiae from Rio Grande do Sul, Brazil.

Keywords: Rickettsial serology. RS Tick fauna. Rickettsial molecular detection from RS. Rickettsial isolation from RS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vegetação, fauna e ameaças causadas pela agricultura e pecuária em relação a preservação do Parque Estadual do Espinilho (PEE).....	42
Figura 2 - Fitofisionomia, fauna e características de áreas lindeiras ao Parque Estadual do Turvo	47
Figura 3 - Características da zona rural do município de Cerro Largo- RS	50
Figura 4 - Locais de coletas no Bioma Mata Atlântica, Pampa e Área endêmica para FMB no RS.....	55
Figura 5 - Método de identificação, contenção e venopunção dos cães amostrados.....	59
Figura 6 - Localização e pontos de coleta de pequenos mamíferos no Parque Estadual do Turvo, Mata Atlântica.....	61
Figura 7 - Localização e pontos de coleta de pequenos mamíferos na área endêmica para FMB, Cerro Largo- RS.....	62
Figura 8 - Localização e pontos de coleta de pequenos mamíferos no Parque Estadual do Espinilho, Pampa- RS	62
Figura 9 - Armadilhas do tipo Pitfall e pequenos mamíferos coletados durante as três etapas de coletas, RS-2015	63
Figura 10 - Coleta de carrapatos nos cães, pequenos mamíferos e ambiente no RS	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Detalhamento das áreas que foram selecionadas para realização do estudo da Febre Maculosa Brasileira no Rio Grande do Sul	55
Tabela 2 -	Período das Coletas: Ordem das coletas por área, estação Climática do ano, duração e quais animais foram amostrados.....	56
Tabela 3 -	Número de cães amostrados por área de coleta no Rio Grande do Sul, submetidos à RIFI frente a seis antígenos de riquetsias do GFM.....	58
Tabela 4 -	Pequenos mamíferos coletados no município de Derrubadas-RS (Mata Atlântica), área não endêmica para Febre Maculosa, entre junho de 2013 a janeiro de 2014 e sorologia para riquetsias do GFM.....	78
Tabela 5 -	Pequenos mamíferos coletados no município de Cerro Largo-RS (área endêmica para Febre Maculosa) entre junho de 2013 a janeiro de 2014 e sorologia para riquetsias do GFM.....	79
Tabela 6 -	Sorologia para riquetsias de cães, coletados em junho de 2013 e janeiro de 2014 nos municípios de: Derrubadas (Mata Atlântica), Cerro Largo (Área endêmica) e Barra do Quaraí- RS (Pampa)	82
Tabela 7 -	Carrapatos coletados de cães na Mata Atlântica, Cerro Largo (Área endêmica) e Pampa, entre junho de 2013 a janeiro de 2014	82
Tabela 8 -	Carrapatos coletados do ambiente entre junho de 2013 a Janeiro de 2014 no Parque Estadual do Turvo (Mata Atlântica), Cerro Largo (Área endêmica) e no Parque Estadual do Espinilho (Pampa)	83
Tabela 9 -	Identificação dos carrapatos coletados dos pequenos mamíferos capturados na Mata Atlântica entre junho de 2013 a janeiro de 2014	84
Tabela 10 -	Identificação dos carrapatos coletados dos pequenos mamíferos na área endêmica para FMB no RS entre junho de 2013 a janeiro de 2014	85
Tabela 11 -	Detecção molecular de riquetsias pela qPCR, nos carrapatos coletados entre junho de 2013 a janeiro de 2014 na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica no RS.....	88
Tabela 12 -	Resultado da técnica de shell vial aplicada nos carrapatos coletados na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS, durante junho de 2013 e janeiro de 2014	89
Tabela 13 -	Carrapatos coletados sobre humanos entre junho de 2013 a janeiro de 2014, na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS	91
Tabela 14 -	Sequências de DNA obtidas dos isolados e carrapatos coletados entre junho de 2013 e janeiro de 2014 na Mata Atlântica (DE), Pampa (BQ) e Área endêmica para FMB (CL) no RS	92
Tabela 15 -	Identificação dos carrapatos depositados na Coleção Nacional de Carrapatos da FMVZ-USP	93

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	Febre Maculosa Brasileira: <i>Rickettsia rickettsii</i> versus <i>Rickettsia</i> sp. cepa Mata Atlântica	28
2.2	Cenário ambiental e carrapatos vetores de riquetsioses pertencentes ao GFM no Brasil	31
2.3	Situação da Febre Maculosa no Rio Grande do Sul	36
2.4	O uso de animais como sentinelas de FMB	38
2.5	Descrição do Pampa no RS: Parque Estadual do Espinilho	39
2.6	Mata Atlântica no RS: Parque Estadual do Turvo	43
2.7	Cerro Largo-RS, área endêmica para FMB	48
3	OBJETIVOS	52
3.1	Geral	52
3.2	Específicos.....	52
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	54
4.1	Áreas de Estudo	54
4.2	Períodos de coleta.....	56
4.3	Amostragem e coleta de sangue para sorologia dos cães	57
4.4	Captura de pequenos mamíferos e coleta de sangue	59
4.5	Coletas de carrapatos	63
4.6	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	66
4.7	Identificação dos carrapatos	67
4.8	Teste de Hemolinfa.....	68
4.9	Extração de DNA dos carrapatos	68
4.10	Deteção molecular de riquetsias nos carrapatos, utilizando a ferramenta da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real time PCR ou qPCR)	69
4.11	Análise dos produtos amplificados.....	70
4.12	Purificação e sequenciamento de nucleotídeos	70
4.13	Isolamento e deteção de <i>Rickettsia</i>	71
4.14	Manutenção em laboratório dos isolados de riquetsias	72
4.15	Identificação genotípica dos isolados de <i>Rickettsia</i> e das PCR's positivas dos carrapatos.....	73
4.16	Frequência de carrapatos infectados.....	74
4.17	Preenchimento do questionário	74
4.18	Análise estatística	74
4.19	Construção dos Mapas.....	75
5	RESULTADOS.....	77

5.1	Pequenos Mamíferos coletados no bioma Mata Atlântica: presença de carrapatos e sorologia para riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM).....	77
5.2	Pequenos mamíferos coletados no bioma Pampa: presença de carrapatos e sorologia para riquetsias do GFM	78
5.3	Pequenos mamíferos coletados em Cerro Largo-RS, área endêmica para FMB: presença de carrapatos e sorologia para riquetsias do GFM	78
5.4	Cães coletados no bioma Mata Atlântica: carrapatos e sorologia para riquetsias	79
5.5	Cães coletados no bioma Pampa: carrapatos e sorologia para riquetsias	80
5.6	Cães coletados em Cerro Largo- RS, área endêmica para FMB: carrapatos e sorologia para riquetsias	80
5.7	Carrapatos coletados no bioma Mata Atlântica, área não endêmica para FMB.....	81
5.8	Carrapatos coletadas no bioma Pampa, área não endêmica para FMB	82
5.9	Carrapatos coletados no município de Cerro Largo-RS, área endêmica para FMB	83
5.10	Deteção molecular de riquetsias nos carrapatos coletados entre junho de 2013 a janeiro de 2014, na Mata Atlântica, área endêmica para FMB e Pampa.....	85
5.11	Comparação entre as as taxas de infestação por carrapatos e sorologias para riquetsias do GFM dos pequenos mamíferos e dos cães para as três áreas coletadas	86
5.12	Isolamento de riquetsias dos carrapatos coletados na Mata Atlântica, área endêmica para FMB e no Pampa.....	89
5.13	Carrapatos coletados sobre o corpo ou parasitando os pesquisadores durante as etapas das coletas na: Mata Atlântica, Pampa e Área endêmica para FMB no RS.....	90
5.14	Número de depósito no <i>Genbank</i> das sequências de DNA que foram sequenciadas dos carrapatos e dos isolados.....	90
5.15	Identificação do depósito na Coleção Nacional de Carrapatos da FMVZ-USP dos ixodídeos amostrados	91
6	DISCUSSÃO	95
6.1	Diversidade de carrapatos coletados em fragmentos dos biomas Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS	95
6.2	Ixodidose em cães que habitam os biomas Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS.....	100
6.3	Parasitismo por carrapatos em pequenos mamíferos capturados em fragmentos dos biomas Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS.....	104
6.4	Carrapatos coletados sobre o corpo e ou parasitando humanos durante as etapas das coletas na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS	108
6.5	Carrapatos coletados do ambiente na Mata Atlântica, Pampa e Área endêmica para FMB no RS	110
6.6	Deteção molecular e isolamento de riquetsias.....	112
6.7	Sororreatividade frente a antígenos de riquetsias em pequenos mamíferos coletados na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS	117

6.8	Sororreatividade frente a antígenos de riquetsias em cães coletados em fragmentos dos biomas Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS	121
7	CONCLUSÃO	127
	REFERÊNCIAS	129
	APÊNDICES.....	160
	ANEXO.....	165

1 INTRODUÇÃO

O êxodo rural, iniciado no Brasil na década de 1950, provocou um crescimento desordenado das cidades. Dados do censo de 2010 realizado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) apontam que no Brasil 84,4% de sua população concentra-se em áreas urbanas (IBGE, 2010). Este processo de urbanização de áreas antes consideradas rurais aproxima o homem e os animais domésticos do contato com animais silvestres, sendo estes possíveis hospedeiros de carrapatos, aumentando o risco de infecção por doenças transmitidas por estes vetores, como por exemplo as riquetsias (SANGIONI, 2003).

A interferência humana sobre a vegetação nativa exerce um papel importante no surgimento e expansão das riquetsioses. Isto pode ser evidenciado com o reflorestamento empregando vegetação arbustiva, próximo à prática agrícola de monoculturas, favorecendo dois aspectos: primeiro a proliferação de artrópodes devido à formação de microclimas favoráveis, o qual gera um excelente habitat, contribuindo com a sobrevivência de algumas espécies de ixodídeos e em segundo plano, temos também o aumento de determinados mamíferos hospedeiros dos estágios intermediários de carrapatos, que pode ocorrer devido à oferta de alimento abundante, gerada pela proximidade das plantações a estas florestas artificiais (SONESHINE; PETERS; LEVY, 1972; CARDOSO et al., 2006).

Carrapatos, ectoparasitas considerados de importância econômica e com significativo papel como vetores de patógenos para animais e humanos, são classificados pela taxonomia como: artrópodes pertencentes a classe Arachnida, ordem Acari, subordem Ixodida e famílias Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. Ixodidae e Argasidae estão amplamente distribuídas, enquanto que Nuttalliellidae, família monotípica, até o momento conhecida como sem importância médica, está restrita à África do Sul e Tanzânia. Guglielmone et al. (2010); Guglielmone e Nava (2010) e Barros-Battesti et al. (2015) descrevem que a família Argasidae é constituída aproximadamente por 200 espécies, distribuídas nas subfamílias: Argasinae e Ornithodorinae. A família Ixodidae está representada atualmente por 14 gêneros e mais de 700 espécies, subdivididas em 2 grupos, Prostriata com 242 espécies, todas do gênero *Ixodes* e Metastriata com 458 espécies divididas nos 13 gêneros a seguir: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*,

Bothriocroton, Compluriscutula, Cornupalpatum, Cosmiomma, Dermacentor, Haemaphysalis, Hyalomma, Margaropus, Nosomma, Rhipicentor e Rhipicephalus.

Carrapatos ixodídeos são ectoparasitas obrigatórios e o hábito hematofágico os transforma em vetores de vários agentes infecciosos, como protozoários, vírus, bactérias, incluindo as riquetsias, tanto para humanos como para animais (SONESHINE; ROE, 2014). Considerando a longevidade excepcional destes artrópodes eles se tornam não apenas vetores, mas também reservatórios de agentes infecciosos (LABUDA; NUTTALL, 2004).

Os animais domésticos e silvestres estão frequentemente expostos a diferentes espécies de carrapatos, dependendo da distribuição destes artrópodes no ambiente (SARAIVA et al., 2012; SZABÓ et al., 2012). Recentemente, o interesse em carrapatos de animais domésticos tem aumentado devido as doenças emergentes e reemergentes transmitidas por eles, incluindo aquelas causadas por riquetsias, devido ao seu caráter zoonótico e elevada letalidade. Guglielmone et al. (2006) evidenciam que 28 espécies de carrapatos são descritas parasitando humanos na América do Sul, sendo estas pertencentes aos seguintes gêneros: 21 de *Amblyomma*, 2 de *Dermacentor*, 2 de *Haemaphysalis*, 1 *Ixodes* e 2 *Rhipicephalus*.

O estado do RS possui em sua fitofisionomia dois biomas, Mata Atlântica e Pampa. O primeiro amplamente distribuído pelos demais estados brasileiros, abrangendo 17 unidades federativas do Brasil. Já o Pampa está restrito ao estado do RS. Sendo assim, o RS conta com uma fauna e flora riquíssimas, várias espécies de plantas e animais são endêmicas para o estado (GALVANI; BAPTISTA, 2003; ZANIRATO, 2010), tudo isto contribui para a manutenção de várias espécies de carrapatos.

A ixodofauna gaúcha contempla cerca de 31 espécies de carrapatos, com destaque para o *Amblyomma yucumense* Krawczak, Martins & Labruna n. sp (2015) uma nova espécie de ixodídeo recentemente descrita e até o presente detectada somente em uma área de Mata Atlântica no RS (EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000; KRAWCZAK et al., 2015). Todavia, apesar do RS contar com 12 casos confirmados e mais 58 notificações de FMB, onde cerca de 11. 247, 972 (IBGE, 2015a) habitantes estariam expostos a uma possível infestação de carrapatos e consequentemente infecção por algum agente riquetsial, estudos visando a detecção de riquetsias na ixodofauna do RS ou análise sorológica em pequenos mamíferos silvestres no estado não haviam sido realizados.

Até o momento, apenas dois estudos sorológicos foram desenvolvidos no RS, um destes foi realizado especificamente no município de Cerro Largo, cidade endêmica para a enfermidade e outro na região de Pelotas (cidade localizada no Pampa). Os estudos indicaram que equinos, cães e humanos entraram em contato com riquetsias do GFM (SAITO et al., 2008; SANGIONI et al., 2011). Sendo assim, o RS se fazia carente de pesquisas que buscassem uma melhor compreensão das riquetsioses em seu território. Desta forma, o presente estudo teve como objetivo pesquisar a infecção de riquetsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos; através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) de soros dos animais amostrados e também a partir da qPCR e tentativa de isolamento de riquetsias em cultivo celular dos ixodídeos coletados em área endêmica (Cerro Largo) e áreas não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no RS.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

A designação de enfermidades “emergentes” se refere às doenças anteriormente inexistentes ou raras e cuja prevalência aumentou consideravelmente (TELFORD; GOETHERT, 2004). A prevalência crescente pode ser atribuída em muitos casos ao simples reconhecimento e diagnóstico de doenças infecciosas ou não, já pré-existentes, o que difere de enfermidades emergentes. A diferenciação entre estas duas situações, conceitos, não tem apenas importância acadêmica e didática; enfermidades emergentes estão associadas a um incremento real no número de casos para patamares e consequências desconhecidas. Assim sendo, a distinção entre as duas situações é de extrema relevância norteando atitudes visando a saúde pública e animal.

As riquetsioses “emergentes”, que na realidade circulam na população humana muito antes de serem descobertas como agentes causais de infecções únicas, na maioria das vezes são confundidas com uma doença clinicamente semelhante e historicamente reconhecível. Isto deve-se ao fato de que os patógenos mais virulentos são tipicamente os primeiros a serem identificados e caracterizados. Subsequentes descobertas de “novos agentes” patogênicos podem ser negligenciadas devido a associações errôneas aos patógenos inicialmente descritos. Até que um investigador astuto reconhece diferenças sutis, como sinais clínicos e epidemiológicos, ou executa testes de confirmação que fornecem um diagnóstico específico do agente (PADDOCK et al., 2004, 2008b; PADDOCK, 2009; SPOLIDORIO et al., 2010)

Nas últimas décadas no Brasil, mais precisamente desde 1988, na região sudeste do país houve reemergência das infecções riquetsiais (LABRUNA, 2009). A razão para este incremento das doenças humanas causadas por riquetsias inclui diversos fatores, nem sempre bem elucidados. Modificações ecológicas com alteração na diversidade e distribuição geográfica de animais e plantas, medidas de conservação frequentemente acompanhadas por favorecimento de determinadas espécies em detrimento de outras, crescente contato de seres humanos com nichos naturais para lazer e descanso estão entre os possíveis fatores causais (OGRZEWALSKA et al., 2011; SILVA et al., 2014).

As doenças causadas por riquetsias estão amplamente distribuídas pelo mundo em focos endêmicos e geralmente aparecem em intervalos, reemergindo de forma epidêmica na população humana (AZAD; BEARD, 1998). As riquetsioses estão associadas a diversos artrópodes, incluindo piolhos, pulgas, carrapatos e outros ácaros (PAROLA et al., 2013).

O gênero *Rickettsia* compreende organismos intracelulares obrigatórios pertencentes à família Rickettsiaceae e ordem Rickettsiales, que se multiplicam por fissão binária em ambos hospedeiros, vertebrados e invertebrados. São bactérias pleomórficas, gram-negativas, cocobacilares com paredes celulares complexas que contêm ácido murâmico e retêm fucsina básica, quando coradas pelo método de Gimenez (1964).

Com base nos padrões antigênicos, moleculares e ecológicos as riquetsias foram divididas classicamente em três grupos: 1) Grupo do Tifo (GT), representado pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, cujos vetores principais são insetos (piochos e pulgas, respectivamente), 2) Grupo da Febre Maculosa (GFM), composto por mais de 23 espécies válidas, e a transmissão da grande maioria está associada a carrapatos, com exceção da *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*, transmitidas por pulgas e ácaros, respectivamente. Outras espécies de riquetsias, tais como, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* não estão inseridas em nenhum destes dois grupos, sendo considerado um Grupo Ancestral (GA) (YU; WALKER, 2006).

Riquetsias pertencentes ao GFM podem ser observadas no núcleo das células hospedeiras, talvez porque elas são capazes de mover-se dentro da célula por meio de polimerização de actina, já as riquetsias do GT são visualizadas exclusivamente no citoplasma. O tamanho do genoma riquetsial é pequeno, contendo ao redor de 1 a 1,6 Mb e consistem de um único cromossoma circular (HOOGSTRAAL, 1967; RAOULT; ROUX, 1997).

Parola et al. (2013) demonstram que cerca de 19 espécies de riquetsias veiculadas por carrapatos, comprovadamente causam infecções no homem, sendo estas: *Rickettsia africae*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia philipii*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia tamurae*, *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest or strain Bahia e “*Candidatus Rickettsia kellyi*”. Merhej e Raoult (2011) apontam 22 espécies de riquetsias causando infecções no homem, incluindo nestas: *Rickettsia akari*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi* e *Rickettsia felis*, transmitidas por ácaros, piochos e pulgas respectivamente.

Em uma revisão de Labruna (2009), foi relatado que até a primeira década deste novo século dez espécies de riquetsias haviam sido reportadas para a América do Sul e ainda ressalta que até o ano de 2000 somente três riquetsias haviam sido diagnosticadas no continente (*R.*

rickettsii, *R. typhi* e *R. prowazekii*). No entanto, estudos mais recente, no qual podemos destacar Labruna et al. (2011) ampliam a lista e distribuição desta bactéria para o continente sul americano, onde: *R. felis* foi encontrada infectando pulgas na Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Peru e Uruguai (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2016); *R. parkeri* infectando carrapatos na Argentina, Bolívia, Brasil e Uruguai; *R. massiliae* infectando carrapatos na Argentina; *Candidatus Rickettsia amblyommii* em carrapatos na Argentina, Brasil, Colômbia, Guiana Francesa e Paraguai (OGRZEWALSKA et al., 2014; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2016); *R. bellii* infectando carrapatos na Argentina, Brasil e Colômbia (MIRANDA; MATTAR, 2014); *R. rhipicephali* infectando carrapatos no Brasil; *R. montei* em carrapatos no Brasil; *Candidatus Rickettsia andeanae* infectando carrapatos na Argentina, Brasil, Chile, Paraguai e Peru (ABARCA et al., 2013; NIERI-BASTOS et al., 2014; OGRZEWALSKA et al., 2014) e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica em *A. aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil, em *A. ovale* no Brasil e Colômbia e em *Amblyomma dubitatum* na Argentina (SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; BARBIERI et al., 2014; LONDOÑO et al., 2014; MONJE et al., 2015). Entre estas riquetsias todas as espécies estão classificadas no GFM, exceto *R. bellii* que não faz parte do GT e nem GFM. Entretanto no continente sul americano somente quatro espécies de riquetsias são apontadas como patogênicas para humanos, sendo estas: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. massiliae*, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (PAROLA et al., 2013)

As bactérias do gênero *Rickettsia* se especializaram em nichos ecológicos muito restritos e seu ciclo natural depende apenas de um hospedeiro, geralmente um artrópode (FIGUEIREDO, 1996). Na natureza, a manutenção do ciclo das riquetsias é garantida pela capacidade dos carrapatos atuarem como vetores reservatórios e/ou amplificadores (PAROLA et al., 2013), os quais transmitem a doença ao homem, embora este seja considerado um hospedeiro acidental e a sua infecção um reflexo de mudanças ecológicas produzidas no ambiente (HOOGSTRAAL, 1967; FRIEDHOFF, 1990; OGRZEWALSKA et al., 2012b). Portanto, a Febre Maculosa Brasileira tem como característica uma maior incidência em populações habitando áreas rurais ou suburbanas de forma endêmica e epidêmica (DIAS; MARTINS, 1939; SILVA et al., 2014)

2.1 Febre Maculosa Brasileira (FMB): *Rickettsia rickettsii* versus *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica

A FMB possui como principal agente etiológico a bactéria *R. rickettsii*, os primeiros casos confirmados da doença no país são relatos de 1929 para o estado de São Paulo (PIZA, 1932) e no começo da década de 30 em Minas Gerais (DIAS; MARTINS, 1939). Atualmente no Brasil a enfermidade já têm sido relatada em determinadas áreas dos estados da região Sudeste (SANGIONI et al., 2005), como: São Paulo (SP), Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (SILVA; GALVÃO, 2004). Para a região Norte somente um caso até o presente foi confirmado, sendo este oriundo de Rondônia; no Nordeste apenas a Bahia e Ceará confirmaram casos; no Centro-Oeste o Distrito Federal e Goiás detectaram a presença da doença e na região sul, Paraná, Santa Catarina (SC) e Rio Grande do Sul também possuem casos confirmados de FMB (SILVA et al., 2014; BRASIL, 2016a).

Dentre as cinco regiões político administrativas do Brasil, supracitadas, a região Sul com 382 casos confirmados de FMB ocupa a segunda posição em relação a casuística da enfermidade, perdendo somente para a região sudeste. Isto ocorre devido ao estado de SC, localizado na região Sul, estar ocupando a segunda posição em relação a confirmação de casos de FMB, atrás somente de SP. Já o RS dentre as 27 unidades federativas do país ocupa a sétima colocação em relação ao número de casos confirmados de FMB (SILVA et al., 2014; BRASIL, 2016a).

Os carrapatos vetores de *R. rickettsii* para humanos, conhecidos até o momento, são: *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus* nos Estados Unidos (DEMMA et al., 2005); *R. sanguineus* e *Amblyomma mixtum* (publicado como *A. cajennense*) no México (BUSTAMANTE; VARELA, 1947; EREMEEVA et al., 2011); *A. cajennense sensu lato* (*s.l.*) na Argentina (PADDOCK et al., 2008a) *A. mixtum* (publicado como *A. cajennense*) no Panamá (RODANICHE, 1953), *Amblyomma patinoi* (publicado como *A. cajennense*) na Colômbia (PATIÑO-CAMARGO, 1941); *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) e *Amblyomma aureolatum* no Brasil (GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006; KRAWCZAK et al., 2014; SARAIVA et al., 2014).

Apesar de não existir uma confirmação de populações fixas de *A. sculptum* no Rio Grande do Sul (RS), devido a fatores abióticos desfavoráveis para esta espécie no estado (MARTINS et al., 2016a), a presença de *A. aureolatum* (MARTINS, J.R et al., 2010) e *Amblyomma ovale*

(EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000) são constantes no RS.

Sabatini et al. (2010) detectaram em *A. ovale* no Estado de São Paulo a presença de uma riquetsia denominada de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, uma bactéria muito próxima a *Rickettsia parkeri* a qual foi irrefutavelmente, neste mesmo estado, apontada pela primeira vez como uma nova riquetsiose humana do GFM, distinta daquela causada pela *R. rickettsii* no sudeste brasileiro e das demais riquetsioses do mundo e devido a sua distribuição espacial esta doença vem sendo popularmente chamada de Febre Maculosa da Mata Atlântica (SPOLIDORIO et al., 2010). Silva et al. (2011) relataram pela segunda vez esta nova riquetsiose brasileira, na ocasião o relato foi para o estado da Bahia onde um paciente do sexo masculino foi acometido pela bactéria, porém neste mesmo trabalho apesar das sequências de fragmentos dos genes *gltA* e *ompA* terem se mostrado 100% idênticas as de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, depositadas no *Genbank*, os autores optaram em denominar o agente naquele estudo como *Rickettsia* sp. Bahia.

Medeiros et al. (2011) e Barbieri et al. (2014) relataram a infecção por *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica em carrapatos *A. ovale*, *A. aureolatum* e *R. sanguineus* no estado de SC, expandindo a ocorrência deste novo patógeno para a região Sul do Brasil. Mais recentemente, Krawczak et al. (2016c) demonstraram através de técnicas moleculares a riquetsia cepa Mata Atlântica causando infecção em um paciente no estado de SC, sendo este o terceiro reporte desta nova riquetsiose afetando humanos no país.

Apesar de 1.747 quilômetros separarem os dois locais, Bahia no Nordeste e SC ao Sul, pontos extremos onde comprovadamente ocorreram casos humanos de Febre Maculosa da Mata Atlântica, em ambas as situações os locais em que os pacientes foram parasitados por carrapatos (LPI= Local Provável de Infecção) estão localizados no bioma de Mata Atlântica, inclusive no caso primevo de SP, por isto a enfermidade está sendo popularmente chamada de Febre Maculosa da Mata Atlântica. Entretanto, em nenhum dos três casos foi possível a identificação dos ixodídeos que estavam parasitando os indivíduos.

Spolidorio et al. (2010) demonstraram através de análises moleculares que filogeneticamente a cepa Mata Atlântica está próxima de *R. parkeri*. Semelhante também são os sinais clínicos causados pela *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica quando comparados com o infecções atribuídas a *R. parkeri*, descrita como patogênica para humanos nos Estados Unidos desde 2004 (PADDOCK et al., 2004; ANGERAMI et al., 2009). Assim como para a riquetsiose branda norte-americana (*R. parkeri*) nenhum caso de óbito, até o presente, foi correlacionado à

cepa Mata Atlântica. Com isto, esta riquetsiose da Mata Atlântica apresenta um cenário epidemiológico totalmente distinto do causado por infecções atribuídas à *R. rickettsii*, que geram uma taxa de letalidade entre 5 a 10% nos EUA e 20 a 40% no Brasil, sendo que para o último país a mortalidade pode chegar a 80% no caso dos pacientes não tratados (PADDOCK et al., 2008b; ANGERAMI et al., 2009; LABRUNA et al., 2014; SILVA et al., 2014; BRITES-NETO; MARIA DUARTE RONCATO; MARTINS, 2015).

Nos Estados Unidos *R. parkeri* é conhecida desde 1939, porém só foi apontada como patogênica para seres humanos em 2004 ou seja mais de 60 anos depois da sua descoberta (PADDOCK et al., 2004). Até então, provavelmente, muitos casos de riquetsioses humanas causados pela *R. parkeri* foram atribuídas á casos brandos de infecção por *R. rickettsii* (PADDOCK et al., 2008b). Mais ao sul do continente Americano, na Argentina, foram comprovados casos de riquetsiose em humanos apresentando como agente etiológico *R. parkeri* (ROMER et al., 2011). No sudeste do Uruguai há evidências convincentes que *R. parkeri sensu stricto* (*s.s.*) seja o agente responsável pelos casos reportados anteriormente de riquetsioses do GFM, com transmissão pelo *A. triste* (VENZAL et al., 2004; PADDOCK, 2005).

Recentemente Lado et al. (2014) relatam também a detecção molecular de *R. parkeri* no Uruguai em *A. tigrinum* e *A. dubitatum*, apesar destes ixodídeos apresentarem um grau de antropofilia inferior ao *A. triste*, estes carrapatos não podem ter sua importância descartada na epidemiologia da febre maculosa no Uruguai, pois Romer et al. (2014) detectaram *R. parkeri* em *A. tigrinum* na Argentina em áreas onde *A. triste* está ausente, incriminando assim este ixodídeo como vetor de *R. parkeri* na província de Córdoba. Entretanto, na Argentina assim como no Uruguai o vetor mais associado a casos de febre maculosa gerados por *R. parkeri* persiste sendo o *A. triste* (NAVA et al., 2008; ROMER et al., 2011)

No Brasil Silveira et al. (2007) identificaram pela primeira vez a bactéria *R. parkeri* (*s.s.*) no país, em área rural do município de Paulicéia-SP, o bioagente foi detectado em três espécimes de *A. triste*. Neste mesmo estudo a bactéria foi isolada pela primeira vez na América do Sul em cultivo celular de células Vero e recebeu a denominação de *Rickettsia parkeri* cepa At 24. Porém, distintamente do panorama que ocorre nos países limítrofes, Argentina e Uruguai, nem um caso de riquetsiose humana no Brasil é atribuído a *R. parkeri* (*s.s.*).

2.2 Cenário ambiental e carrapatos vetores de riquetsioses pertencentes ao GFM no Brasil

A fauna de carrapatos brasileira atualmente é composta por 69 espécies, divididas em duas famílias, Ixodidae (46 espécies) e Argasidae (23 espécies) (BARROS-BATTESTI et al., 2015; KRAWCZAK et al., 2015; WOLF et al., 2016). Para o Rio Grande do Sul são descritas aproximadamente 31 espécies de carrapatos, três pertencentes a família Argasidae e cerca de 28 da família Ixodidae (EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000; KRAWCZAK et al., 2015).

Das 69 espécies de carrapatos encontradas nos 8.515.767,049 km² (IBGE, 2012) do território brasileiro, 21 delas são reportadas parasitando humanos no país, sendo estas: *A. aureolatum*; *A. brasiliense*, *A. cajennense*, *A. coelebs*, *A. dissimile*, *A. dubitatum*, *A. fuscum*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. parvum*, *A. romitii*, *A. sculpturatum*, *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) *A. tigrinum*, *Dermacentor nitens*, *Haemaphysalis juxtakochi*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (GUGLIELMONE et al., 2006). Entretanto, inexiste publicação científica que descreva todas as espécies de carrapatos que já foram registradas parasitando humanos no RS.

Apesar de 69 metastigmatas comporem a ixodofauna brasileira, somente três espécies são capazes de veicular riquetsias para humanos no país: *A. aureolatum*, *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) e *A. ovale* (PINTER; LABRUNA, 2006; BARBIERI et al., 2014; KRAWCZAK et al., 2014, 2016a; SARAIVA et al., 2014). O cenário de transmissão de FMB entre estas três espécies de ixodídeos, acima mencionados, é extremamente distinto. Apesar de mais estudos serem necessários o carrapato do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, em situações peculiares pode agir como um possível vetor de FMB no país (MORAES-FILHO et al., 2009; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

No Brasil *A. sculptum* possui uma distribuição que engloba todo o bioma Cerrado e Pantanal, e grande parte da Mata Atlântica. Esta distribuição coincide com o clima tropical. É interessante notar a ausência de *A. sculptum* no sul, RS, do Brasil coincidindo com o clima subtropical, o que sugere que as temperaturas mais baixas durante o outono e inverno nesta região acabam agindo como um fator limitante no estabelecimento de populações de *A. sculptum*. Em relação a Mata Atlântica *A. sculptum* está intimamente ligado a áreas degradadas e quase

como via de regra não sendo coletado em remanescentes naturais deste bioma (SZABÓ et al., 2009; MARTINS et al., 2016a).

A. sculptum está associado a matas ciliares, próximas aos ambientes antropizados. Na verdade tais florestas ribeirinhas são preferidos habitats de capivaras, hospedeiro preferencial para este artrópode, e um lugar comum para o contato do carrapato com os seres humanos em busca de lazer (SOUZA et al., 2006; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

R. rickettsii pode ser encontrada em *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) em áreas endêmicas para FMB (GUEDES et al., 2005; KRAWCZAK et al., 2014), porém isto é um evento raro, já que a bactéria demonstra também efeito deletério para o carrapato e claramente necessita de um hospedeiro amplificador para continuar circulando na população de ixodídeos (SANGIONI et al., 2005; PACHECO et al., 2009; SOARES et al., 2012). Capivaras assim como os equinos são os hospedeiros preferenciais de *A. sculptum*, agindo como fonte alimentar para todos os estágios de vida do ixodídeo. Além disso, este roedor atua como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* nas populações de *A. sculptum* (SOUZA et al., 2009; QUEIROGAS et al., 2012; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Sendo assim, FMB transmitida por *A. sculptum* está intimamente ligada a áreas de Mata ciliar com a presença de capivaras e locais de pasto sujo contendo cavalos (*Equus caballus*), na sua maioria nos biomas de Cerrado e Pantanal (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

A. aureolatum está restrito a região neotropical; abrangendo em sua maioria a parte leste da América do Sul, do Uruguai até o Suriname, incluindo nordeste da Argentina, leste do Paraguai, Guiana Francesa e a maioria dos estados da região meridional e porção leste do Brasil (GUGLIELMONE et al., 2003). Na região metropolitana de SP este carrapato tem sido apontado como vetor de *R. rickettsii* (OGRZEWALSKA et al., 2012b). Para os demais estados brasileiros não se sabe se *A. aureolatum* está ou não envolvido na epidemiologia da FMB, já que nenhum estudo coletou um número consistente de carrapatos visando avaliar a presença de *R. rickettsii* nesta espécie de ixodídeo. Dado que Pinter e Labruna (2006) após terem coletado 669 exemplares de *A. aureolatum*, em uma área endêmica para FMB, no município de Taiaçupeba-SP detectaram a presença da *R. rickettsii* somente em seis espécimes amostrados, demonstrando uma taxa de infecção pela bactéria de 0,89% (6/669).

Na fase adulta *A. aureolatum* tem predileção parasitária por carnívoros e o cão doméstico é descrito como um excelente hospedeiro para esta fase de vida do ixodídeo

(ARAGÃO; FONSECA, 1961; GUGLIELMONE et al., 2003). Larvas e ninfas claramente têm preferência por pequenos mamíferos silvestres e aves passeriformes (GUGLIELMONE et al., 2003; OGRZEWALSKA et al., 2012b). Pinter et al. (2004) confirmam o supracitado, demonstrando em seu experimento que a fase adulta e imaturos de *A. aureolatum* possuem preferências parasitária por cães e aves, respectivamente. Apesar de Aragão e Fonseca (1961) indicarem que larvas de *A. aureolatum* se fixam facilmente em humanos, Labruna (2009) reforça que somente adultos desta espécie parasitam o homem.

Ogrzewalska et al. (2012b) salienta que áreas na região metropolitana de São Paulo-SP onde o *A. aureolatum* aparece como vetor de FMB, caracterizam-se por zonas periféricas em que o processo de antropização acaba degradando áreas de Mata Atlântica. Nestas mesmas circunstâncias o cão doméstico pode agir como um hospedeiro carreador dos carrapatos infectados com este bioagentes, *R. rickettsii*, da mata para dentro dos lares, já que diferentemente do *A. sculptum* o parasitismo humano por *A. aureolatum* é incomum.

Apesar de alguns estudos terem demonstrado a presença de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica em *A. aureolatum* (MEDEIROS et al., 2011; BARBIERI et al., 2014), a importância desta espécie de carrapato como vetor desta cepa possivelmente seja inexistente. Pois nestes mesmos estudos foi constatado que a infecção pela cepa Mata Atlântica em *A. aureolatum* só ocorreu quando a mesma população canina estava coinfestada com *A. ovale*, outro fator importante é que embora esta cepa de riquetsia seja detectada em populações de *A. ovale* em locais onde *A. aureolatum* inexistente, o contrario não ocorre (SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2012b; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014). Corroborando com esta idéia podemos citar áreas do estado de SP onde *A. ovale*, apontado como vetor de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, não ocorre em simpatria com *A. aureolatum*, devido as diferenças ambientes atribuídas a altitude e assim não detecta-se *Rickettsia* sp. Mata Atlântica em exemplares de *A. aureolatum* (OGRZEWALSKA et al., 2012b; BARBIERI et al., 2015).

Spolidorio et al. (2010), Silva et al.(2011) e Krawczak et al. (2016c) descrevem para o Brasil nos estados de São Paulo, Bahia e Santa Catarina, respectivamente, uma nova riquetsiose em humanos pertencente ao GFM. Esta doença é de caráter brando e sem letalidade registrada até o presente. Por conseguinte, além da sintomatologia clínica, em pacientes humanos, esta bactéria que vulgarmente vêm sendo chamada de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica também se assemelha

filogeneticamente com *R. parkeri*, descrita como patogênica em humanos desde 2004 nos Estados Unidos (PADDOCK et al., 2004; SPOLIDORIO et al., 2010).

Sabatini et al. (2010) e Medeiros et al. (2011) sugerem através de achados moleculares que *A. ovale* possa ser o vetor desta nova riquetsiose brasileira. O que é corroborado por Szabó et al. (2013) e Barbieri et al. (2014) que isolaram pela primeira vez esta bactéria de *A. ovale* em áreas endêmicas para esta riquetsiose, nos estados de SP e SC, respectivamente. Recentemente sob condições laboratoriais foi comprovada a capacidade e competência vetorial de todos os estágio de *A. ovale* para *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (KRAWCZAK et al., 2016a).

A. ovale é um ixodídeo que está amplamente distribuído pela América, presente em grande parte da região neotropical, abrangendo a região centro-norte da Argentina até o México (GUGLIELMONE et al., 2003). Os adultos deste carrapato possuem uma grande afinidade parasitária por carnívoros, o cão doméstico se mostrou um excelente hospedeiro para este carrapato. As fases imaturas também comumente são encontradas parasitando pequenos mamíferos silvestres (GUGLIELMONE et al., 2003; MARTINS; MOURA; LABRUNA, 2012; SZABÓ et al., 2013). Adultos de *A. ovale* frequentemente parasitam humanos (GUGLIELMONE et al., 2006).

A febre maculosa da Mata Atlântica, como estão sendo chamados os casos suspeitos de FMB causada por *Rickettsia* sp. Mata Atlântica estão intimamente ligados a áreas do bioma Mata Atlântica, com a presença de *A. ovale* e apresentam dois cenários distintos. O primeiro no estado de SP onde a presença do ixodídeo está correlacionada a baixas altitudes, $\leq 100\text{m}$ de Mata Atlântica, em que as pessoas ao frequentarem estas áreas estão expostas ao parasitismo pelo carrapato e subsequente infecção pela bactéria (SABATINI et al., 2010; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2015). No segundo caso nos estados da região sul do Brasil, mais precisamente em SC, onde a altitude não é um fator de risco para infestação pelo *A. ovale*, pois o mesmo está amplamente distribuído neste estado, o cenário caracteriza-se por cidades envoltas de fragmentos preservados de Mata Atlântica, onde o cão doméstico tem livre acesso as áreas de mata, agindo assim da mesma maneira em relação ao *A. aureolatum* nos casos de *R. rickettsii*, como transportador de carrapatos do ambiente silvestre para dentro dos lares (BARBIERI et al., 2014).

Rhipicephalus sanguineus conhecido popularmente como o carrapato marrom do cão é o ixodídeo com a mais ampla distribuição mundial, por este motivo muitos parasitologistas o denominam como carrapato pantropical canino (DANTAS-TORRES, 2010; GRAY et al., 2013).

Este artrópode apresenta hábito nidícola é monotrópico, consegue manter todo seu ciclo parasitário em uma única espécie animal, e endofílico (adaptado a ambientes internos, residências) estando assim próximo ao homem (LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES, 2010). Apesar de Winkel et al. (2014) demonstrarem no país o parasitismo de estágios imaturos de *R. sanguineus* em roedores sinantrópicos, no estado do RS, e esporadicamente este carrapato também ser encontrado em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) e gato doméstico, situação atribuída a locais com altas infestações de *R. sanguineus*, inquestionavelmente esta espécie tem o cão doméstico como seu principal hospedeiro e foi introduzido com este no Brasil no período da colonização (LABRUNA, 2004; SZABÓ et al., 2005).

Piranda et al. (2011) demonstraram que que cães podem agir como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* para o *R. sanguineus* e que ninfas e adultos após adquirirem a infecção em cães riquetsêmicos foram capazes de transmitir a bactéria para cobaias (*Cavia porcellus*).

R. sanguineus atua como vetor de FM (*R. rickettsii*) no México e Estados Unidos (DEMMA et al., 2005; EREMEEVA et al., 2011). Estudos levantam suspeitas epidemiológicas que *R. sanguineus* poderia atuar como vetor em área endêmica para FMB (MORAES-FILHO et al., 2009; OGRZEWALSKA et al., 2012b). Com isto, supõe-se que em ambientes com elevada densidade de *R. sanguineus* e cães a infecção por *R. rickettsii* possa ser inicialmente inserida no ambiente por espécies de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma*, e a transmissão para os humanos ocorreria então acidentalmente a partir da picada do *R. sanguineus* e/ou por esmagamento no instante da coleta destes ectoparasitas sobre os cães, sendo que proprietários ou profissionais que atuam com estes animais, como por exemplo, Médicos Veterinários, esteticistas de *pet shop* e funcionários de canis estariam mais expostos a este parasitismo e possível infecção por *R. rickettsii* (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Entretanto, no Brasil este ixodídeo mostra-se pouco antropofílico com limitados relatos de parasitismo em humanos (LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006), colocando em dúvida a real importância desta espécie de carrapato na epidemiologia da FMB. Neste mesmo contexto, podemos inserir a situação deste ixodídeo quando nos reportamos a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, já que alguns trabalhos demonstram a detecção molecular desta bactéria no *R. sanguineus*. Assim como o que acontece com *A. aureolatum* infectado com a cepa de riquetsia Mata Atlântica, somente observamos esta bactéria infectando *R. sanguineus* em áreas onde *A.*

ovale infectado com a cepa Mata Atlântica parasitando cães se faz presente (MEDEIROS et al., 2011; BARBIERI et al., 2014).

2.3 Situação da Febre Maculosa no Rio Grande do Sul

No período de 2005 até abril de 2016 o RS apresentou 12 casos confirmados de FMB, distribuídos em sete municípios, Canela, Cerro Largo, Lindolfo Collor, Porto Xavier, Rio Grande, Rosário do Sul e Toropi e mais 58 casos notificados em 32 das 497 cidades gaúchas. Dentre os casos notificados a confirmação não foi possível devido uma complexidade de fatores, dando destaque para: pacientes que não retornam para a segunda coleta de soro, erro de preenchimento de formulários, equívoco de anamnese clínica, falha no sistema de vigilância e problemas logísticos na realização do diagnóstico. Mesmo assim, das 27 unidades federativas do Brasil até abril de 2016 treze estados confirmaram casos de FMB e neste cenário o estado do RS ocupa a sétima colocação em relação ao número de casos confirmados de FMB, ANEXO (BRASIL, 2016a)

Existem vários estudos relatando a presença de carrapatos do gênero *Amblyomma* no estado do RS (EVANS et al., 2000; MARTINS et al., 2006; MARTINS, J.R et al., 2010; KRAWCZAK et al., 2015), este gênero de ixodídeo é incriminado no Brasil como o principal vetor da FMB, como exemplo podemos citar, *A. aureolatum*, *A. ovale* e *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) vetores de *R. rickettsii* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006; SPOLIDORIO et al., 2010; KRAWCZAK et al., 2014, 2016a).

Entre 2006 a 2007, vinte exemplares de carrapatos que se encontravam fixados (parasitando) ou caminhando sobre a pele de pessoas residentes na cidade de Cerro Largo- RS, foram encaminhados ao Laboratório Central do RS (LACEN), para identificação taxonômica, sendo todos identificados como *A. ovale* (SANGIONI et al., 2011). Estudos recentes demonstraram que exemplares de *A. ovale* coletados em áreas de Mata Atlântica nos estados de São Paulo e Santa Catarina estavam infectados com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica uma riquetsia semelhante à *Rickettsia parkeri*, esta bactéria é responsável por uma nova riquetsiose do

Grupo da Febre Maculosa no Brasil (SABATINI et al., 2010; SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014; KRAWCZAK et al., 2016a).

Assim como a *R. parkeri*, que teve sua patogenicidade descoberta para humanos nos Estados Unidos em 2004 (PADDOCK et al., 2004), a cepa Mata Atlântica causa uma riquetsiose mais branda e até o momento sem nenhum relato de óbito, cenário totalmente distinto do visualizado quando *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico de FMB.

Anterior a presente tese, o RS estava desprovido de informações epidemiológicas sobre as riquetsioses em seu território, quando nos reportamos a análises moleculares visando a detecção de riquetsias em populações de ixodídeos ou em relação a isolamento desta bactéria no RS, pois haviam apenas dois estudos sobre FMB conduzidos no estado, ambos baseados em métodos sorológicos. Sendo assim, não existia nenhum estudo de detecção molecular ou isolamento de riquetsias para o RS, seja oriundo de hospedeiros vertebrados ou reservatórios (vetores) invertebrados e a inexistência de estudos soropidemiológicos visando detectar anticorpos frente a antígenos de riquetsias do GFM em pequenos mamíferos silvestres também era uma realidade. As únicas perquisições existentes apontaram que cães, equinos e humanos entraram em contato com riquetsias do GFM no município de Cerro Largo-RS, área endêmica para FMB (SANGIONI et al., 2011) e também na região de Pelotas-RS, região localizada sobre o domínio do bioma Pampa (SAITO et al., 2008).

O RS é o único estado brasileiro que apresenta o bioma Pampa, vegetação que abrange todo o Uruguai e parte da Argentina. De todos os biomas do território brasileiro, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, o Pampa é o único que está disposto em um único estado. Este bioma ocupa uma área de 176.496 km² no RS (BRASIL, 2016b), isto corresponde a 63% do território estadual e a 2,07% do território brasileiro. Por ser um conjunto de ecossistemas muito antigos, o Pampa apresenta flora e fauna próprias e grande biodiversidade, ainda não completamente descrita pela ciência. A fauna é expressiva, com quase 500 espécies de aves e mais de 100 espécies de mamíferos (BRASIL, 2016b). O restante dos 37% do território estadual do RS é ocupado pelo bioma Mata Atlântica, o qual podemos destacar, pois em estudos recentes em Santa Catarina, Bahia e São Paulo uma nova cepa de riquetsia do GFM, denominada vulgarmente de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, tem afetado a população humana residente em áreas preservadas deste bioma (SABATINI et al., 2010; SPOLIDORIO et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; SILVA et al., 2011; BARBIERI et al., 2014; KRAWCZAK et al.,

2016c). Esta nova cepa foi primariamente reportada no estado de SP e Bahia (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011). Porém atualmente *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica já foi detectada em outros estados do Brasil e também em demais países da América Latina, como: em *A. aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil, em *A. ovale* em Belize, Brasil e Colômbia e em *Amblyomma dubitatum* na Argentina (SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014; LONDOÑO et al., 2014; MONJE et al., 2015; LOPES et al., 2016)

2.4 O uso de animais como sentinelas de FMB

No Brasil os cães tem sido apontados como excelentes sentinelas da situação epidemiológica da FMB em determinadas regiões endêmicas. Diante disto, diversos estudos soroepidemiológicos na população canina do Brasil têm sido feitos com intuito de estimar a prevalência de exposição da população canina à bactérias do gênero (SANGIONI et al., 2005; CARDOSO et al., 2006; HORTA et al., 2007; PINTER et al., 2008; BARBIERI et al., 2014; KRAWCZAK et al., 2016b). Ressaltando que o uso dos canídeos domésticos em estudos soroepidemiológicos de FMB é de extrema importância quando nos reportamos a áreas onde os vetores *A. aureolatum*, vetor de *R. rickettsii*, e *A. ovale*, vetor de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica estão presentes (OGRZEWALSKA et al., 2012b; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014), pois estas espécies de ixodídeos em sua fase adulta frequentemente parasitam cães (GUGLIELMONE et al., 2003; MARTINS; MOURA; LABRUNA, 2012; BARBIERI et al., 2014).

Os equídeos, com destaque ao *Equus caballus*, popular cavalo, são utilizados como sentinelas para FMB em áreas onde o ixodídeo *A. sculptum* é o vetor responsável na transmissão de FMB, pois estes ungulados são hospedeiros de todos os estágios parasitários deste carrapato além de possuírem uma vida longínqua, o que facilitaria a exposição dos mesmos em alguma fase de sua vida a carrapatos infectados, tornando possível o monitoramento sorológico de riquetsias (LABRUNA et al., 2002; SANGIONI et al., 2005)

A sorologia e coleta de carrapatos em pequenos mamíferos silvestres são métodos auxiliares na detecção de possível circulação de riquetsias em uma determinada área. Estudos

demonstram que fases imaturas de várias espécies de carrapatos, inclusive os carrapatos *A. ovale* e *A. aureolatum* incriminados como vetores de FMB, parasitam pequenos mamíferos silvestres no Brasil (GUGLIELMONE et al., 2003; SARAIVA et al., 2012; SZABÓ et al., 2013).

O presente estudo buscou analisar a infecção de riquetsias do GFM em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em duas áreas não endêmicas e uma endêmica no RS, visando estudar as diferenças entre os fragmentos dos biomas Pampa e Mata Atlântica que foram amostrados. O presente estudo foi a primeira investigação comparativa sobre FMB, entre áreas dos biomas Pampa e Mata Atlântica, e também a primeira investigação molecular e tentativa de isolamento de riquetsias do GFM em cultivo celular de amostras coletadas no RS.

Apesar de equídeos serem apontados como excelentes sentinelas para FMB em áreas de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) (SANGIONI et al., 2005) e Evans et al. (2000) terem reportado a presença de *A. cajennense* (*s.l.*) para o RS, Martins et al. (2016a) indubitavelmente mostraram que a distribuição mais meridional de *A. cajennense* (*s.l.*) se restringe ao norte do estado de Santa Catarina, naquele trabalho representado pelo município de Presidente Getúlio (27°3'S 49°37'O). Apesar de na proposta inicial, que pode ser evidenciada no Apêndice A, termos considerado a ideia de coleta de material oriundo de equídeos, pelos motivos acima descritos desconsideramos esta intenção.

2.5 Descrição do Pampa no RS: Parque Estadual do Espinilho

O bioma Pampa, vocábulo oriundo da família de línguas quéchua, que significa “planície” também é conhecido popularmente como, Campos do Sul, Campos Sulinos Campanha Gaúcha ou Savana Gaúcha está restrito no Brasil ao estado do Rio Grande do Sul, sendo este o único bioma brasileiro entre os seis existentes, de acordo com a classificação do Ministério do Meio Ambiente, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal que é encontrado apenas em uma das 27 unidades federativas do país. Este bioma também abrange parte da região oriental da Argentina e envolve todo o território do Uruguai.

O Pampa gaúcho ocupa uma área de 176.496 km², correspondendo a 63% do território estadual e a 2,07% do território brasileiro (BRASIL, 2016b). As paisagens encontradas na abundante biodiversidade da natureza do Pampa são variadas: de serras a planícies, de morros

rupestres a coxilhas, marcado pelo predomínio dos campos nativos, mas há também a presença de matas ciliares, matas de encosta, matas de pau-ferro, formações arbustivas, butiazais, banhados, afloramentos rochosos, etc. Este bioma exhibe uma extraordinária biodiversidade, tratando-se de um patrimônio natural, genético e cultural de importância nacional e global.

No Pampa fica a maior parte do aquífero Guaraní (BRASIL, 2016b). Entretanto, a progressiva introdução e expansão das monoculturas e das pastagens com espécies exóticas têm levado a uma rápida degradação e descaracterização das paisagens naturais. Estimativas de perda de habitat dão conta de que em 2002 restavam 41,32% e em 2008 restavam apenas 36,03% da vegetação nativa do bioma Pampa (BRASIL, 2016b).

O Pampa é formado por um conjunto de ecossistemas bastante antigo por tanto apresenta fauna e flora particulares e grande biodiversidade, ainda não completamente descrita pela ciência. A fauna dos Campos Sulinos é abundante, com quase 500 espécies de aves, dentre elas a ema (*Rhea americana*), o perdigão (*Rynchotus rufescens*), a perdiz (*Nothura maculosa*), o caminheiro-de-espora (*Anthus correndera*), o João-de-Barro (*Furnarius rufus*), o Sabiá-do-campo (*Mimus saturninus*), o pica-pau do campo (*Colaptes campestris*) e o quero-quero (*Vanellus chilensis*) ave símbolo do RS (ZANIRATO, 2010). Também ocorrem 50 espécies de peixes e mais de 100 espécies de mamíferos terrestres, incluindo o veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), o graxaim (*Lycalopex gymnocercus*), o zorrinho (*Conepatus chinga*), o furão (*Galictis cuja*), o tatu-mulita (*Dasypus hybridus*), o preá (*Cavia aperea*) e várias espécies de tuco-tucos (*Ctenomys sp.*). Neste bioma ainda encontramos espécies endêmicas, tais como: Tuco-tuco (*Ctenomys flamarioni*), o beija-flor-de-barba-azul (*Helimaster furcifer*); o sapinho-de-barriga-vermelha (*Melanophryniscus atroluteus*). Espécies ameaçadas de extinção também se fazem presentes no Pampa, como: o veado campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), o caboclinho-de-barriga-verde (*Sporophila hypoxantha*) e o picapauzinho-chorão (*Picoides mixtus*) (ZANIRATO, 2010; BRASIL, 2016b). Entretanto, de acordo com Costa et al. (2005) o Pampa constitui o bioma brasileiro com o terceiro maior número de espécies de mamíferos ameaçadas (13%).

Estimativas do Ministério do Meio Ambiente (2016b) indicam que há em torno de 3.000 espécies de plantas, com notável diversidade de gramíneas. Entre as várias espécies vegetais típicas do Pampa vale destacar o Algarrobo (*Prosopis algorobilla*) e o Nhandavaí (*Acacia*

farnesiana) arbusto cujos remanescentes podem ser encontrados apenas no Parque Estadual do Espinilho (PEE).

Rambo (1956) foi o primeiro autor no RS que observou a importância da vegetação encontrada no local hoje denominado como “Parque Estadual do Espinilho”. O mesmo autor citou uma vegetação denominada Savana Estépica Parque, encontrada na área, o qual a descreve como uma vegetação campestre que possui uma abundância de arbustos lenhosos, ou ainda espécies de porte arbóreo, as quais conferem a estepe um caráter de parque. Porém o local foi decretado como parque estadual somente em 1975 pelo Decreto Estadual nº 23.798, ocupando inicialmente uma área de 276 hectares. Esta área foi ampliada em 2002, pelo Decreto Estadual Nº 41.440 (28 de Fevereiro de 2002), para 1.617,14 hectares (SEMA-RS, 2010).

O PEE está localizado no município de Barra do Quaraí-RS, cidade mais ocidental da região Sul do Brasil que tem como fronteiras fluviais a Argentina e Uruguai. A elevação média da área é de 35m acima do nível do mar. Segundo o IBGE a população estimada para Barra do Quaraí em 2015 foi de 4.201 habitantes (IBGE, 2015b).

O clima da região do PEE é do tipo Cfa de Köppen, clima temperado húmido com Verão quente, com médias anuais de temperatura de 23,4 °C e precipitação de 1300 mm. Redin et al. (2011) em um estudo que visou avaliar apenas a composição florística de espécies arbóreas no parque, relatam a presença de seis espécies. Já em um estudo mais completo que visou analisar a flora do PEE como um todo, buscando também auxiliar no plano de manejo do parque, Galvani e Baptista (2003) registram a presença de 72 espécies de vegetação arbórea/arbustiva/lianas e epífitas; 124 espécies de herbáceas e para macrófitas aquáticas foram encontradas 58 espécies. Destacam-se como elementos mais expressivos da flora arbórea a associação de *Prosopis affinis*, *Prosopis nigra* e *Acacia caven* as quais caracterizam a vegetação da região. A ocorrência de *Aspidosperma*, *quebracho-blanco*, está restrita no estado do Rio Grande do Sul á área de estudo. A área do Parque Estadual do Espinilho representa o único ambiente de ocorrência de *P. affinis* e *P. nigra* no estado do Rio Grande do Sul e no Brasil. Simas et al. (2002) caracteriza o local fisionomicamente como composto por árvores pequenas, isoladas ou em pequenos grupos, cujas copas não se sobrepõem, sendo possível o crescimento de gramíneas, o que permite ao mesmo tempo o pastoreio e o sombreamento como proteção para o gado. Sendo que a utilização da área com esta atividade, pecuária, interfere muito na regeneração natural das espécies arbóreas do local (Figura 1).

Bianchin et al. (2011) citam a presença de dezessete espécies de mamíferos presentes no Parque Estadual do Espinilho (PEE), cervídeo (*Mazama* spp), Veado-campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), graxaim do mato (*Cerdocyon thous*), graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*), *Leopardus* sp, zorrinho (*Conepatus chinga*), furão-pequeno (*Galictis cuja*), lontra-neotropical (*Lontra longicaudis*), mão-pelada (*Procyon cancrivorus*), gambá da orelha branca (*Didelphis albiventris*), lebre-europeia (*Lepus europaeus*), capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), *Cavia* sp, ratão-do-banhado (*Myocastor coypus*), tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*), tatu-galinha-pequeno (*Dasypus septemcinctus*) e tatupeba (*Euphractus sexcinctus*). Sendo que quatro destas espécies são apontadas como ameaçadas de extinção, *Leopardus* sp, *Lontra longicaudis*, *Mazama* spp e *Ozotocerus bezoarticus*, estando classificadas como vulneráveis e ou ameaçadas de extinção no Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2002).

Figura 1 - Vegetação, fauna e ameaças causadas pela agricultura e pecuária em relação a preservação do Parque Estadual do Espinilho (PEE)

Legenda: A: Fitofisionomia do PEE e estação de Pitfall no meio da vegetação; B: Animais da fauna do PEE; C: Lavouras de arroz consorciadas com pecuária na divisa com o PEE; D: Bovinos pastando dentro do PEE (Foto extraída do Google Earth, Autor: Franco da Rosa).

Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

Até o presente, nenhum estudo havia sido realizado na área do PEE visando analisar a ixodofauna e a presença de circulação de riquetsias no parque. De acordo com dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016a) nenhum caso de FMB foi relatado para área em questão, entretanto o município de Rosário do Sul aproximadamente a 250 km de distância, localizado no mesmo bioma, Pampa, confirmou um caso de FMB no ano de 2011.

Saito et al. (2008) demonstraram através de análise sorológica (RIFI) que cães amostrados em 10 municípios do Pampa, localizados basicamente na região de Pelotas e Dom Pedrito com destaque para este último município que está a aproximadamente a 285 km do PEE e apresentou em média 87% de sorologia positiva para riquetsias nos cães amostrados, dentre estes cães também foram detectados soros apresentando sorologia homóloga para *R. parkeri*. Confirmando assim a necessidade de pesquisas mais consistentes em relação a detecção de riquetsias em carrapatos e animais silvestres para o Pampa, assim como realizado no presente estudo.

2.6 Mata Atlântica no RS: Parque Estadual do Turvo

Com uma heterogeneidade extraordinária em sua composição natural, a Mata Atlântica está estabelecida entre os paralelos 4° ao 32°S e cobre um amplo rol de zonas climáticas e formações vegetacionais, de tropicais a subtropicais, distribuída originalmente do Rio Grande do Norte ao Rio Grande do Sul, percorrendo todo o litoral brasileiro, razão pelo qual recebe este nome, também abrange a parte leste do Paraguai e o nordeste da Argentina na província de Misiones. A altitude alterna do nível do mar até 2.900m, com mudanças abruptas no tipo e profundidade dos solos e na temperatura média do ar (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2002). As variações longitudinais são também igualmente marcantes, as florestas quanto mais interioranas, mais sazonais tornam-se as mesmas, com índices de pluviosidade variando de 1000mm a 400mm como em algumas áreas da Serra do Mar por exemplo (OLIVEIRA-FILHO; FONTES, 2000).

Segundo a Fundação SOS Mata Atlântica e INPE (2002), o bioma Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano, que em sua origem estendia-se de forma contínua ao longo de toda costa brasileira. No passado, antes da ocupação europeia

sobrea a costa brasileira a Mata Atlântica cobria um total de 1.300.000 km²– com 92% desta área no Brasil, apesar de penetrar o leste do Paraguai e nordeste da Argentina em sua porção austral.

Originalmente a Mata Atlântica passava por 17 estados do território brasileiro, hoje os remanescentes de vegetação nativa estão reduzidos a cerca de 22% de sua cobertura original e encontram-se sobre os territórios dos estados do Espírito Santo, Rio de Janeiro e Santa Catarina, e parte do território do estado de Alagoas, Bahia, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, São Paulo e Sergipe. Entretanto se considerarmos fragmentos acima de 100 hectares, apenas cerca de 7% desta riqueza da biodiversidade nacional está bem conservada (MORELLATO; HADDAD, 2000; BRASIL, 2016c). Colombo e Joly (2010) afirmam que apenas cerca de 8% da cobertura original da Mata Atlântica foi preservada, sendo que os limitados fragmentos que restaram dessa desenfreada devastação apresentam diversos tamanhos, formas, estádios de sucessão e situação de conservação. Cerca de metade dos remanescentes florestais de grande extensão estão protegidos na forma de Unidades de Conservação, a maioria desses fragmentos se encontra hoje nas regiões serranas, principalmente na Serra do Mar, por serem impróprias para práticas agrícolas.

Em torno de 61% da população brasileira esta concentrada em regiões de domínio da Mata Atlântica, onde aproximadamente vivem 120 milhões de brasileiros e 70% do PIB é gerado. Esta ação antrópica resulta em grande pressão sobre a biodiversidade, prejudicando os recursos hídricos do bioma, fato evidente em diversas regiões que enfrentam crises hídrica, associadas à escassez, ao desperdício, à má utilização da água, ao desmatamento e à poluição.

É na Mata Atlântica que estão localizadas sete das nove grandes bacias hidrográficas do Brasil, alimentadas pelos rios São Francisco, Paraíba do Sul, Doce, Ribeira de Iguape e Paraná (BRASIL, 2016c; IB-FLORESTAS, 2016)

A Mata Atlântica é composta basicamente por dois tipos de vegetação principais: a floresta costeira ou Mata Atlântica e a floresta tropical ou floresta semi-decídua Atlântica. Servindo de abrigo para cerca de 229 espécies de mamíferos terrestres dentre as 904 espécies existentes na América do Sul, 73 destas ocorrem exclusivamente neste bioma (MORELLATO; HADDAD, 2000; PIRES COSTA et al., 2000).

Estimativas apontam que a Mata Atlântica abrigue cerca de 20.000 espécies vegetais, aproximadamente 35% das espécies existentes no Brasil, incluindo diversas espécies endêmicas e ameaçadas de extinção. Esta riqueza florística é maior que a de alguns continentes, 17.000

espécies na América do Norte e 12.500 na Europa. Da flora, 55% das espécies arbóreas e 40% das não-arbóreas são endêmicas da Mata Atlântica. Das bromélias, 70% são endêmicas dessa formação vegetal, palmeiras, 64%. Estima-se que 8 mil espécies vegetais sejam endêmicas da Mata Atlântica.

No quesito Fauna os levantamentos realizados apontam que a Mata Atlântica abriga 849 espécies de aves, 370 espécies de anfíbios, 200 espécies de répteis, 270 de mamíferos e cerca de 350 espécies de peixes. Sendo que 39% dos mamíferos dessa floresta são endêmicos, inclusive mais de 15% dos primatas, como o Mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*). Das aves 160 espécies, e dos anfíbios 183, são endêmicas deste bioma (IB-FLORESTAS, 2016). Atualmente mais de 530 plantas e animais que ocorrem no bioma estão oficialmente ameaçados, alguns a nível nacional e outros global (TABARELLI et al., 2005).

No território estadual do RS, 37% da área originalmente era ocupada pelo bioma Mata Atlântica, atualmente, restam somente 12,9 % de remanescentes naturais, em relação a cobertura vegetal original (BRASIL, 2016b; SEMA-RS, 2016). O estado do RS apresenta 41 unidades de conservação, distribuídas nas esferas: federal, estadual e municipal de administração e preservação, abrangendo ambos os biomas da unidade federativa em questão, Pampa e Mata Atlântica (SILVA et al., 2005), das quais o Parque Estadual do Turvo (PET) figura como o mais bem preservado e importante parque no âmbito do bioma Mata Atlântica do RS (LEMA, 1980)

O PET foi fundado em 11 de março de 1947, como Reserva Florestal, sendo uma das primeiras unidades de conservação instituídas no Rio Grande do Sul (Lei nº 2.440, de 02 de outubro de 1954), destacando-se por ser a maior área protegida de proteção integral do estado. Possui uma área de 17.492 ha, estando localizado na margem do rio Uruguai (SILVA et al., 2005; MELO et al., 2011b; KUHNEN; MARCOLAN; ROCHA, 2015). De acordo com a Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (SEMA) do RS e com o Plano de Manejo do Parque de 2005, a reserva abriga mais de 700 espécies de plantas, 47 espécies de peixes, 21 espécies de anfíbios, 18 de répteis, quase 290 espécies de aves e mais de 30 espécies de mamíferos de médio e grande porte, muitas espécies raras e até globalmente ameaçadas (SILVA et al., 2005).

O PET contém vegetação primária em grande parte da sua área (Figura 2), mas sofreu pressões antropogênicas antes e mesmo após a sua criação em 1947, sendo queimado em duas ocasiões em 1940 e 1970 (SILVA et al., 2005). As áreas que foram queimadas ou exploradas seletivamente tinham densa vegetação secundária.

KASPER et al. (2007) realizaram um estudo minucioso sobre a composição e abundância relativa dos mamíferos de médio e grande porte do PET e concluíram que 29 espécies são encontradas no local, como exemplo podemos citar, *Tamandua tetradactyla* (tamanduá-mirim), *Chironectes minimus* (cuíca da água), *Didelphis aurita* (gambá de orelha preta, Figura 2), *Puma yagouaroundi* (gato-mourisco), *Puma concolor* (onça parda), *Eira barbara* (irara), *Alouatta guariba* (bugio-ruivo), *Dasyus sepetecinctus* (tatu galinha pequeno), *Euphractus sexcinctus* (tatupeba); *Cuniculus paca* (paca) *Pecari tajacu* (cateto), *Mazama gouazoupira* (veado-catingueiro), *Hydrochoerus hydrochaeris* (capivara), *Cerdocyon thous* (graxaim do mato), *Tapirus terrestris* (anta), *Panthera onca* (onça-pintada), *Dasyprocta azarae* (cutia) e *Sylvilagus brasiliensis* (tapiti) as duas últimas espécies citadas apresentaram o maior número de registros no estudo. Ressaltando que o PET é o único local do RS a apresentar registros recentes de espécies como *P. onca*, *T. terrestris* e *Tayassu pecari* (queixada) (LEMA, 1980; ALBUQUERQUE, 1985), apontadas como criticamente em perigo conforme Livro Vermelho das Espécies da Fauna Ameaçada no Rio Grande do Sul (MARQUES et al., 2002). Porém Kasper et al. (2007) em um estudo mais recente do que os supracitados apontaram já a provável extinção de *T. pecari* no PET.

MELO et al. (2011b) demonstraram a presença de pelo menos 12 espécies de pequenos mamíferos no PET, sendo nove de roedores e três de marsupiais, com destaque para *Akodon montensis*, roedor popularmente chamado de rato do chão, que foi a espécie dominante no parque, sendo amostrado em quase 80% das capturas.

Figura 2 - Fitofisionomia, fauna e características de áreas lindeiras ao Parque Estadual do Turvo

Legenda: A: Agricultura em área limítrofe ao PET; B: Lagoas no interior do PET; C: *Didelphis aurita* no interior do PET; D: Salto do Yucumã, maior queda de água longitudinal do mundo, 1800m (Foto D, fonte: https://epocavital.files.wordpress.com/2015/01/1393547_626240984094177_1027829099_n.jpg).

Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

De acordo com a classificação de Köppen o clima na floresta estacional decidual do PET enquadra-se no tipo climático Cfa, denominado subtropical ou virginiano, onde as temperaturas médias no mês mais quente, janeiro, são superiores a 22 °C, e no mês mais frio, Julho, as temperaturas oscilam entre -3 e 18 °C (SILVA et al., 2005; MELO et al., 2011b).

O PET está situado no noroeste do estado do Rio Grande do Sul, entre as coordenadas 27°07' a 27°16'S e 53°48' a 54°04'O, no município de Derrubadas, junto ao rio Uruguai, lindeiramente com o estado de Santa Catarina e a província Argentina de Misiones (SILVA et al., 2005). A área de preservação ocupa aproximadamente 50% do município de Derrubadas, que conta com uma população estimada de 3.148 habitantes (IBGE, 2015c). Apesar de não existir nenhuma confirmação de casos de FMB no local, este encontra-se a 130 km de Cerro Largo, cidade com maior casuística da doença no RS. Estudos buscando analisar a ixodofauna e a

infecção destes carrapatos por riquetsias no PET se faziam necessários, não só pela análise da biodiversidade, mas também pensando no aspecto de saúde pública, já que no seu interior o parque possui como principal atrativo turístico o Salto do Yucumã, maior queda d'água longitudinal do mundo, com 1.800m de extensão e até 20 m de altura (Figura 2), atraindo assim uma grande quantidade de turistas nacionais e internacionais (KUHNEN; MARCOLAN; ROCHA, 2015).

Destacamos, que a partir do presente estudo foi possível a identificação de uma nova espécie de ixodídeo, sendo denominada de *Amblyomma yucumense*, homenageando assim o salto encontrado no interior do PET (KRAWCZAK et al., 2015).

2.7 Cerro Largo-RS, área endêmica para FMB

Em 2001 a FMB passou a ser uma doença de notificação obrigatória ao Ministério da Saúde. Atualmente de acordo com a Portaria SVS/MS Nº 1.271, de 06 de junho de 2014, todo caso de FMB e outras riquetsioses deve ser notificado em até 24 horas as autoridades sanitárias competentes. O RS entre 2005 e 2016, dados coletados até abril, confirmou 12 casos de FMB (BRASIL, 2016a), distribuídos em sete municípios: Canela, Cerro Largo, Lindolfo Collor, Porto Xavier, Rio Grande, Rosário do Sul e Toropi e mais 58 casos foram também notificados em 32 cidades gaúchas. Dentre estas Cerro Largo-RS além de ser pioneira na notificação de FMB no estado também é a cidade gaúcha que apresenta o maior número de casos da doença no RS, quatro casos confirmados.

Com a assinatura do decreto nº 2.519, de 15 de dezembro de 1954, Cerro Largo tornou-se um município gaúcho. A cidade está localizada na mesorregião Noroeste Riograndense a uma latitude 28°08'49" sul e longitude 54°44'17" oeste, a altitude é de 211m e o clima subtropical úmido, apesar da vegetação ser característica de Mata Atlântica o município está localizado na área de transição dos biomas do estado, Pampa e Mata Atlântica. Conforme dados do IBGE (2015d), a população cerro-larguense é de aproximadamente 13.976 habitantes.

Nos seus 177,674 km² o município de Cerro Largo não apresenta unidades de conservação (Parque, municipal, estadual ou federal), apesar da cidade ser pouco urbanizada a

presença de áreas de mata nativa são raras, pois o município depende fortemente do agronegócio (Figura 3).

Estudos científicos sobre a fauna e flora “específica” de Cerro Largo inexistem. Entretanto, o Programa de Monitoramento, Salvamento e Resgate da Fauna de Vertebrados Terrestres e Levantamento e Monitoramento da Entomofauna, relacionado ao monitoramento da fauna de vertebrados terrestres na área de influência da Usina Hidrelétrica (UHE) São José, que está situada nos municípios de: Cerro Largo (Figura 3), Rolador, Salvador das Missões e Mato Queimado, noroeste do Estado do Rio Grande do Sul; apontam através do relatório da quinta campanha no período pré-enchimento da UHE São José, que estão presentes na área 15 espécies de anfíbios anuros, aproximadamente 27 espécies de répteis, duas de anfisbenas, quatro de lagartos e 21 de serpentes, como; cobra coral (*Micrurus altirostris*), cruzeira (*Bothrops alternatus*), cobra cega (*Amphisbaena darwini*), teiú gigante (*Tupinambis merianae*), 108 espécies de aves como; marreca-de-coleira (*Callonetta leucophrys*), gaviãozinho (*Accipiter striatus*), carqueja-de-bico-amarelo (*Fulica leucoptera*), pernilongo (*Himantopus melanurus*), arapaçu-escamoso-do-sul (*Lepidocolaptes falcinellus*) e bico-virado-carijó (*Xenops rutilans*) e 24 espécies de mamíferos não-voadores como; gato-mourisco (*Puma yagouaroni*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), lebre-marrom-africana (*Lepus capensis*), cuíca (*Cryptomys guahybae*), gambá da orelha branca (*Didelphis albiventris*), rato do chão (*Akodon montensis*), camundongo do mato (*Oligoryzomys nigripes*), capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), graxaim do mato (*Cerdocyon thous*), graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*), tatu galinha (*Dasypus novemcinctus*) (CUNHA et al., 2009).

Com o surgimento de casos de FMB no município de Cerro Largo em 2005, Sangioni et al. (2011) coletaram soros de cães, humanos e equinos em 2007 na área e realizaram um estudo sorológico, detectando assim que: 51,6, 22,3 e 29,6% dos equinos, cães e humanos, respectivamente, apresentaram anticorpos reagentes para *Ricksettia rickettsii* e/ou para *Ricksettia parkeri*. Indicando assim que equinos, cães e humanos entraram em contato com riquetsias do GFM em Cerro Largo. Dentre os cães avaliados neste mesmo estudo, dois apresentaram títulos para *R. parkeri* no mínimo quatro vezes superior aos demais agentes riquetsiais testados, sugerindo que *R. parkeri* ou um genótipo próximo possa estar circulando na região.

Apesar do estudo de Sangioni et al. (2011) realizado em Cerro Largo, dados como coleta de carrapatos de animais domésticos, cães, sorologia de animais silvestres para riquetsias do

GFM, detecção molecular de riquetsias na ixodofauna da região e tentativa de isolamentos de riquetsias não haviam sido realizadas e eram de extrema importância para o município, visando elucidar o entendimento da epidemiologia da enfermidade na região. Portanto, no presente trabalho isto foi desenvolvido para o município de Cerro Largo-RS.

Figura 3 - Características da zona rural do município de Cerro Largo- RS

Legenda: A: Área alagada da UHE São José; B, C: Características dos locais onde foram coletados os cães; D: Característica da Mata Atlântica secundária onde foram colocadas as armadilhas.
Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

3 OBJETIVOS

Este estudo foi realizado em três áreas: duas não endêmicas, buscando analisar fragmentos dos diferentes biomas do RS frente à Febre Maculosa Brasileira e em uma área endêmica para enfermidade riquetsial, no município de Cerro Largo-RS, e terá os objetivos descritos abaixo.

3.1 Geral

Pesquisar a infecção de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em região endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul.

3.2 Específicos

- Detectar anticorpos anti-*Rickettsia* spp. através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em soros de cães e pequenos mamíferos silvestres oriundos das três áreas de coleta;
- Identificar as fases e espécies de carrapatos coletados nos cães, pequenos mamíferos e ambiente;
- Analisar a presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos pela técnica de hemolinfa e coloração de Gimenez;
- Buscar a detecção molecular de *Rickettsia* spp., por meio da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR), nos carrapatos coletados;
- Isolar em cultivo celular e caracterizar molecularmente cepas de *Rickettsia* circulantes no estado do Rio Grande do Sul;
- Contribuir com dados sobre a epidemiologia das riquetsioses no Rio Grande do Sul, comparando as diferentes áreas de coleta e fornecer estes dados para os serviços de vigilância e comunidade científica através de relatórios e artigos publicados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Nos itens a seguir serão descritos detalhadamente os materiais e métodos que foram empregados no presente estudo.

4.1 Áreas de Estudo

Foram selecionadas três áreas para serem estudadas (Figura 4Figura 4), todas por conveniência, classificadas da seguinte forma:

- (i) uma área preservada no bioma Mata Atlântica e nas propriedades rurais ao seu entorno (área considerada não endêmica);
- (ii) uma área preservada no bioma Pampa e nas propriedades rurais que estão ao entorno (área considerada não endêmica);
- (iii) propriedades rurais do município de Cerro Largo- RS (área considerada endêmica para FMB).

Esta divisão foi realizada por conveniência, visando identificar as diferenças que podem ocorrer em relação aos aspectos epidemiológicos da FMB, nos fragmentos avaliados dentro dos dois biomas do RS (Pampa e Mata Atlântica). Já a área endêmica foi escolhida como uma possível referência visando comparar os resultados, como: ixodofauna, riquetsias circulantes nos carrapatos e a taxa de infecção destas nos ixodídeos, frequência de anticorpos nos cães e pequenos mamíferos frente a riquetsias, entre áreas endêmicas e não endêmicas no Pampa e Mata Atlântica do RS, tudo isto na busca do melhor entendimento da epidemiologia da FMB no RS.

Para determinar o efetivo de cães que foram coletados por área utilizamos os valores para a razão habitante/cão em zona rural de 3,16:1, relatada por Soto et al. (2006) no município de Ibiúna, SP. Os locais escolhidos com suas devidas classificações estão indicados na Tabela 1.

Tabela 1 - Detalhamento das áreas que foram selecionadas para realização do estudo da Febre Maculosa Brasileira no Rio Grande do Sul

Município	Área	Amostras	Habitantes (IBGE, 2010)	Nº de cães previsto	Latitude; Longitude; Bioma
Derrubadas-RS (PET)	Preservada e Rural não endêmica	Cães/Peq.Mam	3.190	1009	27°15'54"S; 53°51' 39"O; Mata Atlântica
Barra do Quaraí- RS (PEE)	Preservada e Rural não endêmica	Cães/Peq.Mam	4.012	1270	30°12'25"S; 57°33'18"O; Pampa
Cerro Largo-RS	Rural endêmica	Cães/Peq.Mam	13.289	4205	28°08'49"S; 54°44'17"O; Mata Atlântica

NA: Não se Aplica, PET: Parque Estadual do Turvo; PEE: Parque Estadual do Espinilho. Fontes: IBGE, Censo 2010.

Figura 4 - Locais de coletas no Bioma Mata Atlântica, Pampa e Área endêmica para FMB no RS

Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

4.2 Períodos de coleta

Foram realizadas três campanhas de coletas entre junho de 2013 a janeiro de 2014, totalizando no período oito meses de análise, de acordo com a Tabela 2, visando a amostragem de soro e carrapatos de pequenos mamíferos e do ambiente. O tempo de coleta por área foi de 5 a 6 dias, sempre de 4 a 5 noites com as armadilhas abertas, buscando capturar o máximo possível de pequenos mamíferos, que foram avaliados frente à presença de carrapatos e uma alíquota de sangue foi coletada para sorologia visando a detecção de anticorpos reagentes a riquetsias pertencentes ao GFM.

Para coleta de soro oriundo dos cães foi realizado uma coleta pontual, na primeira campanha, com exceção de Cerro Largo (área endêmica) onde alguns cães foram venopuncionados na primeira e outros na terceira campanhas do estudo. Já a investigação de carrapatos nos canídeos foi realizada por conveniência, em alguns cães, em todas as etapas do estudo, de acordo com a Tabela 6 e item 4.5. Durante as campanhas do estudo entre as áreas coletadas foi destinado de 1 a 2 dias para: reposição de material, tabulação dos dados, recolhimento e limpeza das armadilhas do tipo gaiola, manutenção e fechamento das tampas das estações de *Pitfall* e organização das amostras coletadas, enviando as mesmas quando necessário para o laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Tabela 2 - Período das Coletas: Ordem das coletas por área, estação Climática do ano, duração e quais animais foram amostrados.

Período da Coleta	Ordem cronológica das coletas	Estação do Ano	Duração	Animais amostrados
30/06 a 19/07/2013	DE→CL→BQ	Inverno	20 dias	cães e peque. mamíferos
22/09 a 11/10/2013	BQ→CL→DE	Primavera	20 dias	cães e peque. mamíferos
08/01 a 25/01/2014	DE→CL→BQ	Verão	18 dias	cães e peque. mamíferos

DE: Derrubadas-RS; CL: Cerro Largo-RS; BQ: Barra do Quaraí-RS; peque: Pequenos.

4.3 Amostragem e coleta de sangue para sorologia dos cães

As coletas de soro de cães, visando detectar anticorpos anti-riquetsias do GFM através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), conforme descrito no item 4.6, foram feitas na primeira e terceira etapa de campo, de acordo com o item anterior 4.2. O número de animais que foram amostrados, cães, consta na Tabela 3 e foi calculado através de uma amostra simples randomizada para amostras finitas. Para o cálculo do tamanho da amostra de cães, por área, foi utilizada uma prevalência esperada de 10% de anticorpos anti-riquetsias do GFM em cães, com uma precisão de 95%, conforme demonstrado a seguir: para áreas não endêmicas e para área endêmica:

Cálculo usado para detecção de anticorpos anti-riquetsias do GFM nas áreas não endêmicas:

$$n = [1 - (1 - p_1)^{1/d}] [N - d/2] + 1$$

onde:

N = tamanho da população

d = Número mínimo de animais afetados esperados na população

n = tamanho requerido da amostra

p₁ = probabilidade de encontrar pelo menos um caso na amostra

Cálculo usado para determinar a prevalência de anticorpos anti-riquetsias do GFM na área endêmica:

$$n = 1.96^2 P_{exp} (1 - P_{exp}) / d^2$$

onde:

n = o tamanho da amostra requerido

P_{exp} = Prevalência esperada

d = precisão desejada absoluta

Por se tratar de uma população finita, o n_{adj} foi calculado como:

$$n_{adj} = N \times n / N + n$$

Onde,

n = tamanho da amostra

N = população.

Realizamos nossa coleta de cães baseada nas fórmulas estatísticas, entretanto apesar do grande esforço despendido para alcançar o número proposto pela análise matemática foi possível

capturar uma amostragem de cães superior ao proposto para o estudo, que visava detectar um nível de cães soropositivos para riquetsias do GFM $\geq 10\%$ (Tabela 3). Ressaltamos que previamente a realização da coleta de sangue foi realizado uma breve entrevista com o proprietário do cão. Para isto aplicamos um questionário (APÊNDICE B) que tinha como finalidade verificar se o animal teve acesso a áreas de mata nos últimos 12 meses, presença de carrapatos, idade e tratamento carrapaticida. Em caso de o animal estar preso, não podendo acessar áreas de mata nos últimos seis meses a coleta não foi realizada, outro ponto que suprimiu a coleta foi a idade dos cães, animais com idade inferior a três meses não foram amostrados.

De cada cão foi coletado por meio de venopunção da veia cefálica ou jugular cerca de 3,0ml de sangue, utilizando seringas de 5ml e agulhas hipodérmicas 25x7mm estéreis e descartáveis, o material foi depositado individualmente em tubos a vácuo sem anticoagulante.

Para esta coleta os animais foram contidos com o auxílio de focinheiras de tamanho adequado, de acordo com o animal, visando assim a segurança e bem-estar do coletor e animal. Cada cão recebeu um número e foi fotografado visando facilitar a identificação e controle individual de cada animal (Figura 5). Após a venopunção o sangue foi centrifugado a 10.000 rcf por 10 min, o soro obtido foi separado da papa de hemácias com o auxílio de micropipetas e as amostras obtidas foram armazenadas em micro tubos de 1,5ml devidamente identificados, contendo azida sódica, que foi utilizada como um conservante do soro, e mantidas à temperatura ambiente por cerca de sete dias até serem armazenadas à -4°C .

Tabela 3 - Número de cães amostrados por área de coleta no Rio Grande do Sul submetidos à RIFI frente a seis antígenos de riquetsias do GFM

Local	Característica da Área	Nº cães proposto	Nº cães coletados
Derrubadas-RS	Rural não endêmica	29	36
Barra do Quaraí-RS	Rural não endêmica	28	36
Cerro Largo-RS	Rural endêmica	135	137
Total	3	192	209

Figura 5 - Método de identificação, contenção e venopunção dos cães amostrados

Legenda: A, B, C: Método de Identificação dos cães; C: Cão amostrado na casa do primeiro caso confirmado de FMB no RS; D: Venopunção da veia cefálica.

Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

4.4 Captura de pequenos mamíferos e coleta de sangue

Para captura de pequenos mamíferos silvestres foram utilizadas 80 armadilhas do tipo gaiolas (75 *Shermman* e 5 *Tomahawk*) em cada área amostrada (Mata Atlântica, Pampa e Área endêmica), empregando diferentes atrativos como iscas (mortadela, linguiça defumada, bacon, maçã, banana, abóbora e paçoca de amendoim). As armadilhas foram dispostas da seguinte forma: 3, 3, 4 trilhas (trilhas: locais diferentes) distintas para Mata Atlântica, área endêmica e Pampa, respectivamente (Figura 6, Figura 7, Figura 8). Também utilizamos estações de armadilhas de interceptação e queda do tipo *Pitfall*, estas estações foram sempre montadas próximas as trilhas que continham as armadilhas tipo gaiola, isto foi realizado pensando em facilitar a logística de trabalho. Para Mata Atlântica e Pampa foram construídas 3 estações de *Pitfall*, praticamente uma para cada trilha, com exceção de Cerro Largo- RS, área endêmica, que foi

montado somente duas estações, devido a dificuldades logísticas, ficando uma trilha desprovida de estação de *Pitfall*, contendo nesta somente armadilhas do tipo gaiola.

Cada estação de *Pitfall* foi construída utilizando cinco baldes de 60 litros, medindo 42,5cm de diâmetro e 60 cm de altura, por estação, todos os baldes possuíam furos para evitar o acúmulo de água (Figura 9). O espaçamento mínimo entre cada balde foi de 3 metros e a área terminal em cada ponta das estações era de 4 metros, portanto cada estação abrangia no mínimo 20 metros. O material usado para interceptação primeiramente foi lona plástica, já na 2ª e 3ª campanhas de coletas este material foi substituído por uma tela, a mesma empregada em janelas como mosquitoireiro, resistente às intempéries climáticas (Figura 9).

As armadilhas foram vistoriadas diariamente, pelo período da manhã e os animais capturados foram postos em sacos de pano para serem devidamente anestesiados com aproximadamente 90 mg/kg de Cetamina + 5 mg/kg de Xilazina via intramuscular (IM), buscando a realização da coleta de material (carrapatos e soro). A anestesia foi também aplicada com o intuito de facilitar a identificação taxonômica dos pequenos mamíferos.

Os animais foram identificados com o auxílio de diferentes chaves de identificação e descrições originais, com o auxílio de biólogos especialistas (J.S e G.L.M) que já haviam trabalhado com pequenos mamíferos nas áreas coletadas (BONVICINO; OLIVEIRA; ANDREA, 2008; MELO et al., 2011b) Alguns exemplares entre os animais capturados, um casal por espécie, e outros em que cuja identificação da espécie não foi possível no campo foram eutanasiados, fixados e depositados na Coleção de Pequenos Mamíferos do Laboratório de Mamíferos da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo. Os demais animais após a recuperação do procedimento anestésico receberam brincos de identificação e logo foram soltos no mesmo local de captura.

Os pequenos mamíferos silvestres coletados e anestesiados, tiveram amostras de sangue obtidas por meio de punção intracardíaca ou pela veia caudal, com o uso de seringas de 1 ou 3ml e agulhas hipodérmicas de 13X0,45 ou 25x7 mm, estéreis e descartáveis; vias de coleta, volumes e espessura do material utilizado estava dependente da espécie e tamanho do animal capturado.

As amostras de sangue obtidas foram dispostas individualmente em tubos de 1,5ml, identificadas e logo foram centrifugadas a 10.000 rcf por 10 min, os soros foram recuperados com o auxílio de micropipetas e armazenados em micro tubos de 1,5ml, devidamente

identificados, contendo azida sódica, que foi empregada como um conservante do soro e assim mantidas à temperatura ambiente por cerca de sete dias até serem armazenadas à -4°C .

Salientamos que para os pequenos mamíferos, o número de animais que foram coletados, transcorreu de acordo com o esforço de captura utilizando as armadilhas tipo gaiola e de interceptação e queda. Destacamos que em um único episódio realizamos uma coleta fortuita que ocorreu no Parque Estadual do Espinilho, local representativo do bioma Pampa, onde coletamos um exemplar de *Cavia aperea* da boca de um canino que caçava dentro do parque.

O presente estudo teve as seguintes autorizações: aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, sobre o protocolo número 2908/2013 (APÊNDICE A), liberação pelo ICMBio (Instituto Chico Mendes de Biodiversidade) estando cadastrado no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO sobre o número: 38502-1 (APÊNDICE C), obtendo assim a autorização de coletas de animais silvestres e consequente liberação pela Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável do Rio Grande do Sul, SEMA-RS, devido a duas áreas estudadas pertencerem a esfera estadual de administração e proteção das Unidades de Conservação do RS a entrada nestes parques exigia esta última documentação (APÊNDICE D).

Figura 6 - Localização e pontos de coleta de pequenos mamíferos no Parque Estadual do Turvo, Mata Atlântica

Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

Figura 7 - Localização e pontos de coleta de pequenos mamíferos na área endêmica para FMB, Cerro Largo- RS

Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

Figura 8 - Localização e pontos de coleta de pequenos mamíferos no Parque Estadual do Espinilho, Pampa- RS

Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

Figura 9 - Armadilhas do tipo *Pitfall* e pequenos mamíferos coletados durante as três etapas de coletas, RS-2015

Legenda: A: estação usando lona plástica; B, C: estação empregando tela com exemplares de roedores capturados; D: detalhe do balde com o sistema de drenagem de água (furos) e animal capturado.

Fonte: (KRAWCZAK 2016)

4.5 Coletas de carrapatos

Todos os animais domésticos e silvestres amostrados foram vistoriados para presença de carrapatos (larvas, ninfas e adultos). Em cada área foi realizada também a técnica de arraste de flanela de acordo com Oliveira et al. (2000), objetivando capturar o máximo de exemplares de carrapatos sob vida livre, a busca ativa visual de ixodídeos nos locais amostrados também foi exercida assim como descrita por Terassini et al. (2010) (Figura 10).

A busca de ixodídeos nos pequenos mamíferos foi realizada através de inspeção visual para todos os animais capturados e em todo corpo do animal, usando quando necessário, pelagem molhada ou suja, uma pinça de dissecação de 14 cm para auxiliar na busca dos carrapatos e também na retirada do mesmo do corpo do animal. Nos cães também empregamos a busca visual

de carrapatos, sempre sendo realizada por dois observadores em todo corpo do animal (Figura 10) por um período de 3 a 5 minutos. Na 1ª etapa das coletas, a grande maioria dos cães que tiveram soro coletado também foram vistoriados para a presença de ixodídeos, esclarecemos que em uma pequena parcela isto não foi possível pela dificuldade de contenção do animal, já na 2ª e 3ª campanhas de coletas por conveniência observamos somente uma parcela destes mesmos animais, o número total de cães vistoriados para carrapatos nas três etapas de coleta foram os seguintes, Derrubadas (Mata Atlântica) 36, 18 e 15 cães, na 1ª, 2ª e 3ª coleta, respectivamente; Barra do Quaraí (Pampa) 33, 17 e 20 cães, na 1ª, 2ª e 3ª coleta, respectivamente; Cerro Largo (Área endêmica para FMB) 103, 32, 52 cães, na 1ª, 2ª e 3ª coleta, respectivamente, Tabela 6.

Apesar de não fazer parte do presente estudo, animais que foram encontrados atropelados nas rodovias percorridas durante as viagens para execução das coletas, mais de 15.000 km, principalmente ao entorno dos locais destinados ao estudo foram vistoriados para presença de carrapatos, porém somente um *Cerdocyon thous* apresentou carrapato. Ixodídeos que estivessem andando sobre o corpo e ou fixados na pele dos pesquisadores que estavam nas coletas de campo também foram amostrados no presente estudo.

Carrapatos coletados foram depositados em tubos de 1,5 ml contendo álcool absoluto para ninfas não ingurgitadas e larvas oriundas dos animais silvestres, Falcons de 15 ml contendo álcool absoluto foram utilizados no armazenamento de larvas e ninfas obtidas nos arrastes de flanela, tubos coletores universal de 80 ml foram empregados para armazenar todos os exemplares de carrapatos adultos e ninfas ingurgitadas adquiridos. Ressaltamos também que todos os coletores universais continham orifícios na tampa, realizados com o auxílio de agulhas hipodérmicas 25x7mm, facilitando a entrada de O₂ e umidade nos frascos, estimulando assim a sobrevivência dos ixodídeos. Todos os recipientes usados no presente estudo foram devidamente identificados. Logo, os carrapatos foram armazenados em caixas de isopor, contendo em seu fundo material hidrofílico (papel ou algodão) embebidos de água para manter a umidade relativa (UR) e temperatura (°C), isto foi realizado visando manter a sobrevivência dos carrapatos até o envio e chegada destes ao laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP.

Exemplares adultos que chegaram vivos ao laboratório, após a identificação taxonômica (item 4.7) foram testados pela técnica de hemolinfa (BURGDORFER, 1970), buscando então a detecção de estruturas semelhantes a riquetsias; rapidamente em seguida os carrapatos foram congelados em freezer à -80°C, para a posterior tentativa de isolamento de riquetsias (item 4.13).

As patas que foram seccionadas dos respectivos carrapatos para execução da hemolinfa foram armazenadas em tubos de 1,5 ml, devidamente identificados, e mantidos à -20°C, em seguida foram processadas pela qPCR, visando à detecção molecular de riquetsias assim como descrito nos Itens: 4.9 e 4.10. No caso de larvas e ninfas o protocolo foi um pouco diferenciado, somente as ninfas ingurgitadas, oriundas de hospedeiro, foram armazenadas como descrito anteriormente visando à sobrevivência dos carrapatos. Já as fases imaturas não alimentadas, assim como supracitado foram conservadas com o auxílio de etanol absoluto no campo até o envio ao laboratório onde foram identificadas (Item 4.7) e analisadas para a infecção de riquetsias, de acordo com os itens 4.9 e 4.10. Apesar de não fazer parte do presente estudo, coletamos pulgas de alguns cães do município de Derrubadas (Mata Atlântica), para realizarmos a qPCR de acordo com o item 4.10, na tentativa de analisar a possível infecção de *R. felis* nestes ectoparasitas de cães.

Figura 10 - Coleta de carrapatos nos cães, pequenos mamíferos e ambiente no RS

Legenda: A: Ninfa ingurgitada de carrapato em *Sooretamys angouya*; B: Carrapatos adultos e imaturos em membro anterior de *Didelphis albiventris*; C: Arraste de flanela; D: Carrapato na ponta de folha coletado pelo método de busca ativa visual; E, F: Carrapatos no olho e orelha de cães, respectivamente.

Fonte: (KRAWCZAK, 2016)

4.6 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Todas as amostras de soro dos cães, roedores e marsupiais amostrados foram testadas pela técnica da RIFI frente a 6 antígenos de *Rickettsia*, isolados no Brasil, tais como: *R. rickettsii* cepa Taiaçu, *R. parkeri* cepa At24, *Candidatus R. amblyommii* cepa Ac37, *R. rhipicephali* cepa HJ5, *R. felis* cepa Pedreira e *R. bellii* cepa Mogi como previamente descrito por Labruna et al. (2007a).

As lâminas utilizadas na técnica da RIFI foram preparadas com antígeno não purificado, de acordo com o descrito por Horta et al. (2004, 2007). Para isto os seis antígenos de riquetsias foram cultivados em garrafas descartáveis de cultivo celular, contendo monocamada de células Vero, a cada 4 dias através de um raspado da monocamada e coloração do mesmo a partir da técnica de Gimenez (1964) a taxa de infecção das células foi avaliada em microscópio óptico sob o aumento de 1.000X. Quando próxima a 100%, a monocamada infectada foi raspada, transferida para tubo do tipo Falcon e centrifugada a 4.000g, durante 10 minutos, o sobrenadante (meio de cultivo) foi descartado e o sedimento ressuspensionado em 6ml de 0,1 M de solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,4. Dez microlitros de células infectadas por riquetsias foram aplicados em cada um dos 12 poços das lâminas de imunofluorescência, previamente limpas com uma flanela embebida com álcool absoluto. Os antígenos sobre as lâminas foram mantidos dentro da cabine de biossegurança ligada por no mínimo duas horas, à temperatura ambiente, para devida secagem e em seguida as lâminas foram submergidas em acetona durante 10 minutos, buscando assim a fixação do antígeno. Após as lâminas foram identificadas com o nome do antígeno e data, e armazenadas à -20°C até serem usadas.

A reação propriamente dita foi seguida de acordo com o sugerido por (HORTA et al., 2004). Para isto os soros foram diluídos no incremento de duas vezes com PBS, a partir de uma diluição inicial de 1:64. Dez microlitros de soro diluído foram adicionados a cada poço das lâminas, contendo o respectivo antígeno de riquetsia. As lâminas foram incubadas à 37°C durante 30 minutos dentro de uma câmara úmida, após foram lavadas duas vezes por 10 minutos em PBS. Logo foi adicionado 10_{ul} dos seus respectivos conjugados, marcados com isotiocianato de fluoresceína: anti-mouse IgG produzido em cabra (Sigma, St Louis, MO, USA), na diluição com PBS de 1:400 que foi empregado para os soros de roedores, anti-gambá IgG produzido em ovelha (CCZ, São Paulo, Brazil), na diluição de 1:500 para os marsupiais e anti-dog IgG produzido em coelho (Sigma, St Louis, MO, USA), na diluição de 1:1000, para os cães. Então as lâminas foram

incubadas novamente sob as mesmas condições anteriores, logo foram lavadas conforme supracitado, porém desta vez com adição de 3ml de solução de Azul de Evans à 0,2%, as mesmas foram deixadas secar à temperatura ambiente por no mínimo 15 min. Posteriormente com a utilização de glicerina e lamínulas as lâminas foram montadas e lidas em sala escura, utilizando um microscópio de luz ultravioleta (BX60; Olympus, Tokyo, Japão) sob o aumento de 400x.

Destacamos que soros conhecidamente negativos e positivos para roedores, marsupiais e cães, procedentes de trabalhos prévios foram utilizados como controles das reações (HORTA et al., 2010; PIRANDA et al., 2011; KRAWCZAK et al., 2016a). Os soros reativos na diluição 1:64 para qualquer espécie de riquetsia foram testados em diluições seriadas, buscando a determinação do título final de reatividade frente ao antígeno riquetsial. O soro que demonstrou reação com título quatro vezes maior para uma determinada riquetsia, quando comparado com as demais espécies testadas foi portanto considerado homólogo para a primeira espécie de *Rickettsia*, conforme padrões previamente definidos (HORTA et al., 2004)

4.7 Identificação dos carrapatos

Os carrapatos adultos capturados foram identificados de acordo com a chave de Aragão e Fonseca (1961) e Barros-Battesti et al. (2006). Já para as ninfas a identificação foi através da chave de Martins et al. (2010b), com o auxílio de uma lupa estereoscópica (Stemi SV, ZEISS®).

As larvas foram identificadas utilizando técnicas de biologia molecular, onde amplificamos um fragmento de aproximadamente 460 pares de base (pb) do gene mitocondrial 16S rDNA (MANGOLD; BARGUES; MAS-COMA, 1998) isto foi empregado devido a ausência de chaves taxonômicas que facilitam a identificação através da morfologia externa das larvas. O produto da PCR foi sequenciado e comparado com as sequências disponíveis no *Genbank*, conforme previamente descrito (ALTSCHUL et al., 1990; OGRZEWSKA et al., 2009).

4.8 Teste de Hemolinfa

Os carrapatos, adultos, coletados foram armazenados em tubos que permitiram a entrada de oxigênio, transportados ao laboratório Doenças Parasitárias da FMVZ/USP e identificados, incubados em estufa por 36 horas a 34°C e umidade relativa >95%, com o objetivo de recuperá-los do estresse hídrico sofrido na captura e transporte, além de favorecer a multiplicação das riquétsias. Após 36 horas os carrapatos foram retirados da estufa, de cada exemplar seccionamos a porção distal de duas patas e uma a duas gotas de hemolinfa, sangue do artrópode, foi aplicada em lâmina de vidro, previamente limpas e desengorduradas com etanol absoluto, os fragmentos de patas restantes foram armazenados em microtubos de 1,5ml, devidamente identificados, e tiveram seu DNA extraído de acordo com o item 4.9, isto foi realizado com intuito de realizarmos a qPCR como descrito no item 4.10.

As lâminas contendo a hemolinfa dos respectivos ixodídeos foram coradas por corantes fucsina e verde malaquita, utilizando coloração de Gimenez (1964) e examinadas ao microscópio óptico com aumento de 1000X, sob óleo de imersão. O Teste de Hemolinfa é um teste de triagem que permite identificar carrapatos adultos que estejam infectados por organismos morfológicamente compatíveis com o gênero *Rickettsia* (BURGDORFER, 1970). Após este procedimento os carrapatos foram acondicionados individualmente em microtubos de 1,5ml, devidamente identificados e congelados em freezer a -80°C, aguardando o processamento pela técnica de PCR ou isolamento de *Rickettsia* em cultivo celular (Itens 4.10 e 4.13).

4.9 Extração de DNA dos carrapatos

A extração de DNA dos carrapatos foi realizada aplicando duas técnicas distintas, pelo método de isotiocianato de guanidina e pelo protocolo de fervura (SANGIONI et al., 2005; HORTA et al., 2007). Larvas, ninfas e patas de carrapatos (as mesmas que foram seccionadas para hemolinfa) tiveram seu DNA extraído pelo método de fervura, como descrito por Horta et al (2007) com breves modificações. Para isto larvas, ninfas e patas foram colocadas individualmente ou em *pools*, em tubos de 1,5ml estéreis e livres de DNase e 10ul de tampão TE (TE= 10 mM Tris-HCl; 1 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético, pH 8.0) foi acrescentado,

com o auxílio de um pistilo, ponteira de 1ml com a ponta queimada, estas fases imaturas foram maceradas, logo foi acrescido mais 10ul para larvas e patas ou 20ul para ninfas de TE nos microtubos. Após a etapa de maceração, estes macerados foram levados a um termobloco previamente aquecido à 100°C, onde permaneceram por 15 minutos, então foram retirados do termobloco e uma centrifugação a 12.000g por 15 segundos foi aplicada nos tubos, em seguida as amostras retornaram ao termobloco e o processo de fervura foi repetido sobre as mesmas condições anteriores (100°C por mais 15 minutos), em seguida as amostras foram centrifugadas a 12.000g por 30 segundos e estocadas a -20°C até o momento do seu processamento pela PCR. O corpo dos adultos destes ixodídeos tiveram seu material genético extraído pelo protocolo que utiliza fenol e isotiocianato de guanidina, conforme previamente descrito por Sangioni et al. (2005)

4.10 Detecção molecular de riquetsias nos carrapatos, utilizando a ferramenta da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (Real time PCR ou qPCR)

Todas as amostras de DNA extraídas de carrapatos, neste trabalho, foram testadas para detecção de *Rickettsia*, através de PCR individual, pelo protocolo de real-time PCR descrito por Labruna et al. (2004c) utilizando o aparelho 7.500 Real Time PCR System (Applied Biosystems®). No protocolo da q PCR utilizamos um par de primers (CS5 e CS6) que amplifica um fragmento de 147 nucleotídeos do gene codificador da citrato sintase de *Rickettsia* spp., associado a uma sonda interna fluorogênica (5' 6-FAM – BHQ-1 3') de 23 nucleotídeos (LABRUNA et al., 2004c; GUEDES et al., 2005). Este protocolo da PCR mostrou-se sensível o suficiente para detecção de uma única cópia do gene da citrato sintase de *R. rickettsii* (LABRUNA et al., 2004c).

As amostras de DNA que foram positivas ao protocolo da real-time PCR, foram testadas por duas PCR's convencionais: primeiramente utilizamos um par de oligonucleotídeos Rr190.70F e Rr190.701R, quando está primeira reação foi negativa empregamos um oligonucleotídeo reverso (Rr190.602R) distinto. Ambas reações amplificam fragmentos de aproximadamente 632pb e 532pb, respectivamente, do gene da proteína de membrana externa de 190 kDa (*ompA*) de riquetsias pertencentes ao grupo da febre maculosa, isto foi utilizado para a confirmar que o

DNA riquetsial detectado na qPCR pertencia a riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) (REGNERY; SPRUIL; PLIKAYTIS, 1991; ROUX; FOURNIER; RAOULT, 1996).

Todas as amostras de carrapatos que testaram negativas na qPCR foram avaliadas por uma PCR convencional, que visa amplificar um fragmento de aproximadamente 460pb do gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos (MANGOLD; BARGUES; MAS-COMA, 1998). Esta PCR foi utilizada com a finalidade de confirmar a presença de DNA viável nas extrações feitas a partir de carrapatos (“controle endógeno”), confirmando assim a real negatividade destas amostras frente a *Rickettsia* spp.

4.11 Análise dos produtos amplificados

Os produtos amplificados das reações de PCR para os genes: *ompA*, *16S rRNA* e *gltA* foram visualizados com aparelho de eletroforese, em gel de agarose à 1,5% (100 ml TBE 0,5%; 1,5g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™) corados com Sybr safe Invitrogen® seguindo recomendações do fabricante, em cuba horizontal e tampão TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA pH 8,0) submetida à voltagem de 1 a 10 V/cm durante 60 minutos. A revelação do resultado, leitura do gel, foi feita usando um transiluminador ultravioleta com recursos fotográficos.

4.12 Purificação e sequenciamento de nucleotídeos

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation), que consiste em Exonuclease I (*Exo I*) para digerir excesso de primers e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos oriundos da PCR. Para tal, em um microtubo devidamente identificado colocou-se 3 µL de ExoSAP e adicionou-se 7,5 µL dos amplicons originados na PCR, em seguida as amostras foram colocadas no termociclador, sob as seguintes condições: 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos, conforme protocolo descrito pelo fabricante

Após a purificação os amplicons foram submetidos a reação de sequenciamento com o kit comercial BigDye™ Terminator (Perkin Elmer) de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/PerkinElmer, Modelo ABI Prism 310 Genetic, CA, US) como recomendado pelo fabricante.

4.13 Isolamento e detecção de *Rickettsia*

Carrapatos que chegaram vivos ao laboratório e foram positivos ao teste de hemolinfa e ou qPCR como descrito nos itens 4.8 e 4.10, foram submetidos a tentativa de isolamento de riquetsia em cultura de células Vero, pela técnica de “*shell vial*”, conforme descrito por Espejo-Arenas e Raoult (1989) e Marrero e Raoult (1989) utilizado por Labruna et al. (2004c). Ressaltamos que, o resultado da técnica de qPCR foi escolhido como determinante na escolha dos carrapatos que foram submetidos ao *shell vial*, devido a sua maior sensibilidade e especificidade, com exceção para: um exemplar de *A. brasiliense* e *A. yucumense*, dois espécimes de *A. incisum*, *A. ovale*, *H. juxtakochi* e *I. loricatus* que foram negativos na qPCR e tiveram resultado positivo ou inconclusivo na hemolinfa e mesmo assim foram submetidos a tentativa de isolamento.

Após a retirada do freezer -80°C cada carrapato foi triturado em 1ml de meio BHI (*Brain Heart Infusion*) estéril, com pinças e tesouras estéreis, inoculado em duplicata sobre monocamada de células Vero presentes no fundo raso de dois tubos “*shell vial*”, isto para cada amostra, os quais foram centrifugados a 700 g sob 22°C durante uma hora. Após esta etapa a monocamada de células Vero foi lavada com 1ml de meio “*Minimum Essential Medium*” (MEM) contendo 5% de soro fetal bovino (SFB) e para cada tubo acrescentamos 1ml deste mesmo meio com antibióticos (penicilina G Sódio 10.000 ug/ml, estreptomicina sulfato 25 ug/ml, GIBCO™ Invitrogen™), logo os tubos foram incubados em Estufa B.O.D (*Biological Oxygen Demand*) a temperatura de 28°C. Após três dias (72 horas) o meio contendo antibiótico foi retirado e posto em um tubo de 1,5 ml, uma reposição com 1ml de MEM enriquecido com 5% de SFB foi acrescentado nos tubos de *shell vial*. O meio líquido retirado contendo antibiótico foi centrifugado a 12.000g por 5 min à temperatura ambiente, o sedimento foi recuperado e fixado em lâmina de vidro. Cada lâmina foi corada pelo método de Gimenez (1964) para visualização de estruturas semelhantes à riquetsias no interior das células, conforme Labruna et al. (2004c).

Os tubos de *shell vial* foram analisados quanto a infecção por riquetsias a cada 72 horas. Quando estruturas compatíveis com riquetsias foram evidenciadas em pelo menos 80% das células observadas no microscópio óptico sob o aumento de 1000x, o tubo teve sua monocamada raspada com o auxílio da ponta de uma pipeta de 2ml e então está solução de MEM com células infectadas por estruturas visualmente compatíveis com riquetsias foram repassadas (inoculadas) em uma garrafa de cultivo celular de 25cm³, contendo monocamada de células Vero, visando estabelecer o isolado em laboratório. As amostras que foram negativas na primeira avaliação, tiveram seu meio trocado e também foram reavaliadas como supracitado a cada três dias, por um período mínimo de 30 dias ou até a monocamada estar naturalmente destruída.

4.14 Manutenção em laboratório dos isolados de riquetsias

Assim que as células do *shell vial* se mostraram infectantes estas foram inoculadas em garrafas de 25cm³ estéreis, específicas de cultivo celular, contendo uma monocamada de células Vero, sendo monitoradas até demonstrarem um mínimo de 90% de células infectadas por *Rickettsia*. Isto foi observado através da raspagem das células da monocamada com o uso de raspador (COSTAR[®] Corning Incorporation), fixação do raspado em lâmina de vidro, logo foi aplicado a coloração de Gimenez (1964) e a leitura foi realizada em microscópio óptico com aumento de 1000X sob óleo de imersão. Para obtermos a estimativa da taxa de células infectadas, escolhemos 3 campos de visão no microscópio contendo pelo menos 10 células, após a contagem de células total e de células infectadas calculamos a taxa de infecção estimada por uma regra de três simples. Quando a infecção por riquetsias apresentou uma taxa $\geq 90\%$ a monocamada foi raspada com auxílio de raspador como anteriormente descrito e transferida para garrafas de 75cm², contendo monocamada de células Vero, estas também foram monitoradas até demonstrarem um nível de infecção próximo a 100%. Após isto, quatro passagens dos isolados foram realizadas em garrafas de 75cm², com monocamada de células Vero. Em todas as passagens, as garrafas foram raspadas, sendo uma pequena parte da suspensão de células inoculadas em uma nova monocamada não infectada e o restante da suspensão de células foi centrifugada a 4.500g à temperatura de 4°C, por 10 minutos e o sedimento de células ressuspendido em tampão SPG (sucrose-fosfato³² glutamato, pH 7.0) estéril, logo foram postas

em criotubos identificados com: data, passagem e nome do isolado onde foram depositadas na Coleção de Riquetsias da FMVZ/USP sob a temperatura de -80°C, caracterizando-se como amostras de referência para o isolado obtido (LABRUNA et al., 2004b, 2004c)

4.15 Identificação genotípica dos isolados de *Rickettsia* e das PCR's positivas dos carrapatos

Uma alíquota de células Vero infectadas da terceira passagem dos isolados obtidos no presente estudo foram submetidas à extração de DNA pelo kit DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Chatsworth, CA, USA), seguindo o protocolo descrito pelo fabricante. Por conseguinte, o DNA extraído foi submetido à caracterização molecular através da técnica de PCR e sequenciamento gênico (de acordo com o item 4.12) de dois fragmentos amplificados do gene codificador da citrato sintase riquetsial (*gltA*). Para a obtenção do primeiro fragmento, utilizamos os oligonucleotídeos iniciadores CS-78 e CS-323, e para o segundo fragmento os iniciadores CS-239 e CS-1069, que amplificam dois fragmentos sobrepostos de 401pb e 834pb respectivamente do gene *gltA* (LABRUNA et al., 2004c).

Os carrapatos que foram positivos na qPCR (item 4.10) também foram submetidos a outras três PCR's. Primeiramente buscamos amplificar um fragmento de aproximadamente 632pb ou 532pb (duas reações distintas) do gene da proteína de membrana externa de 190 kDa (*ompA*) de riquetsias pertencentes ao GFM, assim como descrito no item 4.10, em caso destas duas PCR não terem apresentado amplicons a amostra foi submetida a uma segunda PCR que busca amplificar um fragmento de aproximadamente 401pb do gene *gltA* do gênero riquetsia, assim como supracitado. Seguindo o item 4.12 os amplicons foram purificados e submetidos a reação de sequenciamento.

Visando caracterizar as espécies de *Rickettsia* isoladas e presente nos carrapatos coletados, os produtos de PCR obtidos foram sequenciados em sequenciador automático de DNA, conforme previamente descrito (GUEDES et al., 2005). As sequências obtidas foram editadas com o auxílio do *software* Geneious® versão 9.1.4 (BIOMATTERS DEVELOPMENT TEAM, 2016) e comparadas por análise de *Blast* no *Genbank* (ALTSCHUL et al., 1990).

Ressaltamos que na ocasião em que mais de dois exemplares por espécie de carrapato foram positivos nas PCR's convencionais, sequenciamos então no mínimo três exemplares. Logo, as sequências obtidas foram alinhadas e comparadas, utilizando o *software* MEGA 6.0.6 (TAMURA et al., 2013), quando 100% idênticas somente uma sequência foi depositada no *Genbank*. Tratando-se de sequências da PCR que amplificou um fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos (item 4.10) oriundas de larvas, que foram editadas e analisadas como supracitado, no caso de sequências idênticas para ixodídeos coletado na mesma área (área endêmica, Mata Atlântica ou Pampa), novamente somente uma sequência foi depositada.

4.16 Frequência de carrapatos infectados

Após a obtenção dos resultados da hemolinfa, técnica da PCR, sequenciamento gênico e dos dados moleculares dos isolados obtidos dos carrapatos em células Vero, pela técnica de *shell vial*, foi determinada a frequência de carrapatos infectados em cada área amostrada.

4.17 Preenchimento do questionário

Concomitante à coleta dos carrapatos e do sangue dos cães, foi aplicado um questionário aos proprietários, buscando o levantamento de dados sobre o animal (idade, sexo, tratamento acaricida, presença de carrapatos) e hábitos que incluam contato com áreas de mata ou animais silvestres (APÊNDICE B)

4.18 Análise estatística

Foram realizadas análises estatísticas comparativas entre a sorologia dos cães e roedores e também em relação a taxa de infestação de carrapatos nos pequenos mamíferos e cães, visando comparar os resultados entre as áreas amostradas no presente estudo. Para isto, as análises foram feitas usando a linguagem R a partir do teste de comparação de proporções para múltiplos grupos

(R TEAM, 2015). Foi testada a hipótese nula de que as proporções ou a probabilidade de ser positivo nos diferentes grupos fosse a mesma.

4.19 Construção dos Mapas

Para adquirir os pontos que foram plotados no mapa, utilizamos um GPS (Garmin Etrex H Trilhas). Após a aquisição das coordenadas geográficas utilizamos o software QGIS 2.4.0, Chugiak na construção dos mapas (QGIS DEVELOPMENT TEAM 2016, 2016).

5 RESULTADOS

Os resultados serão apresentados em forma de tópicos, com intuito de facilitar o entendimento de todos os dados obtidos no estudo. Adiantamos que os resultados do teste de hemolinfa e dados obtidos a partir do questionário (APÊNDICE B) aplicado na entrevista com os proprietários dos cães não serão expostos. Pois evidenciamos que a PCR se mostrou mais sensível e específica que o teste de hemolinfa, motivo pelo qual resolvemos desconsiderar os resultados obtidos com o uso desta última ferramenta. Em consequência a inconsistência dos dados obtidos em relação ao questionário, devido a respostas dúbias e contraditórias informadas pelos proprietários dos cães, decidimos descartar estas informações. Os únicos dados que foram considerados do questionário tiveram como resultado a exclusão dos cães que não tinham acesso a áreas de mata, nos últimos seis meses, e animais com idade inferior a três meses, sendo que estas informações foram cuidadosamente analisadas pelo entrevistador, destacamos também que o questionário foi aplicado sempre pelo mesmo pesquisador (F.S.K).

5.1 Pequenos Mamíferos coletados no bioma Mata Atlântica: presença de carrapatos e sorologia para riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM)

Foram capturados durante as três coletas, compreendidas entre Junho de 2013 a Janeiro de 2014, 164 pequenos mamíferos na área não endêmica para FMB no bioma Mata Atlântica, pertencentes a nove espécies diferentes, *Akodon montensis*, *Bucepattersonius iheringi*, *Cryptonanus guahybae*, *Didelphis aurita*, *Euryoryzomys russatus*, *Oligoryzomys nigripes*, *Oxymycterus judex*, *Sooretamys angouya*, *Thaptomys nigrita*, 33,5% (55/164) foram soropositivos para pelo menos uma riquetsia do GFM, onde três espécimes de *A. montensis*, dois *D. aurita* e um *O. judex* apresentaram sorologia homóloga para uma possível exposição à *R. bellii*, *R. parkeri* e *R. rickettsii*, respectivamente (Tabela 4). Dentre estes animais, 14,6% (24/164) apresentaram algum grau de ixodidose, das nove espécies de pequenos mamíferos coletadas com exceção de *T. nigrita* todas apresentaram ixodídeos, quatro espécies de carrapatos estavam parasitando estes animais: *A. brasiliense*, *A. ovale*, *A. yucumense* e *I. loricatus* (Tabela 9).

Tabela 4 - Pequenos mamíferos coletados no município de Derrubadas-RS (Mata Atlântica), área não endêmica para Febre Maculosa, entre junho de 2013 a janeiro de 2014 e sorologia para riquetsias do GFM

Espécie (n° testado)	N° de animais que foram soropositivos para cada espécie de <i>Rickettsia</i> (% de soropositivos por espécie)						N° animais com PAHRIFI
	<i>R.parkeri</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R.felis</i>	<i>R. bellii</i>	
<i>Akodon montensis</i> (117)	34 (29)	34 (29)	31 (26,5)	24 (20,5)	0	16 (13,7)	3 (<i>R. bellii</i>)
<i>Bucepattersonius iheringi</i> (13)	6 (46)	7 (53,8)	6 (46)	7 (53,8)	0	1 (7,7)	-
<i>Cryptonanus guahybae</i> (1)	0	0	0	0	0	0	-
<i>Didelphis aurita</i> (7)	2 (28,6)	0	0	0	0	0	2 (<i>R. parkeri</i>)
<i>Euryoryzomys russatus</i> (1)	0	0	0	0	0	0	-
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (9)	0	0	0	0	0	0	-
<i>Oxymycterus judex</i> (7)	6 (85,8)	6 (85,8)	6 (85,8)	5 (71,4)	0	1 (14,3)	1 (<i>R. rickettsii</i>)
<i>Sooretamys angouya</i> (4)	0	0	0	0	0	0	-
<i>Thaptomys nigrita</i> (5)	0	0	0	0	0	0	-
Total de soropositivos /Total de animais capturados (% de positivos): 55/164 (33,5%)							

PAHRIFI: Provável Antígeno Homólogo na Reação de Imunofluorescência Indireta; N°: número

5.2 Pequenos mamíferos coletados no bioma Pampa: presença de carrapatos e sorologia para riquetsias do GFM

Foram coletados 34 pequenos mamíferos de quatro espécies diferentes (*Akodon azarae*, *Cavia aperea*, *Cryptonanus chacoensis*, *Oligoryzomys nigripes*) na área não endêmica para FMB no bioma Pampa, durante as três coletas, realizadas entre junho de 2013 a janeiro de 2014. Onde nenhum destes animais apresentou infestação por carrapatos. Na RIFI somente um único representante de *Cavia aperea*, capturado de forma fortuita foi soropositivo para riquetsias do GFM. Representando 2,9% (1/34) de positividade, o soro deste cavideo reagiu somente para *R. rickettsii* e *R. rhipicephali*, com títulos de 128 e 64, respectivamente.

5.3 Pequenos mamíferos coletados em Cerro Largo-RS, área endêmica para FMB: presença de carrapatos e sorologia para riquetsias do GFM

Foram capturados 40 pequenos mamíferos de quatro espécies distintas (*Akodon montensis*, *Didelphis albiventris*, *Oligoryzomys nigripes* e *Sooretamys angouya*) no município de

Cerro Largo- RS, área considerada endêmica para FMB, durante as três etapas de coletas compreendidas entre junho de 2013 a janeiro de 2014.

A sorologia para riquetsias do GFM demonstrou que 40% (16/40) dos pequenos mamíferos amostrados foram expostos a uma ou mais riquetsias, onde dois espécimes de *D. albiventris* apresentaram sorologia homóloga para uma possível exposição à *R. parkeri* ou agente próximo a mesma (*Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica) (Tabela 5). Em relação ao grau de ixodidose, verificamos que 27,5% (11/40) destes animais apresentaram algum grau de infestação por carrapatos. No momento da coleta as únicas espécies de ixodídeos que foram evidenciadas nos pequenos mamíferos foram: *A. ovale* e *I. loricatus* e somente *A. montensis* e *D. albiventris* apresentavam ixodídeos (Tabela 10).

Tabela 5 - Pequenos mamíferos coletados no município de Cerro Largo-RS (área endêmica para Febre Maculosa) entre junho de 2013 a janeiro de 2014 e sorologia para riquetsias do GFM

Espécie (n° Testado)	N° de animais que foram soropositivos para cada espécie de <i>Rickettsia</i> (% de soropositivos por espécie)						N° animais com PAHRIFI
	<i>R.parkeri</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R.felis</i>	<i>R. bellii</i>	
<i>Akodon montensis</i> (29)	12 (41,4)	13 (44,8)	8 (27,6)	9 (31)	0	5 (17,2)	-
<i>Didelphis albiventris</i> (4)	3 (75)	2 (50)	1 (25)	1 (25)	0	1 (25)	2 (<i>R. parkeri</i>)
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (6)	0	0	0	0	0	0	-
<i>Sooretamys angouya</i> (1)	0	0	0	0	0	0	-
Total de soropositivos /Total de animais capturados (% de positivos): 16/40 (40%)							

PAHRIFI: Provável Antígeno Homólogo na Reação de Imunofluorescência Indireta

5.4 Cães coletados no bioma Mata Atlântica: carrapatos e sorologia para riquetsias

A venopunção de 36 cães ao redor do Parque Estadual do Turvo, localizado no Município de Derrubadas-RS foi realizada, esta área é considerada não endêmica para FMB. Três cães apresentaram anticorpos detectados através da RIFI para ao menos um antígeno dos seis testados, a frequência de animais soropositivos foi de 8,3% (3/36) na amostra. Dois cães apresentaram sorologia homóloga, um para *R. bellii* e outro frente a *R. rhipicephali*, de acordo com a Tabela 6. Demonstrando-nos assim, que alguma riquetsia circulou ou está circulando em um nível $\geq 10\%$ nesta população de cães.

No total de 69 exames que realizamos nos cães, buscando verificar o grau de ixodidose, observamos que 17,4 % (12/69) apresentaram algum grau de infestação por carrapatos, onde duas

espécies de ixodídeos foram evidenciadas: *A. aureolatum* e *A. ovale*. A infestação média de carrapatos por exame foi de: 1 e 3,1 para *A. aureolatum* e *A. ovale*, respectivamente, de acordo com a Tabela 7.

5.5 Cães coletados no bioma Pampa: carrapatos e sorologia para riquetsias

Foi realizada a venopunção de 36 cães ao redor do Parque Estadual do Espinilho localizado no Município de Barra do Quaraí- RS, área não endêmica para FMB. Sendo que a frequência de cães soropositivos na amostra foi de 13,9% (5/36). Os anticorpos foram detectados a partir da RIFI para ao menos um antígeno dos seis testados, quatro cães apresentaram reação homóloga para *R. parkeri*, assim como demonstrado na Tabela 6. Evidenciando assim, que alguma riquetsia circulou ou está circulando em um nível $\geq 10\%$ nesta população de cães.

Em relação ao grau de ixodidose, verificamos que 30% (21/70) dos exames que foram realizados apresentaram algum grau de infestação por carrapatos. No momento dos exames, três espécies de ixodídeos foram evidenciadas parasitando os cães: *A. aureolatum*, *A. tigrinum* e *R. sanguineus*. A infestação média de carrapatos por exame foi de: 3; 7,4 e 2,7 para *A. aureolatum*, *A. tigrinum* e *R. sanguineus*, respectivamente, de acordo com a Tabela 7.

5.6 Cães coletados em Cerro Largo- RS, área endêmica para FMB: carrapatos e sorologia para riquetsias

Coletamos soro de 137 cães em área rural no município de Cerro Largo-RS, área considerada endêmica para FMB no RS. Sendo que 28 cães apresentaram reação positiva, demonstrando anticorpos através da RIFI para ao menos um antígeno dos seis testados, com uma frequência de 20,4% (28/137) de animais soropositivos na amostra testada. Com grande importância epidemiológica constatamos que 16 cães apresentaram títulos de anticorpos compatíveis com sorologia homóloga para uma possível exposição à *R. parkeri* ou agente próximo à mesma (*Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica), assim como exposto na Tabela 6.

Demonstrando-nos assim que alguma riquetsia circulou ou está circulando nesta população de cães.

A partir de 187 exames que realizamos, buscando verificar o grau de ixodidose nos cães, observamos que 5,3% (10/187) dos exames foram positivos para ixodidose, onde somente uma espécie de ixodídeo foi evidenciada parasitando os animais, sendo esta: *A. ovale*. A infestação média de carrapatos por exame foi de 2,3, de acordo com a Tabela 7.

5.7 Carrapatos coletados no bioma Mata Atlântica, área não endêmica para FMB

Através da captura de carrapatos em pequenos mamíferos, cães, busca ativa visual e também com o uso da técnica de arraste de flanela foi possível durante as três coletas a detecção de oito espécies de ixodídeos no Parque Estadual do Turvo e propriedades rurais ao seu entorno, destacando que a partir do presente estudo uma delas foi descrita como espécie nova para o mundo (KRAWCZAK et al., 2015) (Apêndice E). As espécies encontradas foram as seguintes: *A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. incisum*, *A. ovale*, *A. yucumense* (espécie nova, descrita nesta pesquisa KRAWCZAK et al., 2015) *H. juxtakochi*, *Ixodes loricatus* e *Rhipicephalus microplus*, esta última espécie foi capturada de um bovino que estava próximo do alojamento no Parque Estadual do Turvo, coleta em bovinos não faziam parte do estudo, porém colocamos esta espécie para demonstrarmos que carrapatos de importância na produção animal como *R. microplus*, também estão presentes na proximidade de áreas extremamente preservadas, (Tabelas 7, 8 e 9).

Tabela 6 - Sorologia para riquetsias de cães, coletados em junho de 2013 e janeiro de 2014 nos municípios de: Derrubadas (Mata Atlântica), Cerro Largo (Área endêmica) e Barra do Quaraí- RS (Pampa)

Nº cães	Nº de cães que foram soropositivos para cada espécie de <i>Rickettsia</i> (variação do título)						nº animais com PAHRIFI
	<i>R.parkeri</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R.felis</i>	<i>R. bellii</i>	
36/DE				2 (64-256)		1 (256)	1 <i>R. rhipicephali</i> 1 <i>R. bellii</i>
36/BQ	5 (512-8192)	5 (128-8192)	4 (64-8192)	4 (256-1024)	4 (128-4096)	2 (64-128)	4 <i>R. parkeri</i>
137/CL	27 (64-8192)	21 (64-4096)	14 (64-2048)	19 (64-1024)	12 (128-512)	6 (64-128)	16 <i>R. parkeri</i>
Total de cães soropositivos /Total de cães (% de positivos) por área: 3/36 (8,3) DE, 5/36 (13,9) BQ, 28/137 (20,4) CL							

PAHRIFI: Provável Antígeno Homólogo na Reação de Imunofluorescência Indireta; DE: Derrubadas; BQ: Barra do Quaraí; CL: Cerro Largo.

Tabela 7 - Carrapatos coletados de cães na Mata Atlântica, Cerro Largo (Área endêmica) e Pampa, entre junho de 2013 a janeiro de 2014

Espécie de carrapato coletada	Local	Nº cães infestados/ Nº cães vistoriados (% de infestação)			Infestação média de carrapatos por exame positivo (mínima-máxima)
		1º Coleta	2º Coleta	3º Coleta	
<i>A. aureolatum</i>	DE	1/36 (2,8)			1 (1-1)
<i>A. ovale</i>			5/18(27,8)	6/15 (40)	3,1 (1-6)
		Total de exames: 12/69 (17,4)			
<i>A. ovale</i>	CL	1/103 (1)	6/32(18,8)	2/52 (3,8)	2,3 (1-8)
		Total de exames: 10/187 (5,3)			
<i>A. aureolatum</i>	BQ	2/33 (6)	3/17(17,6)	3/20(15)	3 (1-7)
<i>A. tigrinum</i>		2/33 (6)	4/17 (23,5)	4/20 (20)	7,5 (3-12)
<i>R. sanguineus</i>		4/33 (12)	4/17 (23,5)	2/20 (10)	2,7 (1-8)
		Total de exames: 21/70 (30)			

Nº: número; DE: Derrubadas (Mata Atlântica); CL: Cerro Largo (Área endêmica); BQ: Barra do Quaraí (Pampa);

5.8 Carrapatos coletadas no bioma Pampa, área não endêmica para FMB

Através da captura de carrapatos em *Cerdocyon thous* encontrado atropelado em frente à entrada do Parque Estadual do Espinilho, cães doméstico, busca ativa visual e também com o uso da técnica de arraste de flanela foi possível durante as três coletas a detecção de quatro espécies de carrapatos no Parque Estadual do Espinilho e propriedades rurais ao seu entorno, sendo estas

as seguintes espécies: *A. aureolatum*, *A. ovale* (coletado de *C. thous*), *A. tigrinum* e *R. sanguineus* (Tabelas 7 e 8).

5.9 Carrapatos coletados no município de Cerro Largo-RS, área endêmica para FMB

Através da coleta de carrapatos em pequenos mamíferos, cães, busca ativa visual e também com o uso da técnica de arraste de flanela foi possível durante as três coletas a detecção de cinco espécies de ixodídeos em propriedades rurais do município de Cerro Largo-RS, sendo estas: *A. dubitatum*, *A. longirostre*, *A. ovale*, *I. loricatus*, *R. microplus*, esta última espécie foi coletada de um equino, apesar de não fazer parte do estudo coleta de carrapatos em equinos, incluímos esta espécie para relatar a distribuição de *R. microplus* na área trabalhada, ressaltando que *R. microplus* foi a única espécie encontrada em equinos da área considerada endêmica para FMB no RS, descartando desta forma a importância de um inquérito sorológico nestes animais como forma de monitoramento de FMB no RS (Tabelas 7, 8 e 10).

Tabela 8 - Carrapatos coletados do ambiente entre junho de 2013 a Janeiro de 2014 no Parque Estadual do Turvo (Mata Atlântica), Cerro Largo (Área endêmica) e no Parque Estadual do Espinilho (Pampa)

Local	Número de Espécimes de Carrapatos Coletados em Vida Livre									
Espécie de carrapato	1º Coleta			2º Coleta			3º Coleta			Total L/N/A
	Larva	Ninfa	Adulto	Larva	Ninfa	Adulto	Larva	Ninfa	Adulto	
Derrubadas (MA)										
<i>Amblyomma brasiliense</i>	20*	19			36	8		6	8	20*/61/16
<i>Amblyomma incisum</i>		12			11	2		39	32	0/62/34
<i>Amblyomma ovale</i>						3				0/0/3
<i>Amblyomma yucumense</i>		5			3			0	23	0/8/23
<i>Amblyomma sp.</i>	80 ¹			3						83/0/0
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>		2			4	1		1	1	0/7/2
Barra do Quaraí (PA)										
<i>Amblyomma aureolatum</i>					1	2				0/1/2
<i>Amblyomma tigrinum</i>		1				1				0/1/1
Cerro Largo (AE)										
<i>Amblyomma dubitatum</i>					1			1		0/2/0
<i>Amblyomma longirostre</i>	1	1		2						3/1/0
<i>Amblyomma ovale</i>		1			1	6				0/2/6
<i>Amblyomma sp.</i>	100			5						105/0/0
Total:	201	41		10	57	23		47	64	136/145/87

MA= Mata Atlântica; PA= Pampa; AE; Área Endêmica; L= Larvas; N= ninfas; A= adultos; * = bolo de larvas contendo aproximadamente 20 larvas; ¹= 4 bolos de larvas contendo aproximadamente 20 larvas por bolo.

Tabela 9 - Identificação dos carrapatos coletados dos pequenos mamíferos capturados na Mata Atlântica entre junho de 2013 a janeiro de 2014

Pequenos mamíferos capturados (NºI/Nº)	Nº de espécimes de carrapatos coletados de acordo com espécie e estágio de desenvolvimento							
	<i>Amblyomma. brasiliense</i>	<i>Amblyomma. ovale</i>	<i>Amblyomma. yuctumense</i>	<i>Ixodes loricatus</i>	<i>Amblyomma sp.</i>			
	Ninfas	Ninfas	Larvas	Ninfas	Larvas	Ninfas	Adultos	Larvas
Rocedores								
<i>Akodon montensis</i> (7/117)				1	3	2 ²		1
<i>Brucepattersonius iheringi</i> (1/13)								1
<i>Euryoryzomys russatus</i> (1/1)				1				
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (1/9)					1			
<i>Oxymycterus judex</i> (4/7)			22	11				86
<i>Thaptomys nigrita</i> (0/5)								
<i>Sooretamys angouya</i> (2/4)		1		2				
Marsupiais								
<i>Didelphis aurita</i> (7/7)	8		56*	53 ¹			25	1
<i>Cryptomys guahybae</i> (1/1)								1
Total de animais infestados por carrapatos/ Total de animais capturados (% de infestação): 24/164 (14,6)								

Nº= número capturado; NºI = número de animais infestados por carrapatos; *= 33 larvas estavam ingurgitadas e fizeram ecdise para ninfas e outras 23 após a PCR foram sequenciadas, por isto a identificação foi possível; ¹= 4 exemplares que foram coletados ingurgitados fizeram ecdise para adultos, ²= 1 exemplar ingurgitado mudou para adulto.

Tabela 10 - Identificação dos carrapatos coletados dos pequenos mamíferos na área endêmica para FMB no RS entre junho de 2013 a janeiro de 2014

Pequenos mamíferos capturados (n°infestados/ n° coletados)	N° de carrapatos coletados de acordo com o estágio de desenvolvimento/ N° de animais infestados por cada espécie de carrapato (n°AI)				
	<i>Amblyomma ovale</i>		<i>Ixodes loricatus</i>		<i>Amblyomma sp</i>
	Ninfas/n°AI	Larvas/n° AI	Adultos/n°AI	Larvas/ n° AI	Larvas/n°AI
Roedores					
<i>Akodon montensis</i> (7/29)	1/1	4/4		14/5	
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (0/6)					
<i>Sooretamys angouya</i> (0/1)					
Marsupiais					
<i>Didelphis albiventris</i> (4/4)	1/1		13/4		30/1
Total de animais infestados por carrapatos/ Total de animais capturados (% de infestação): 11/40 (27,5%)					

N°= número; n°AI= número de animais infestados por carrapatos

5.10 Detecção molecular de riquetsias nos carrapatos coletados entre junho de 2013 a janeiro de 2014, na Mata Atlântica, área endêmica para FMB e Pampa

Todas as espécies e suas devidas fases, larvas, ninfas e adultos, de carrapatos encontradas durante a presente perquisição, tiveram no mínimo 70% de seus exemplares processados pela qPCR (item 4.10), buscando a presença de DNA de riquetsias, com exceção para exemplares únicos amostrados por área e espécimes de *A. yucumense*, que foram então depositados na Coleção Nacional de Carrapatos da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Sendo que em todas as áreas encontramos no mínimo duas espécies de carrapatos com a presença de DNA de riquetsias. Em Derrubadas tivemos as seguintes espécies de ixodídeos positivos na PCR para riquetsias: *A. brasiliense* infectado com *Candidatus R. amblyommii*, *A. ovale* (não foi possível a identificação da espécie de riquetsia, devido a impossibilidade de sequenciamento desta amostra positiva) , *A. yucumense* e *H. juxtakochi* infectados com *R. rhipicephali* e *I. loricatus* com a presença de DNA de *R. bellii*, de acordo com a Tabela 11.

Para os ixodídeos obtidos no Parque Estadual do Espinilho, as seguintes espécies de carrapatos apresentaram DNA riquetsial: *A. aureolatum* e *A. tigrinum* ambos contendo DNA de *Candidatus R. amblyommii* (Tabela 11).

Cerro Largo, área endêmica no RS para FMB, também demonstrou carrapatos com a presença de DNA de riquetsias, sendo este o único município onde detectamos ixodídeos infectados com riquetsias patogênicas para o homem (Tabela 11) e as espécies que apresentaram DNA de riquetsias foram as seguintes: *Amblyomma ovale* infectado com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e larvas de *Amblyomma longirostre* contendo DNA de *Candidatus R. amblyommii*, de acordo com a Tabela 11.

Também detectamos molecularmente pela primeira vez no Brasil *Candidatus Rickettsia asemboensis* em pulgas coletadas de cães no município de Derrubadas, a partir de PCR e sequenciamento do produto amplificado, como descrito nos itens 4.10, 4.12 e 4.15.

5.11 Comparação entre as as taxas de infestação por carrapatos e sorologias para riquetsias do GFM dos pequenos mamíferos e dos cães para as três áreas coletadas

Como evidenciado nos dados apresentados nas Tabelas 4 e 5 e no item 5.2, conseguimos verificar que ocorreu uma diferença nos percentuais de positividade na sorologia realizada pela RIFI para os seis antígenos de riquetsias (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. felis* e *R. bellii*), usados no estudo visando a busca de anticorpos nos soros dos pequenos mamíferos capturados nas diferentes áreas do estudo, sendo que os pequenos mamíferos capturados em Derrubadas (Mata Atlântica), Barra do Quaraí (Pampa) e Cerro Largo-RS (Área endêmica para FMB), apresentaram 33,5%, 2,9% e 40%, respectivamente, de animais soropositivos para pelo menos um dos antígenos testados.

Existiu diferença estatisticamente significativa na positividade da sorologia entre os pequenos mamíferos das áreas amostradas ($p < 0.001$). Sendo que o número de animais positivos no Pampa foi significativamente menor em relação a Mata Atlântica ($p < 0.001$) e a área endêmica ($p < 0.001$). Entretanto, embora a quantidade de pequenos mamíferos positivos ter sido maior na área endêmica, esta diferença não se mostrou estatisticamente significativa entre os pequenos mamíferos coletados na Mata Atlântica ($p = 0.51$).

A sorologia dos cães apresentada na Tabela 6, nos mostra que ocorreu uma diferença nos percentuais de soropositivos para pelo menos um dos seis antígenos de riquetsias (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. felis* e *R. bellii*) utilizados na RIFI com intuito de

detectar anticorpos no soro dos cães puncionados na presente perquisição em relação as áreas amostradas.

Semelhantemente como descrito para os pequenos mamíferos, o município de Cerro Largo- RS, área endêmica para FMB no estado, também foi o local com a maior frequência de cães soropositivos, para pelo menos um dos seis antígenos testados. Entretanto, apesar da proporção de cães positivos ter se mostrado maior nos cães de Cerro Largo, não existiu diferença estatisticamente significativa em relação a positividade na sorologia entre os cães das áreas estudadas ($P = 0.1496$).

Partindo dos dados demonstrados nas Tabelas 9 e 10 e no item 5.2 foi possível verificar um grau superior de ixodidose nos pequenos mamíferos coletados na área endêmica (Cerro Largo) em relação as demais áreas. Apesar disso, embora a quantidade de pequenos mamíferos parasitados ter sido maior na área endêmica não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grau de ixodidose encontrado nos pequenos mamíferos da Mata Atlântica ($p=0.08$). Porém analisando juntamente as três áreas estudadas, diferença estatisticamente significativa em relação ao grau de infestação por carrapatos entre os pequenos mamíferos das áreas amostradas foi evidenciada ($p < 0.005$). Onde ficou evidentes que o grau de ixodidose nos pequenos mamíferos no Pampa foi significativamente menor em relação a Mata Atlântica ($p < 0.05$) e área endêmica ($p < 0.005$).

Na Tabela 7 é possível constatar que os exames buscando analisar o grau de parasitismo por carrapatos nos cães vistoriados no Pampa foi superior em relação a Mata Atlântica e área endêmica. No entanto, apesar de diferenças estatisticamente significativa terem sido evidenciadas em relação ao parasitismo por carrapatos entre os cães das áreas amostradas ($p < 0.001$), onde a ixodidose entre cães da área endêmica foi significativamente menor em relação ao Pampa ($p < 0.001$) e Mata Atlântica ($p < 0.001$), não foi observado diferenças entre o parasitismo por carrapatos de cães oriundos do Pampa em relação a Mata Atlântica ($p=0.1218$).

Tabela 11 - Detecção molecular de riquetsias pela qPCR, nos carrapatos coletados entre junho de 2013 a janeiro de 2014 na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica no RS

Espécie de carrapato	Nº de carrapatos coletados	Nº de carrapatos testados	Nº de positivos na qPCR <i>gltA</i> (%)	Nº de positivos na PCR <i>OmpA</i> (%)	Espécie de <i>Rickettsia</i> (nº de sequências geradas)
Derrubadas-RS (Mata Atlântica)					
<i>Amblyomma aureolatum</i>					
Adulto	1	0	0	0	
<i>Amblyomma brasiliense</i>					
Larva	bolo	bolo	1 (NA)	1 (NA)	<i>OmpA R. amblyommii</i> (1)
Ninfa	69	48	5 (10,4)	0	<i>gltA R. amblyommii</i> (1)
Adulto	16	15	3 (20)	0	NS
<i>Amblyomma incisum</i>					
Ninfa	62	44	0	0	
Adulto	34	33	0	0	
<i>Amblyomma ovale</i>					
Ninfa	1	1	0	0	
Adulto	37	34	4 (11,8)	0	NS
<i>Amblyomma yucumense</i>					
Larvas	78	6 [#]	4 (NA)	3 (NA)	
Ninfa	76	16	3 (18,7)	0	<i>gltA R. rhipicephali</i> (4)
Adulto	23	4	1 (25)	1 (25)	<i>OmpA R. rhipicephali</i> (6)
<i>Amblyomma</i> sp.	183	10 [#]	0	0	
<i>Ixodes loricatus</i>					
Larvas	4	4	0	0	
Ninfa	2	2	0	0	
Adulto	25	22	4 (18,2)	0	<i>gltA R. bellii</i> (2)
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>					
Ninfa	7	5	3 (60)	2 (40)	<i>gltA R. rhipicephali</i> (2)
Adulto	2	2	0	0	<i>OmpA R. rhipicephali</i> (1)
<i>R. microplus</i>					
Adultos	6	5	0	0	
Barra do Quaraí-RS (Pampa)					
<i>Amblyomma aureolatum</i>					
Ninfa	1	1	0	0	
Adulto	25	20	1 (5)	1 (5)	<i>gltA R. andeanae</i> (1) <i>OmpA R. andeanae</i> (1)
<i>Amblyomma ovale</i>					
Adulto	1	1	0	0	
<i>Amblyomma tigrinum</i>					
Ninfa	1	0	0	0	
Adulto	77	61	50 (82)	44 (72,1)	<i>gltA R. andeanae</i> (3) <i>OmpA R. andeanae</i> (18)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>					
Adulto	27	19	0	0	
Cerro Largo-RS (Área endêmica)					
<i>Amblyomma dubitatum</i>					
Ninfa	2	1	0	0	
<i>Amblyomma longirostre</i>					
Larva	3	3	2 (66,7)	2 (66,7)	<i>OmpA R. amblyommii</i> (2)
<i>Amblyomma ovale</i>					
Larva	4	4	0	0	
Ninfa	4	3	0	0	
Adulto	29	26	4 (15,4)	4 (15,4)	<i>gltA Rickettsia</i> sp Mata Atlântica (1) <i>OmpA Rickettsia</i> sp Mata Atlântica (4)
<i>Amblyomma</i> sp	135 [*]	125	0	0	
<i>Ixodes loricatus</i>					
Adulto	13	13	1 (7,7)	0	<i>gltA R. bellii</i> (1)
Larva	14	12	0	0	

nº= número; NA= não se aplica, pois neste caso foi realizada a PCR de pool de larvas, NS= não sequenciado, * = amostra constituída de 5 bolos de larvas contendo aproximadamente 20 espécimes por bolo, 30 exemplares coletados de *D. albiventris* (20 foram submetidos a PCR) e mais 5 exemplares do ambiente, bolo= pool de larvas coletado do ambiente, contendo aproximadamente 20 exemplares; #= equivalente a 10 PCR's.

5.13 Carrapatos coletados sobre o corpo ou parasitando os pesquisadores durante as etapas das coletas na: Mata Atlântica, Pampa e Área endêmica para FMB no RS

No Parque Estadual do Turvo (Mata Atlântica) dentre as oito espécies de carrapatos encontradas na área, três foram detectadas sobre humanos, caminhando sobre o corpo e ou fixadas na pele, sendo estas, *A. brasiliense* e *A. incisum* encontradas andando e fixadas na pele e *A. ovale* encontrado andando sobre a pele dos pesquisadores (Tabela 13).

Para o Parque Estadual do Espinilho dentre as quatro espécies de ixodídeos que coletamos, somente um exemplar macho de *A. tigrinum* foi encontrado parasitando a região cervical de um dos pesquisadores (F.S.K) (Tabela 13).

No município de Cerro Largo-RS, área que apresenta casos de FMB no estado foram capturadas cinco espécies de carrapatos. Entretanto não tivemos nenhum relato de ixodídeos parasitando ou andando sobre o corpo dos pesquisadores durante as etapas de coletas.

5.14 Número de depósito no *Genbank* das sequências de DNA que foram sequenciadas dos carrapatos e dos isolados

Após realizarmos o sequenciamento gênico dos genes *gltA* e *OmpA* de riquetsias e *16S rRNA* de carrapatos, de acordo com o item 4.15, quando várias sequências foram geradas do mesmo gene de riquetsia, procedente da mesma espécie de carrapato, coletado na mesma área (Mata Atlântica, Pampa ou área endêmica para FMB), realizamos então o alinhamento destas sequências, como descrito no item 4.15, quando evidenciamos que todas as sequências derivadas de uma mesma espécie de ixodídeo coletado de uma mesma área eram iguais somente uma destas sequência foi depositada no *Genbank*. O mesmo ocorreu em relação ao sequenciamento gênico do gene *16S rRNA* de carrapatos.

Foram identificadas através de técnicas moleculares e também pelo isolamento em cultivo celular, seis espécies de *Rickettsia* para o RS, sendo estas, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica em *A. ovale* coletado no município de Cerro Largo área endêmica para FMB no RS, *Candidatus R. andeanae* em *A. aureolatum* e *A. tigrinum* coletados no Pampa, *Candidatus R. amblyommii* em *A. brasiliense* na Mata Atlântica e *A. longirostre* de Cerro Largo, *R. bellii* em *I.*

loricatus na Mata Atlântica e em Cerro Largo, para ambas as áreas esta riquétzia foi isolada, *R. rhipicephali* de *A. yucumense* e *H. juxtakochi* na Mata Atlântica e por fim *Candidatus R. asemboensis* de pulgas oriundas de cães amostrados na cidade de Derrubadas-RS (Mata Atlântica), de acordo com a Tabela 14.

Tabela 13 - Carrapatos coletados sobre humanos entre junho de 2013 a janeiro de 2014, na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS

Espécie (n°)	Local	Local do parasitismo (n°)	Andando sobre o corpo (n°)	n° positivos na qPCR/n° testados
<i>A. brasiliense</i>				
Larva (1)	Mata Atlântica		1	0/1
Ninfa (8)	Mata Atlântica	Membro superior (1)	7	0/6
<i>A. incisum</i>				
Ninfa (27)	Mata Atlântica	Membro superior (7)	10	0/17
		Membro inferior (5)		
		Costas (2)		
		Abdômen (3)		
<i>A. ovale</i>				
Adulto (1)	Mata Atlântica		1	0/1
<i>Amblyomma</i> sp.				
Larva (2)	Mata Atlântica		2	0/2
<i>A. tigrinum</i>				
Adulto	Pampa	Região cervical (1)		0/1

5.15 Identificação do depósito na Coleção Nacional de Carrapatos da FMVZ-USP dos ixodídeos amostrados

Com intuito de registrar as espécies de carrapatos coletadas no RS, pelo menos um espécime de ixodídeo das doze espécies encontradas foram depositados na Coleção Nacional de Carrapatos da FMVZ-USP, com exceção de *R. microplus*. Contribuindo com o acréscimo de 17 lotes da presente coleção, como demonstrado na Tabela 15

Tabela 14 - Sequências de DNA obtidas dos isolados e carrapatos coletados entre junho de 2013 e janeiro de 2014 na Mata Atlântica (DE), Pampa (BQ) e Área endêmica para FMB (CL) no RS

Espécie de carrapato	Local	Gene (nºsequenciados)	Espécie de riquetsia	Identidade no Genbank (% de Identidade)	Número de depósito no Genbank ³
<i>A. aureolatum</i>	BQ	<i>16S rRNA</i>	NA	KF179343 (99)	KX434746
		<i>gltA</i> (1)	<i>R. andeanae</i>	JN180849 (100)	KX434743
		<i>OmpA</i> (1)	<i>R. andeanae</i>	KF179352 (100)	KX434738
<i>A. brasiliense</i>	DE	<i>16S rRNA</i>	NA	FJ424399 (100)	KX434751
		<i>gltA</i> (1)	<i>R. amblyommii</i>	CP012420 (100)	KX434741
		<i>OmpA</i> (1)	<i>R. amblyommii</i>	JX867426 (100)	KX434739
<i>A. dubitatum</i>	CL	<i>16S rRNA</i>	NA	DQ858955 (99,7)	KX137896
<i>A. longirostre</i>	CL	<i>16S rRNA</i>	NA	KM262205 (100)	KX137894
		<i>OmpA</i> (2)	<i>R. amblyommii</i>	KF702333 (99,5)	KX137901
<i>A. ovale</i> ¹	CL	<i>16S rRNA</i> ¹	NA	KR605468 (100) ¹	KX137897
			NA	KR605466 (100) ¹	KX137898
		<i>gltA</i> (1)	cepa Mata Atlântica	GQ855235 (99,9)	KX137899
		<i>OmpA</i> (4)	cepa Mata Atlântica	KJ855085 (100)	KX137902
<i>A. tigrinum</i>	BQ	<i>16S rRNA</i>	NA	KF179344 (100)	KX434747
		<i>gltA</i> (3)	<i>R. andeanae</i>	JN180849 (100)	KX434742
		<i>OmpA</i> (18)	<i>R. andeanae</i>	KF179352 (100)	KX434737
<i>A. yucumense</i>	DE	<i>16S rRNA</i> ¹	NA	KJ914670 (100)	KX434750
			NA	KJ914670 (99)	KX434748
			NA	KJ914670 (99)	KX434749
		<i>gltA</i> (4)	<i>R. rhipicephali</i>	DQ865206 (100)	KX434744
		<i>OmpA</i> (6)	<i>R. rhipicephali</i>	CP013133 (100)	KX434735
<i>H. juxtakochi</i>	DE	<i>16S rRNA</i>	NA	AY762323 (99)	KX434752
		<i>gltA</i> (2)	<i>R. rhipicephali</i>	DQ865206 (100)	KX434745
		<i>OmpA</i> (1)	<i>R. rhipicephali</i>	CP013133 (100)	KX434736
<i>I. loricatus</i>	DE	<i>16S rRNA</i>	NA	AF549840 (99)	KX434753
			NA	AF549840 (99)	KX434754
		<i>gltA</i> (2)	<i>R. bellii</i>	DQ146481 (100)	KX434740*
<i>I. loricatus</i>	CL	<i>16S rRNA</i>	NA	AF549840 (99,5)	KX137895
		<i>gltA</i> (1)	<i>R. bellii</i> *	DQ146481 (100)	KX137900*
<i>Ctenocephalides spp.</i> ²	DE	<i>gltA</i> (3)	<i>R. asemboensis</i>	KJ569090 (100)	KX533943

* = isolado em cultivo celular; ¹ = obtivemos 2 haplótipos distintos para esta espécie de carrapato; ² = espécie de pulgas coletadas de cães amostrados em Derrubadas-RS; ³ = as sequências estarão disponíveis para acesso no Genbank a partir de 01/12/2016.

Tabela 15 - . Identificação dos carrapatos depositados na Coleção Nacional de Carrapatos da FMVZ-USP

Espécie do carrapato	Local de coleta	Fase (nº)	Origem	nº do depósito
<i>A. brasiliense</i>	Mata Atlântica	ninfa (4) adulto (1)	ambiente	CNC 3329
		ninfa (1)	humano	CNC 3331
<i>A. aureolatum</i>	Mata Atlântica	adulto (1)	cão	CNC 3325
<i>A. dubitatum</i>	Área endêmica	ninfa (1)	ambiente	CNC 3295
<i>A. longirostre</i>	Área endêmica	ninfa (1)	ambiente	CNC 3294
<i>A. ovale</i>	Área endêmica	adulto (2)	cão	CNC 3293
		ninfa (1)	<i>Akodon montensis</i>	CNC 3296
<i>A. ovale</i>	Mata Atlântica	adulto (2)	cão	CNC 3326
<i>A. incisum</i>	Mata Atlântica	ninfa (15) adulto (2)	ambiente	CNC 3323
		ninfa (9)	humano	CNC 3324
<i>A. tigrinum</i>	Pampa	ninfa (1)	Ambiente	CNC 3332
		adulto (4)	cão	CNC 3333
<i>A. yucumense</i>	Mata Atlântica	ninfa (1)	<i>Didelphis aurita</i>	CNC 3330
<i>H. juxtakochi</i>	Mata Atlântica	ninfa (1)	ambiente	CNC 3327
<i>I. loricatus</i>	Área endêmica	larvas*	<i>Didelphis albiventris</i>	CNC 3297
<i>I. loricatus</i>	Mata Atlântica	adulto (1)	<i>Didelphis aurita</i>	CNC 3328
<i>R. sanguineus</i>	Pampa	adulto (8)	cão	CNC 3322

* = larvas oriundas de uma postura de uma fêmea que foi coletada ingurgitada de *I. loricatus*;

6 DISCUSSÃO

A discussão será subdividida nos itens abaixo, com o intuito de facilitar este processo e melhorar o entendimento deste item.

6.1 Diversidade de carrapatos coletados em fragmentos dos biomas Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS

No presente estudo foi possível detectar 12 espécies de carrapatos compondo a ixodofauna gaúcha nas áreas amostradas durante junho de 2013 a janeiro de 2014, sendo estas: *A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. ovale*, *A. tigrinum*, *A. yucumense*, *H. juxtakochi*, *I. loricatus*, *R. microplus* e *R. sanguineus*, conforme descrito nas Tabelas 7 e 8. Com exceção de *A. yucumense* espécie nova descrita a partir do presente estudo (KRAWCZAK et al., 2015), as demais espécies de ixodídeos coletadas já haviam sido descritas para o RS (RIBEIRO et al., 1997; EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000; MARTINS et al., 2006; SOARES et al., 2009; SANGIONI et al., 2011). Esta biodiversidade está em concordância com a fauna de vertebrados presente nas áreas coletadas, assim como descrito nos itens 2.5, 2.6 e 2.7, já que a presença de parasitas, neste caso ixodídeos, em uma determinada área está diretamente correlacionada com a presença do seus respectivos hospedeiros.

Apesar de não termos coletado aves, alguns trabalhos nos demonstram que esta é uma oportuna ferramenta para ser usada em estudos que visem analisar a ixodofauna de uma determinada área. Ogrzewalska et al. (2011) partindo de capturas de aves no Parque Estadual Morro do Diabo, que consiste de um fragmento de 36.000ha de Mata Atlântica no estado de SP, evidenciaram sete espécies de ixodídeos nas aves que habitavam este fragmento do bioma, sendo estas: *A. nodosum*, *A. longirostre*, *A. cajennense*, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma coelebs*, *A. ovale* e *A. naponense*. Já Lugarini et al. (2015) coletando aves em três áreas da Mata Atlântica no estado da Paraíba (Reserva Biológica Guaribas, Floresta Nacional Restinga de Cabedelo e no Jardim Botânico Benjamin Maranhão) constataram quatro espécies de ixodídeo nas aves, sendo que duas delas: *Amblyomma auricularium* e *Amblyomma varium* não foram encontradas nas aves amostradas por Ogrzewalska et al (2011). Pacheco et al. (2012) da mesma forma trabalhando

com aves que foram capturadas entre março de 2004 e fevereiro de 2006 em remanescentes de Mata Atlântica de três municípios (Londrina, São Jorge do Oeste e Adrianópolis) mais ao sul do Brasil, no estado do Paraná, constataram cinco espécies de ixodídeos parasitando as aves nesta região do bioma, onde somente duas delas, *A. aureolatum* e *Amblyomma parkeri*, não haviam sido detectadas pelos dois trabalhos supracitados. Os trabalhos mencionados anteriormente sobre ixodidose em aves nos levam a crer que se tivéssemos buscado ixodídeos usando esta ferramenta possivelmente teríamos encontrado outras espécies de carrapatos na Mata Atlântica gaúcha.

No Parque Estadual do Turvo (PET) fragmento com o maior grau de preservação de Mata Atlântica gaúcha, coletamos oito espécies de ixodídeos (*A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. incisum*, *A. ovale*, *A. yucumense*, *H. juxtakochi*, *I. loricatus* e *R. microplus*) de pequenos mamíferos, cães e meio ambiente (apesar de não planejado, *R. microplus* foi amostrado de um bovino que estava dentro da área do parque). Dantas-Torres et al. (2012) amostrando carrapatos de pequenos mamíferos capturados entre dezembro de 2007 e março de 2009 em seis fragmentos de Mata Atlântica no estado de Pernambuco, encontraram quatro espécies de ixodídeos: *A. dubitatum*, *I. loricatus*; *Haemaphysalis leporispalustris* e *Amblyomma fuscum*, apesar deste estudo ter encontrado uma diversidade menor de espécies para a ixodofauna da Mata Atlântica localizada no Pernambuco, fato provavelmente ocorrido devido os autores terem amostrado ixodídeos somente de pequenos mamíferos, duas espécies (*A. fuscum* e *H. leporispalustris*) não foram encontradas na nossa perquisição no PET.

Em um estudo realizado no Parque Estadual da Pedra Branca, Rio de Janeiro, Mata Atlântica, onde 160 pequenos mamíferos foram capturados durante 24 meses (outubro de 2005 a outubro de 2007) oito espécies de carrapatos foram encontradas, sendo estas: *Amblyomma geayi*, *Amblyomma scutatum*, *A. longirostre*, *Ixodes amarali*, *Ixodes auritulus*, *Ixodes didelphidis*, *Ixodes luciae* e *I. loricatus* (OLIVEIRA et al., 2014). Apesar deste último estudo ter detectado a mesma biodiversidade na ixodofauna da Mata Atlântica do RJ, tratando-se do ponto numérico, somente *I. loricatus* foi encontrado comumente em relação ao nosso estudo no fragmento de Mata Atlântica gaúcha, reforçando assim a grande diversidade de espécies da ixodofauna brasileira presentes no bioma Mata Atlântica.

Barbieri et al. (2014) em um trabalho realizado em 2011, amostrando carrapatos de cães que habitavam casas envolvidas por fragmentos de Mata Atlântica, no município de Blumenau, Santa Catarina, encontraram três espécies de ixodídeos sobre os cães, *A. aureolatum*, *A. ovale* e

R. sanguineus que tinham livre acesso a mata. Szabó et al. (2009) através de coletas de carrapatos do ambiente, visando a maximização de captura de espécies e abundância de carrapatos, realizaram um estudo em trilhas de animais, no Parque Estadual de Intervales, SP, durante junho de 2002 e março de 2006, os autores constataram sete espécies de ixodídeos, *A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. ovale*, *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) e *H. juxtakochi* no local de Mata Atlântica estudado, esta biodiversidade de espécies foi muito semelhante a encontrada no fragmento de Mata Atlântica analisado na presente perquisição, de acordo com as Tabelas 7 e 8.

Em uma pesquisa realizada no Parque Estadual da Serra do Mar, no estado de SP, no período de Julho de 2008 a Junho de 2009 a partir de coleta de carrapatos de vida livre, cães e *D. aurita* os autores evidenciaram 13 espécies de ixodídeos: *A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. fuscum*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *Amblyomma naponense*, *Amblyomma nodosum*, *A. ovale*, *H. juxtakochi*, *Ixodes aragaoi*, *I. loricatus* e *R. sanguineus* no fragmento avaliado de Mata Atlântica (SABATINI et al., 2010). No município de Peruíbe, SP, na Mata Atlântica localizada na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, entre o período de abril de 2010 a fevereiro de 2011, amostrando carrapatos de pequenos mamíferos, cães e meio ambiente, mesmos recursos de coleta de ixodídeos utilizados no presente estudo, *A. brasiliense*, *A. fuscum*, *A. longirostre*, *A. ovale*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*), *H. juxtakochi*, *I. loricatus* e *R. sanguineus* foram encontrados, totalizando assim dez espécies amostradas para área (SZABÓ et al., 2013). Ogrzewalska et al (2012b) coletaram carrapatos de pequenos mamíferos, cães e aves silvestres em fragmentos de Mata Atlântica na região metropolitana de SP, sendo que: *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. longirostre*, *A. nodosum*, *A. parkeri*, *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*), *H. juxtakochi*, *H. leporispalustris* e *R. sanguineus* foram as nove espécies coletadas.

Esta diversidade de ixodídeos detectada por Sabatini et al. (2010); Ogrzewalska et al. (2012b) e Szabó et al. (2013), reforça a extrema importância de estudos que visam avaliar a ixodofauna de um local e os possíveis patógenos circulantes nestes artrópodes, empregando mais de uma técnica de coleta de carrapatos (coleta de animais domésticos que acessem a mata, animais silvestres e obtenção de carrapatos diretamente do ambiente) para se ter uma real situação da ixodofauna existente e consequentemente dos patógenos circulantes nestes vetores.

O presente estudo é pioneiro na avaliação da ixodofauna sobre cães, pequenos mamíferos e ambiente no bioma Pampa sobre o território brasileiro. Constatamos a presença de quatro espécies de carrapatos no Parque Estadual do Espinilho, fragmento escolhido para representar o bioma, *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *R. sanguineus* foram os ixodídeos detectados. Entretanto, em uma revisão que descreveu a ixodofauna gaúcha, partir de análise de carrapatos depositados em coleções, amostrados em diversas cidades, ficou evidente a presença de pelo menos mais 13 espécies de ixodídeos além das amostradas no presente estudo para o Pampa brasileiro, sendo estas: *Amblyomma albopictum*, *A. auricularium*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum* (publicado como *Amblyomma cooperi*), *A. humerale*, *A. incisum*, *A. parvum*, *A. scutatum*, *A. triste*, *H. juxtakochi*, *Ixodes auritulus*, *I. loricatus* e *R. microplus* (EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000).

O Cerrado dentre os demais biomas Amazônia, Caatinga, Mata Atlântica e Pantanal, brasileiros é o que mais se assemelha fitofisionomicamente ao Pampa, estudos que coletaram carrapatos de pequenos mamíferos e outros animais silvestres, animais domésticos e ambiente indicam a presença de pelo menos 14 espécies de ixodídeos para o Cerrado, *A. auricularium*, *A. coelebs*, *A. dubitatum*, *A. ovale*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. parkeri*, *A. parvum*, *A. rotundatum*, *A. sculptum*, *Dermacentor nitens* (publicado como *Anocentor nitens*), *Ixodes amarali*, *R. microplus* e *R. sanguineus* se assemelhando assim numericamente a diversidade de espécies encontradas no Pampa (SZABÓ; OLEGÁRIO; SANTOS, 2007; NIERI-BASTOS et al., 2014; SPONCHIADO et al., 2015).

Analizando o supracitado, podemos evidenciar diferenças entre a ixodofauna do Pampa e Mata Atlântica, isto ocorre devido aos ectoparasitas, neste caso os carrapatos, estarem intimamente ligados aos hospedeiros e fatores ambientais, tais como: diversidade e abundância de espécies da fauna, clima, pluviosidade, altitude, flora, características da serrapilheira e umidade (MARTINS; MOURA; LABRUNA, 2012; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; BARBIERI et al., 2015; MARTINS et al., 2016a).

Cerro Largo, município localizado ao noroeste do Rio Grande do Sul, sendo o primeiro e com o maior número de casos confirmados de FMB para o estado, foi considerado neste trabalho como área endêmica de FMB no RS. Esta cidade está situada na região de transição Mata Atlântica-Pampa, entretanto conta com características fitofisionômicas da vegetação remanescente no local, típicas de Mata Atlântica (CUNHA et al., 2009).

Partindo da coleta de carrapatos do ambiente cães e pequenos mamíferos (item 4.5) (apesar de não planejado, foi amostrado carrapatos de um equino) foi possível detectar cinco espécies de ixodídeos em Cerro Largo: *A. dubitatum*, *A. longirostre*, *A. ovale*, *I. loricatus* e *R. microplus*.

Nossos achados moleculares, os quais serão discutidos logo abaixo, indicam que uma nova riquetsiose humana descrita inicialmente para o estado de SP, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica seja o agente responsável pelos casos humanos de riquetsiose em Cerro Largo (SPOLIDORIO et al., 2010; SANGIONI et al., 2011). Estudos realizados no estado de SP em áreas endêmicas para a riquetsiose causada pela cepa Mata Atlântica, em que coletas de ixodídeos foram realizadas em animais silvestres, domésticos e ambiente, foi possível verificar a presença de: *A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. fuscum*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. ovale*, *A. sculptum*, *H. juxtakochi*, *Ixodes aragaoi*, *I. loricatus* e *R. sanguineus* somando assim 14 espécies (SABATINI et al., 2010; SZABÓ et al., 2013). Já Barbieri et al. (2014) analisando carrapatos de cães oriundos de área considerada endêmica para riquetsiose em humanos causada pela cepa Mata Atlântica, na Região Sul do Brasil, mais especificamente na cidade de Blumenau-SC (KRAWCZAK et al., 2016c), encontraram somente três espécies de ixodídeos, *A. aureolatum*, *A. ovale* e *R. sanguineus*, sobre os cães o que se assemelha aos achados do presente estudo (Tabelas 7, 8 e 10) apesar dos autores terem usado somente uma fonte de obtenção de carrapatos.

Para os cenários nos estados de SP e MG onde *R. rickettsii* é apontada como o agente causal da FMB, coletas de carrapatos de cães, gatos, equinos, pequenos mamíferos, aves silvestres e ambiente em áreas endêmicas, demonstram que *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. longirostre*, *A. nodosum*, *A. parkeri*, *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*), *D. nitens* (publicado como *A. nitens*), *H. juxtakochi*, *H. leporispalustris* e *R. sanguineus*, foram as espécies encontradas através de diversos estudos realizados nas áreas. Baseado nisto, fica evidente que em todas estas áreas *A. sculptum* e *A. aureolatum* estão presentes, confirmando assim a importância epidemiológica destas duas espécies de carrapatos atuando como vetores de FMB, já que estas espécies são comprovadamente vetores de *R. rickettsii* no Brasil (GUEDES et al., 2005; SANGIONI et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006; HORTA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2012b; KRAWCZAK et al., 2014; SARAIVA et al., 2014).

A presença de *A. ovale* notada neste estudo na área endêmica para FMB no RS, corrobora com outros trabalhos onde a cepa Mata Atlântica é apontada como o agente de riquetsiose humana e a presença de *A. ovale* é eminente (MEDEIROS et al., 2011; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014). Krawczak et al. (2016a) demonstraram que *A. ovale* é um vetor eficiente de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e muito embora a bactéria seja patogênica para este ixodídeo, interferindo na reprodução do mesmo, este artrópode é capaz de transmitir a bactéria transtadial e transovariana em uma taxa de até 100%, elucidando a importância deste carrapato em áreas endêmicas para febre maculosa brasileira da Mata Atlântica.

6.2 Ixodidose em cães que habitam os biomas Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS

Partindo de 69, 70 e 187 exames visando a detecção de carrapatos em cães oriundos da Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB, respectivamente, no RS foi possível constatar que 17,4% (12/69), 30% (21/70) e 5,3% (10/187) dos exames realizados nos cães foram positivos para Mata Atlântica, Pampa e área endêmica, respectivamente, Tabela 7.

Cães procedentes de Derrubadas-RS (Mata Atlântica) albergavam no momento dos exames duas espécies de ixodídeos, sendo que 1,45% (1/69) dos exames detectaram *A. aureolatum* nos cães com uma média de parasitismo de um carrapato por animal e 16% (11/69) dos exames evidenciaram *A. ovale* infestando os cães com uma média de 3,6 ixodídeos por animal (Tabela 7). O grau de infestação de carrapatos nestes cães que vivem em áreas de Mata Atlântica do RS, aqui amostrados, diferem dos achados de outros trabalhos em relação a diversidade de espécies e intensidade de parasitismo quando comparado com outras partes do Brasil.

Pinter et al. (2004) em um estudo que avaliou a dinâmica sazonal de *A. aureolatum* durante 24 meses em cães que habitavam áreas de Mata Atlântica no estado de SP, constataram que a prevalência média mensal deste ixodídeo nos cães foi de 46,9%. Foi verificado também o parasitismo de *R. sanguineus* e imaturos de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) nos cães.

Szabó et al. (2013) coletando carrapatos de 38 cães, totalizando 119 exames nestes animais, durante um período de 10 meses, em área de preservação da Mata Atlântica no litoral de SP, evidenciaram que *A. ovale* foi a espécie com a maior frequência de parasitismo nos cães, corroborando os achados do presente estudo, ainda que tenham encontrado imaturos de *A. brasiliense*, *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) e *A. fuscum* sobre os cães. Já na região Sul do Brasil em SC, onde *A. aureolatum* e *A. ovale* vivem em simpatria, diferentemente do relatado para o estado de SP, houve o relato da presença de *A. aureolatum* (18,9% de prevalência), *A. ovale* (34% de prevalência) e *R. sanguineus* (3,8% de prevalência) sobre os cães da região de Blumenau-SC, Mata Atlântica, onde novamente *A. ovale* é a espécie mais frequente nos animais (BARBIERI et al., 2014, 2015). No entanto, para este mesmo estado (SC) entre 2006 a 2008 foram coletados 248 carrapatos de cães, por Medeiros et al. (2011) em cinco regiões de Mata Atlântica do estado, em que *A. aureolatum* (125 exemplares), *A. ovale* (82 exemplares), *A. tigrinum* (10 exemplares), *R. sanguineus* (30 exemplares) e *R. microplus* (1 exemplar) foram amostrados sobre os cães e ficou constatado que *A. aureolatum* foi o carrapato mais frequente nos cães daquelas áreas.

Em cães que habitavam propriedades rurais ao entorno do Parque Estadual do Espinilho, localizado em Barra do Quaraí-RS (Pampa), na oportunidade dos exames buscando carrapatos sobre estes animais, evidenciamos ixodidose de *A. aureolatum*, *A. tigrinum* e *R. sanguineus* nos canídeos vistoriados (Tabela 7). Visto que 14,28% (10/70) dos exames demonstraram igualdade na frequência de *A. tigrinum* e *R. sanguineus* sobre os animais. Entretanto, a média de carrapatos por cães de *A. tigrinum* (7,5 carrapatos por cão) foi 2,8 vezes superior à média de *R. sanguineus* (2,7 carrapatos por cão).

A. aureolatum também foi identificado em cães no Pampa, onde 11,43% (8/70) dos animais estavam parasitados com este ixodídeo, com uma média de parasitismo de três carrapatos por cão, Tabela 7. Ribeiro et al. (1997) entre 1993 a 1994 examinando 450 cães na cidade de Porto Alegre-RS, localizada no bioma Pampa, também detectaram *A. aureolatum* e *R. sanguineus* nos animais, porém naquele estudo esta última espécie foi a mais prevalente, 93,22% dos cães com ixodidose estavam parasitados por *R. sanguineus*. Os achados de Ribeiro et al. (1997) podem ser facilmente explicados, pois diferentemente do presente estudo os carrapatos foram coletados exclusivamente de áreas urbanas, ambiente no qual o *R. sanguineus* está muito bem adaptado (LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES, 2010; GRAY et al., 2013).

Na região nordeste do estado de SP, mais precisamente na cidade de Franca, inserida sobre o domínio do bioma Cerrado, que por sua vez guarda similaridade com o Pampa, um estudo conduzido em 102 e 38 cães de área urbana e rural, respectivamente, buscando a detecção de ixodídeos, foi constatada a presença de *R. sanguineus*, *A. ovale*, *R. microplus* e *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) nos cães, em que *R. sanguineus* foi a espécie mais prevalente entre os animais, seguido de *A. ovale* (SZABÓ et al., 2001). No presente estudo apesar de não termos encontrado *A. ovale* propriamente dos cães domésticos, residentes no Pampa, obtivemos um espécime deste carrapato de um *C. thous* encontrado atropelado na estrada em frente à entrada do Parque Estadual do Espinilho, o que corrobora com Labruna et al. (2005b) que claramente demonstram que *A. ovale* é o ixodídeo mais prevalente em canídeos silvestres do Brasil.

Em um outro estudo realizado também no bioma Cerrado, especificamente no Parque Estadual Serra de Caldas Novas, Goiás, 27 carrapatos foram coletados de cães que frequentavam áreas do parque e *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*), *A. ovale*, *A. tigrinum* e *R. sanguineus* foram identificados como as espécies que parasitavam estes animais (QUEIROGAS et al., 2010), o que apoia fortemente os nossos resultados, com duas breves exceções. Primeiro, *A. aureolatum* que não foi achado por Queirogas et al. (2010) pois esta espécie de ixodídeo prefere áreas mais úmidas como a Mata Atlântica (PINTER, 2003; PINTER et al., 2004; BARBIERI et al., 2015) e segundo, o fato de *A. sculptum* não ter sido coletado em nenhuma área no presente estudo, em concordância com os achados de Martins et al. (2016a) que claramente demonstram a ausência deste carrapato no RS. Isto pode ocorrer pelo fato de *A. sculptum* ter dificuldades em se adaptar aos fatores abióticos encontrados no RS (temperaturas abaixo de 0°C durante o inverno) e também por demonstrar estar intimamente adaptado a áreas legítimas do bioma Cerrado, onde temperaturas baixas (inferiores a 10°C) não são comuns (SZABÓ; OLEGÁRIO; SANTOS, 2007; VERONEZ et al., 2010).

A. ovale foi a única espécie de carrapato encontrada na presente perquisição parasitando os cães de Cerro Largo (área endêmica para FMB no RS), com uma média de parasitismo de 2,3 carrapatos por cão, onde 5,3% (10/187) dos exames foram positivos para presença de *A. ovale* Tabela 7. Este ixodídeo é atribuído como vetor da cepa Mata atlântica de riquetsia para humanos no Brasil (SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014; KRAWCZAK et al., 2016a, 2016c; NIERI-BASTOS et al., 2016). Por sua vez, estudos

realizados em áreas endêmicas para febre maculosa da Mata Atlântica em SP e SC também verificaram que a ixodidose por *A. ovale* era a mais frequente nos cães vistoriados (SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014).

Apesar da ixodofauna detectada nos cães amostrados nos diferentes biomas do RS ter se restringido a quatro espécies, *A. aureolatum*, *A. ovale*, *A. tigrinum* e *R. sanguineus*, estes achados estão absolutamente de acordo com outros realizados no território nacional, sendo que as espécies encontradas na atual pesquisa são as mais comuns parasitando cães entre os diferentes biomas do Brasil, com exceção de *A. sculptum* que é ausente no RS (RIBEIRO et al., 1997; LABRUNA et al., 2000, 2001; ROZENTAL et al., 2002; RODRIGUES; DAEMON; RODRIGUES, 2008; QUEIROGAS et al., 2010; COSTA-JUNIOR et al., 2012; BARBIERI et al., 2014; LAVINA et al., 2014; LUZ et al., 2014; ARAES-SANTOS et al., 2015; MINERVINO et al., 2015; COSTA et al., 2015; MARTINS et al., 2016a; MELO et al., 2016b).

Labruna e Pereira (2001) esclarecem que os carrapatos do gênero *Amblyomma* são mais frequentes parasitando cães em áreas rurais, próximo a matas, do que em áreas urbanas, onde predominantemente a ixodidose é causada por *R. sanguineus*, o que foi também constatado em nosso estudo pois na grande maioria dos exames ixodídeos do gênero *Amblyomma* foram encontrados nos cães, independente do local de coleta já que estes animais habitavam áreas rurais.

Desta maneira, podemos inferir que *A. ovale* está amplamente distribuído no RS, posto que encontramos este ixodídeo sobre canídeos em todas as áreas de coleta. Por sua vez, este achado não é extraordinário pois esta espécie de carrapato está amplamente distribuída no continente Americano, sendo encontrado desde a Argentina até os Estados Unidos (GUGLIELMONE et al., 2003). Contudo, esta informação é de extrema relevância para os órgãos de vigilância do estado, visto que este carrapato além de ser vetor da Febre Maculosa da Mata Atlântica no Brasil está entre as espécies de ixodídeos que mais parasitam humanos no país (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; KRAWCZAK et al., 2016a; NIERI-BASTOS et al., 2016). Por sua vez, apesar da ampla distribuição do *A. ovale* no Brasil, este artrópode até o presente momento só foi encontrado infectado com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica nos biomas Mata Atlântica e Pantanal (SABATINI et al., 2010; MELO et al., 2016b; WITTER et al., 2016).

Apesar de não termos encontrado, através da detecção molecular, riquetsias sabidamente patogênicas nas demais espécies de carrapatos, *A. aureolatum*, *A. tigrinum* e *R. sanguineus*,

coletadas dos cães, assim como encontramos no *A. ovale* oriundo da área endêmica para febre maculosa (este assunto será aprofundado adiante) no RS (Tabela 11), todas estas espécies são apontadas como vetores de riquetsias patogênicas para humanos no continente Sul Americano (PINTER; LABRUNA, 2006; MORAES-FILHO et al., 2009; PIRANDA et al., 2011; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; LADO et al., 2014; ROMER et al., 2014; SARAIVA et al., 2014). Estas espécies de ixodídeos também estão diretamente associadas ao parasitismo humano no Brasil e demais países da América do Sul (DANTAS-TORRES; FIGUEREDO; BRANDÃO-FILHO, 2006; GUGLIELMONE et al., 2006; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; MENTZ et al., 2016).

Estudos que visam a constatação da ixodofauna parasitária de cães são de extrema importância tratando-se de saúde pública e veterinária, pois carrapatos podem transmitir diretamente patógenos para humanos e animais, causando grandes danos à saúde humana e animal (DANTAS-TORRES, 2008; DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012). Nesta perspectiva, a avaliação de carrapatos nos cães é de suma importância, pois muitas espécies de carrapatos que não são adaptadas ao ambiente antrópico são carregadas pelos cães até o ambiente domiciliar, onde os carrapatos frequentemente se desprendem e se espalham pela habitação podendo então transmitir doenças ao homem (OGRZEWALSKA et al., 2012b; LAVINA et al., 2014; LUZ et al., 2014).

Destacamos que o presente estudo é pioneiro na avaliação da ixodofauna parasitária de cães amostrados em áreas rurais dos biomas Mata Atlântica e Pampa e também em áreas endêmicas para FMB no RS.

6.3 Parasitismo por carrapatos em pequenos mamíferos capturados em fragmentos dos biomas Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS

Dentre as nove espécies de pequenos mamíferos *A. montensis*, *B. iheringi*, *C. guahybae*, *D. aurita*, *E. russatus*, *O. nigripes*, *O. judex*, *S. angouya*, *T. nigrita* coletadas na área de Mata Atlântica gaúcha (Parque Estadual do Turvo) (Tabela 4), não temos nenhuma nova contribuição para mastofauna do local, pois estudos prévios já haviam identificado todas estas nove espécies para o local em questão e ainda demonstraram a presença de mais outras três espécies, *Juliomys*

pictipes, *Kannabateomys amblyonyx*, *Micoureus paraguayanus* (MELO et al., 2011b), mas que não foram capturados no presente estudo.

Quando não foi possível a identificação morfológica das espécies de carrapatos (especificamente larvas), o emprego da PCR tendo como alvo a amplificação parcial do gene mitocondrial *16S rRNA* de carrapatos, se mostrou extremamente eficiente para avaliar a ixodofauna de imaturos nestes animais silvestres, tal como descrito em outros estudos (PINTER, 2007; OGRZEWALSKA et al., 2014; MARTINS et al., 2016b).

No fragmento estudado da Mata Atlântica gaúcha 14,6% (24/164) dos pequenos mamíferos capturados apresentaram algum grau de ixodidose por imaturos de: *A. brasiliense*, *A. ovale*, *A. yucumense*, *I. loricatus* e espécimes adultos desta última espécie também foram encontrados parasitando *D. aurita*, de acordo com a Tabela 9. A diversidade de espécies de ixodídeos aqui encontrada se assemelha com o demonstrado na Mata Atlântica do estado de SP, entretanto naquele estudo outras duas espécies foram amostradas de pequenos mamíferos, sendo estas: *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) e *A. fuscum* (SZABÓ et al., 2013). Porém isto é facilmente justificável, já que de acordo com Martins et al. (2016a), *A. sculptum* é ausente em todo território do RS e *A. fuscum* não foi detectado por nenhum método de captura aqui empregado.

Já a ixodofauna encontrada por Ogrzewalska et al. (2012b) e Martins et al. (2016b) partindo da captura de roedores da Mata Atlântica Paulista foi expressivamente diferente da encontrada no presente estudo, sendo que ambos autores detectaram *A. sculptum*, *A. dubitatum*, *Ixodes schulzei* e *H. juxtakochi*, apesar desta última espécie não ter sido recuperada de pequenos mamíferos no presente estudo, estava presente na vegetação do Parque Estadual do Turvo. Vale ressaltar que em nenhum dos trabalhos supracitados foi detectada a presença de *A. yucumense* parasitando pequenos mamíferos silvestres, uma vez que esta nova espécie de ixodídeo foi descrita a partir do presente estudo, até o momento observada exclusivamente no fragmento de Mata Atlântica aqui analisado (KRAWCZAK et al., 2015).

Tal como consta na Tabela 9, das nove espécies de pequenos mamíferos capturadas, somente *T. nigrata* não apresentou carrapatos. Por outro lado, dos sete *D. aurita* vistoriados na Mata Atlântica, 100% estavam parasitados no momento dos exames, tendo sido identificados imaturos de *A. brasiliense*, *A. yucumense* e adultos de *I. loricatus* nesta espécie. Com exceção de *A. yucumense*, as demais espécies de carrapatos já haviam sido descritas neste didelfídeo, onde

inclusive, estudos apontam que *D. aurita* apresenta uma frequência de infestação por *I. loricatus* superior a 50% (HORTA et al., 2007; PINTER, 2007; OGRZEWALSKA et al., 2012b; SZABÓ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

Para roedores da espécie *O. judex* 57,14% (4/7) dos exemplares examinados estavam parasitados por imaturos de *A. yucumense*, 33 espécimes imaturos (22 larvas e 11 ninfas) deste ixodídeo foram encontrados parasitando estes roedores, de acordo com a Tabela 9. Revelando assim uma preferência parasitária do *A. yucumense* pelo *O. judex*. Esta preferência parasitária apresentada por espécies de carrapatos em relação a algumas espécies de cricetídeos já foi relatada. Como exemplo disto podemos citar Szabó et al. (2013) que evidenciaram a predileção parasitária de ninfas de *A. ovale* pelo roedor *E. russatus*, coletados na Mata Atlântica de Peruíbe-SP.

No bioma Pampa (Parque Estadual do Espinilho, PEE) 34 exemplares de pequenos mamíferos pertencentes a três espécies distintas de roedores e uma de marsupial (*A. azarae*, *C. aperea*, *C. chacoensis* e *O. nigripes*) foram capturados durante o presente trabalho e estão de acordo com os achados de Sponchiado (2011) que avaliou a fauna de pequenos mamíferos não voadores no PEE.

Interessantemente, a presença de carrapatos na mastofauna silvestre capturada no Pampa foi inexistente. Especulativamente, poderíamos justificar o fato pela característica da vegetação do parque, pois apresenta-se fitofisionomicamente composta por vegetação rasteira, árvores de baixo porte, isoladas ou em pequenos grupos, cujas copas na grande maioria das vezes não se sobrepõem permitindo assim a incidência direta dos raios solares sobre o solo (SIMAS; COSTA; SIMAS, 2002; GALVANI; BAPTISTA, 2003; REDIN et al., 2011), como demonstrado na Figura 1. Desta forma, o microclima ideal para o desenvolvimento dos carrapatos poderia estar prejudicado com a incidência direta dos raios solares sobre a vegetação rasteira do local, resultando numa maior temperatura da serrapilheira. Contrariamente, o bioma Cerrado que por sua vez compartilha muitas características similares às do Pampa, Sponchiado et al. (2015) revelaram oito espécies de carrapatos, *Ornithodoros mimon*, *A. coelebs*, *A. sculptum*, *A. ovale*, *A. parvum*, *A. dubitatum*, *A. parkeri* e *I. amarali*, parasitando roedores e marsupiais amostrados a partir de 54 fragmentos de Cerrado no estado do Mato Grosso do Sul.

No município de Cerro Largo-RS, área em que consideramos endêmica para FMB, 36 roedores de três espécies, *A. montensis*, *O. nigripes*, *S. angouya* e quatro marsupiais da espécie *D.*

albiventris foram capturados durante o período de estudo, totalizando assim 40 animais amostrados (Tabela 5). Em que 40% (16/40) destes pequenos mamíferos estavam parasitados por carrapatos no momento dos exames, imaturos de *A. ovale*, adultos e larvas de *I. loricatus* foram os ixodídeos encontrados realizando hemotafagia nos animais examinados, como exposto na Tabela 10.

Entre os 29 exemplares de *A. montensis* capturados, 14% (4/29) apresentaram parasitismo por imaturos de *A. ovale*. Szabó et al (2013) analisando a infestação por ixodídeos em pequenos mamíferos de uma área endêmica para Febre Maculosa da Mata Atlântica, no estado de SP, verificaram que dentre os roedores silvestres capturados a espécie *E. russatus* mostrou-se ser um hospedeiro preferencial para este carrapato, além de sugerirem a participação deste roedor como um possível hospedeiro amplificador de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica em áreas endêmicas para esta enfermidade. Isto ficou posteriormente comprovado mediante experimento de Krawczak e Labruna (2012), ao demonstrarem a capacidade de *E. russatus* em atuar como hospedeiro amplificador de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica para *A. ovale*. Analogamente sugerimos aqui que *A. montensis* poderia estar agindo como hospedeiro amplificador desta bactéria em condições naturais, mantendo a infecção deste patógeno em populações de *A. ovale*, já que tanto em condições laboratoriais como na natureza esta espécie de ixodídeo mostra uma predileção parasitária de seus estágios imaturos por roedores silvestres (MARTINS; MOURA; LABRUNA, 2012; MARTINS et al., 2016b).

Como dissemos, nenhum estudo tinha sido desenvolvido analisando a ixodofauna parasitária de pequenos mamíferos nos biomas Pampa e Mata Atlântica no Rio Grande do Sul. Dessa forma, desenvolver pesquisas neste âmbito são de extrema relevância, pois esta parcela de animais da mastofauna agem na natureza como importantes hospedeiros de estágios imaturos de carrapatos, que podem atuar como vetores de patógenos para humanos e animais (DANTAS-TORRES et al., 2012; DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012; SARAIVA et al., 2012; QUINTERO et al., 2013).

6.4 Carrapatos coletados sobre o corpo e ou parasitando humanos durante as etapas das coletas na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS

Apesar desta tese não ter como propósito avaliar o parasitismo humano por carrapatos, após o início das coletas observamos ixodídeos andando e/ou fixados sobre a pele dos pesquisadores com uma certa frequência. Razão pela qual julgamos plausível registrar cuidadosamente estes dados (Tabela 13), dado o ineditismo do achados para o estado do RS e a relevante contribuição que estas informações podem trazer para os órgãos de vigilância epidemiológica, que atuam na prevenção e controle de doenças transmitidas por vetores.

Acredita-se que os carrapatos superam todos os outros artrópodes na variedade de agentes transmitidos para humanos e animais. Pois além de vírus, bactérias, fungos, protozoários e helmintos, toxicoses neurotrópicas que podem gerar paralisias, alergias e problemas de pele também estão entre os agravos gerados pela ixodidose (HOOGSTRAAL, 1967; LONDOÑO, 1976; KRINSKY, 1983; SERRA FREIRE, 1983; ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999; COUTO et al., 2015; ARAUJO et al., 2016; CARTER et al., 2016). Dado que, mais de 16 doenças específicas podem ser causadas por carrapatos em humanos e aproximadamente 19 para animais (SONESHINE; ROE, 2014).

Fases imaturas de *A. brasiliense* e *A. incisum*, coletados na Mata Atlântica no presente estudo, além de terem sido encontradas andando sobre a pele dos pesquisadores em campo, foram observadas realizando hematofagia nos mesmos. Entretanto somente um exemplar adulto de *A. ovale* foi coletado de humanos nesta área, o qual estava caminhando sobre a pele do pesquisador.

Nossos resultados se assemelham muito com o constatado por Szabó et al. (2006), que coletaram carrapatos em um fragmento de Mata Atlântica preservado no estado de SP, pois exatamente as mesmas três espécies de carrapatos foram observadas parasitando humanos. Porém, neste estudo os autores além de terem evidenciado ninfas de *A. incisum* e *A. brasiliense* parasitando os pesquisadores, adultos destas duas espécies e de *A. ovale* também foram diagnosticados fixados na pele dos mesmos, o que difere dos achados no presente estudo, pois para o fragmento de Mata Atlântica gaúcha estudado, não reportamos casos de ixodidose de estágios adultos (Tabela 13).

Em um estudo realizado durante 11 anos, sobre um fragmento de Mata Atlântica na cidade do Rio de Janeiro, sob alto grau de antropização, 6.072 casos de ixodidose causados por *A.*

aureolatum, *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*), *A. dubitatum*, *A. ovale*, *A. varium*, *I. loricatus* e *R. sanguineus*, foram relatados em humanos (SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011). Esta notável diferença da ixodofauna parasitária de humanos do estudo anterior em relação a presente perquisição e ao trabalho de Szabó et al. (2006), todos realizados no mesmo bioma, pode ser justificada pelo fato de que a atividade humana pode alterar o ecossistema local, influenciando diretamente na biodiversidade e abundância da ixodofauna. Aliás, isto já foi verificado em outro estudo dentro de uma mesma reserva de Mata Atlântica, com diferentes ecossistemas alterados por influência humana (SZABÓ et al., 2009).

Somente um caso de ixodidose humana, gerado por um exemplar macho de *A. tigrinum* foi reportado para o bioma Pampa, de acordo com a Tabela 13. O parasitismo por *A. tigrinum* em humanos no Pampa gaúcho e uruguaio já havia sido relatado (EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000; VENZAL et al., 2003).

Interessantemente na área endêmica para FMB avaliada no presente estudo, a ixodidose nos pesquisadores que coletaram carrapatos de cães, pequenos mamíferos e ambiente foi inexistente, mesmo que espécies de ixodídeos que constantemente são relatadas parasitando humanos, como *A. ovale* e *A. dubitatum* tenham sido amostradas na área (ARZUA; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2005; LABRUNA et al., 2007b; SANGIONI et al., 2011; BERMÚDEZ C et al., 2012; LAMATTINA; NAVA, 2016). O que não diferiu do demonstrado por Szabó et al. (2013) e Barbieri et al. (2014), sendo que no primeiro estudo foi coletado carrapatos de pequenos mamíferos, cães e ambiente e no segundo somente de cães, mas em ambos não foi relatado ixodidose nos pesquisadores. Entretanto, Sangioni et al. (2011) descrevem que 20 exemplares adultos de *A. ovale* foram encontrados caminhando e/ou fixados na pele de moradores da zona rural de Cerro Largo-RS.

Todas as espécies coletadas de humanos a partir do presente estudo, tinham sido previamente relatadas parasitando pessoas no Brasil e em outros países sul americanos. *A. brasiliense* havia sido descrito parasitando o homem na Argentina, Brasil e Paraguai (ARZUA; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2005; SZABÓ et al., 2006; NAVA et al., 2007; LAMATTINA; NAVA, 2016); *A. incisum* infestando humanos na Argentina, Brasil, Guiana Francesa e Paraguai (GUGLIELMONE et al., 2006; SZABÓ et al., 2006; NAVA et al., 2007; LAMATTINA; NAVA, 2016); *A. tigrinum* causando ixodidose humana na Argentina, Brasil, Guiana Francesa, Paraguai e Uruguai (EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000; VENZAL

et al., 2003; GUGLIELMONE et al., 2006; NAVA et al., 2007) e *A. ovale* sendo observado realizando hematofagia no homem na Argentina, Brasil, Equador, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela e Panamá na América Central (GUGLIELMONE et al., 2006; SZABÓ et al., 2006; NAVA et al., 2007; SERRA-FREIRE; SENA; BORSOI, 2011; BERMÚDEZ C et al., 2012; LAMATTINA; NAVA, 2016).

Dentre as espécies de carrapatos encontradas sobre os pesquisadores (Tabela 13), destacamos o *A. ovale*, apesar do mesmo não ter sido detectado realizando a hematofagia propriamente dita, é vetor de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica para humanos (BARBIERI et al., 2014; KRAWCZAK et al., 2016a). Em outros estudos, *A. tigrinum* e *A. incisum* foram detectados naturalmente infectados com *Candidatus R. andeanae* na Argentina e *Rickettsia monteiroi* no Brasil, respectivamente (PACHECO et al., 2011; BOTTERO; TARRAGONA; NAVA, 2015). No entanto a patogenicidade destas duas riquetsias, pertencentes ao GFM permanece desconhecida (PAROLA et al., 2013; NIERI-BASTOS et al., 2014). Até o presente estudo nenhuma riquetsia havia sido relatada em *A. brasiliense*, momento em que foi encontrado *Candidatus R. amblyommii* infectando esta espécie de carrapato. Apesar de existir estudos atribuindo patogenicidade a *Candidatus R. amblyommii* para seres humanos, esta hipótese ainda é questionável, necessitando de mais pesquisas para elucidação (BILLETER et al., 2007; NICHOLSON; MASTERS; WORMSER, 2009). Destacamos que todos os carrapatos ora coletados de humanos foram submetidos à PCR para amplificação de DNA de riquetsias, resultando negativos.

6.5 Carrapatos coletados do ambiente na Mata Atlântica, Pampa e Área endêmica para FMB no RS

O intuito de aliarmos a busca de carrapatos do meio ambiente, refletiu o nosso propósito na detecção do maior número de espécies e abundância de carrapatos para as áreas estudadas. Para isto agregamos duas técnicas, o arraste de flanela e a busca ativa visual pelos ixodídeos na vegetação (item 4.5). Estudos prévios validam estes métodos para captura de carrapatos em vida livre, na medida em que o arraste de flanela possui uma maior sensibilidade para imaturos enquanto que a busca ativa visual é mais voltada a carrapatos adultos (TERASSINI et al., 2010;

RAMOS et al., 2014). Com efeito, apesar de não ter sido avaliada a performance comparativa das técnicas, foi consenso entre os pesquisadores envolvidos no presente estudo (F.S.K., M.B.L., C.S.O.) a percepção de que mais adultos foram capturados pela busca ativa visual na Mata Atlântica. Em contraposição, os imaturos foram exclusivamente amostrados pelo arraste de flanela.

Em ordem de abundância, *A. incisum*, *A. brasiliense*, *A. yucumense*, *H. juxtakochi* e *A. ovale* foram as espécies coletadas ambientalmente no Parque Estadual do Turvo (Mata Atlântica), assim como demonstrado na Tabela 8. Nossos resultados se assemelham aqueles oriundo do Parque Estadual Intervales, área de Mata Atlântica localizada no estado de SP, onde durante quatro anos (2002-2006) carrapatos foram coletados em trilhas de animais, sendo *A. incisum* e *A. brasiliense* as duas espécies mais abundantes, além de *A. aureolatum* (SZABÓ et al., 2009). Aqui, entretanto, não foi capturado *A. aureolatum* em vida livre.

No Pampa gaúcho apenas uma ninfa de *A. aureolatum* e outra de *A. tigrinum* foram coletadas. A provável justificativa disto, se apoia na mesma hipótese quando discutimos sobre a ausência de ixodídeos parasitando os roedores nesta área, talvez devido as características fitofisionômicas do fragmento de Pampa amostrado (Figura 1). No momento de busca dos ixodídeos na vegetação (período diurno), os mesmos poderiam estar sob a serrapilheira, saindo somente a noite na busca de hospedeiros, evitando assim o risco de dessecação já que áreas sombreadas no parque são praticamente inexistentes. Este comportamento noturno foi evidenciado em *Dermacentor occidentalis*, em que a busca por hospedeiro ocorreu principalmente durante a noite e pela manhã, períodos em que as temperaturas são mais amenas e a umidade relativa do ar alta. O uso da serrapilheira como estratégia para evitar a dessecação já foi descrita para *D. occidentalis* e *Ixodes scapularis* (LANE; KLEINJAN; SCHOELER, 1995; SCHULZE; JORDAN; HUNG, 1995).

Sobre a vegetação da área endêmica, três espécies de carrapatos foram coletadas, sendo estas imaturos de *A. dubitatum*, *A. longirostre* e *A. ovale*. Somente para última espécie capturamos exemplares adultos, Tabela 8.

Sabatini et al. (2010) realizando um estudo no Parque da Serra do Mar-SP, a 80 quilômetros do primeiro caso da nova riquetsiose brasileira, descrito por Spolidorio et al. (2010), também amostraram estas três espécies. Entretanto, apesar de *A. ovale* e *A. longirostre* terem sido evidenciadas por Szabó et al. (2013) através de coleta de carrapatos em área endêmica para casos

humanos de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, *A. dubitatum* não foi encontrado por estes autores. No presente estudo a revelação de *A. dubitatum* sobre a vegetação na área endêmica pode ser explicada pela presença de capivaras na área, pois nas trilhas onde realizávamos os arrastes constantemente fezes deste roedor eram avistadas. Nava et al. (2010) demonstram claramente que *H. hydrochaeris* (capivara) é um excelente hospedeiro para todas as fases de *A. dubitatum*.

6.6 Detecção molecular e isolamento de riquetsias

Com o uso de ferramentas moleculares, foram aqui identificadas pela primeira vez cinco espécies de riquetsias, *Candidatus R. amblyommii*, *Candidatus R. andeanae*, *R. bellii*, *R. rhipicephali* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, infectando a fauna de carrapatos do RS (Tabela 14). Adicionalmente, é também procedente do presente estudo o primeiro isolado em células Vero de *R. bellii* procedente de carrapatos amostrados do RS, como demonstrado na Tabela 12.

Candidatus R. amblyommii foi encontrada infectando *A. longirostre* na área endêmica para FMB no RS e em *A. brasiliense* na Mata Atlântica, ressaltamos que para esta última espécie de ixodídeo é o primeiro relato de infecção com riquetsia neste carrapato.

Nas Américas *Candidatus R. amblyommii* já foi detectada em diversos países: em *Amblyomma americanum* nos Estados Unidos; *A. coelebs* na Guiana Francesa; *Amblyomma hadanii* na Argentina; *A. longirostre* no Paraguai; *A. mixtum* no Panamá e Costa Rica; *Amblyomma neumanni* na Argentina; *A. oblongoguttatum* no Panamá; *A. ovale* no Panamá; *Amblyomma paca* em Belize, *Amblyomma patinoi* na Colômbia; *Amblyomma tonelliae* na Argentina; *D. nitens* no Panamá, *D. variabilis* nos Estados Unidos; *H. juxtakochi* no Panamá e em *R. microplus* e *R. sanguineus* no Panamá (BILLETER et al., 2007; PAROLA et al., 2007; APPERSON et al., 2008; BERMUDEZ et al., 2009; BERMÚDEZ et al., 2011; HUN et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2014; BOTTERO; TARRAGONA; NAVA, 2015; CASTRO et al., 2015; TARRAGONA et al., 2015; BERMÚDEZ et al., 2016; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2016; LOPES et al., 2016; MASTROPAOLO et al., 2016). No Brasil, *Candidatus R. amblyommii* foi detectada pela primeira vez no bioma Amazônia em *A. longirostre* sendo denominada naquele estudo como cepa Aranha (LABRUNA et al., 2004a). Desde então tem sido descrita em: *A. auricularium*, *A. cajennense* (s.s.), *A. coelebs*, *A. geayi*, *A. longirostre*, *A. parkeri*,

A. parvum, *A. sculptum* e *A. varium*. Assim, está amplamente distribuída, abrangendo cinco biomas brasileiros: Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Pantanal (LABRUNA et al., 2004a,b; OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2010; PACHECO et al., 2012a; SARAIVA et al., 2013; LUGARINI et al., 2015; MELO et al., 2016; WITTER et al., 2016).

Mediante PCR, o DNA de *Candidatus R. amblyommii* foi detectado em 66,7% (2/3) dos *A. longirostre* coletados na área endêmica para FMB no RS. Este valor de infecção é superior ao encontrado por Ogrzewalska, Uezu e Labruna (2011) que coletaram carrapatos de aves na Amazônia. O presente resultado também foi superior àqueles encontrados em imaturos de *A. longirostre* provenientes de aves capturadas em fragmentos da Mata Atlântica de SP 41,7% e na Bahia 15,4% (OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2011; OGRZEWALSKA et al., 2012b).

Pacheco et al. (2012) coletando ixodídeos de aves na Mata Atlântica no estado do Paraná, encontraram DNA de *Candidatus R. amblyommii* em 32,3% dos *A. longirostre* testados na PCR.

Portanto, a maior frequência de infecção de *Candidatus R. amblyommii* neste ixodídeo detectada no presente estudo pode ser justificada pelos poucos exemplares avaliados pela PCR, pois todos os estudos supracitados avaliaram um número muito mais expressivo de carrapatos. Neste sentido, 10,4% (5/48) dos exemplares de *A. brasiliense* coletados na Mata Atlântica e avaliados na PCR foram positivos para *Candidatus R. amblyommii*, de acordo com a Tabela 11.

Apesar de *Candidatus R. amblyommii* ter sido apontada como patogênica para humanos nos Estados Unidos, sua real importância em saúde pública permanece dúbia e carece de mais estudos (APPERSON et al., 2008; NICHOLSON; MASTERS; WORMSER, 2009).

R. rhipicephali descoberta em 1975 nos Estados Unidos, infectando 18,9% dos *R. sanguineus* coletados (BURGDORFER et al., 1975), somente foi descrita em outro país do continente Americano em 2005, no Brasil, infectando *H. juxtakochi* no bioma Amazônia e Mata Atlântica, sendo que é desta mesma espécie de ixodídeo coletado na Mata Atlântica que *R. rhipicephali* cepa HJ#5 foi isolada pela primeira vez em cultivo celular no Brasil (LABRUNA et al., 2005a, 2007d).

No presente estudo foi detectado *R. rhipicephali* infectando *H. juxtakochi* e *A. yucumense* na Mata Atlântica. Demonstrando assim a primeira detecção desta riquetsia no RS e no *A. yucumense*, como dissemos, espécie nova de carrapato descrita a partir do presente estudo (KRAWCZAK et al., 2015), ampliando a distribuição geográfica e a fauna de ixodídeos

infectados por *R. rhipicephali*, que até o presente permanece com a patogenicidade desconhecida para humanos (PAROLA et al., 2013). Fica como perspectiva, novas tentativas de isolamento desta espécie de riquetsia oriunda de carrapatos do RS, em cultivo celular.

Aqui, *Candidatus R. andeanae* foi detectada pela primeira vez no Pampa brasileiro em *A. tigrinum*, assim como demonstrado na Tabela 11, também relatamos a primeira detecção desta riquetsia infectando *A. aureolatum* coletado de cães no Pampa (Tabela 11).

Blair et al. (2004) encontraram em *A. maculatum* e *Ixodes boliviensis* amostrados no noroeste do Peru uma nova riquetsia pertencente ao GFM e a denominaram como *Candidatus R. andeanae*, homenageando o local da coleta. Esta riquetsia já foi identificada infectando *A. maculatum* nos Estados Unidos; *A. parvum* na Argentina e Paraguai; *Amblyomma pseudoconcolor* na Argentina, *A. tigrinum* na Argentina e Chile, *A. triste* no Chile e *R. sanguineus* no Peru (PACHECO et al., 2007; PADDOCK et al., 2010; TOMASSONE et al., 2010; ABARCA et al., 2012, 2013; FLORES-MENDOZA et al., 2013; OGRZEWSKA et al., 2014).

Nieri-Bastos et al. (2014) demonstraram pela primeira vez em *A. parvum* coletado no bioma Cerrado no estado do Piauí e no Pantanal do Mato Grosso do Sul *Candidatus R. andeanae* no país. Desde então esta bactéria já foi encontrada em *A. auricularium* e *A. parvum* na Caatinga, em *A. tigrinum* e *A. sculptum* no Cerrado (ARRAIS, 2013; LUGARINI et al., 2015; WITTER et al., 2016).

Apesar de Luce-Fedrow et al. (2012) e Ferrari et al. (2013) terem obtido êxito no isolamento de *Candidatus R. andeanae* em cultivo celular de células DH82, Vero e *Drosophila* S2, no presente estudo, após várias tentativas, não conseguimos o cultivo estável desta bactéria. Esta dificuldade em relação ao cultivo de *Candidatus R. andeanae* é relatada pelos mesmos autores, anteriormente citados, que a isolaram pela primeira vez nos EUA.

A taxa de infecção por *Candidatus R. andeanae* encontrada no presente estudo foi de 5% (1/20) para *A. aureolatum* e na população de *A. tigrinum* coletado no Pampa gaúcho foi de pelo menos 41%, pois dos 44 espécimes que testaram positivos na PCR (*OmpA*), 18 foram sequenciados e todas as sequências foram 100% idênticas ao depósito KF179352 do *Genbank*, de acordo com as Tabelas 11 e 14.

Arrais (2013) coletando carrapatos de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) em um fragmento do Cerrado, detectou pela PCR 15,4% (8/52) dos *A. tigrinum* infectados por

Candidatus R. andeanae. Na Argentina e Chile estudos demonstraram que 79,5% (35/44) e 39% (12/31), respectivamente, dos *A. tigrinum* amostrados estavam infectados com *Candidatus R. andeanae*.

A. tigrinum tem sido encontrado infectado por *R. parkeri* na Argentina e Uruguai, onde vem sendo apontado como vetor desta riquetsiose, juntamente com *A. triste* (LADO et al., 2014; ROMER et al., 2014). A ausência de infecção de *R. parkeri* na população de *A. tigrinum* coletada na área de Pampa, no presente estudo, que é limdeira ao Uruguai, pode ser justificada pelo proposto por Paddock et al. (2015), que demonstraram a possível exclusão de *R. parkeri* em *A. maculatum* nos estados do Kansas e Oklahoma nos Estados Unidos, gerada por altas taxas de infecção, 47% e 73% respectivamente, de *Candidatus R. andeanae* nestas populações de *A. maculatum*. Corroborando com o proposto por Paddock et al. (2015), estudos conduzidos na Argentina e Chile onde 79,5% e 39%, respectivamente, dos *A. tigrinum* testados pela PCR estavam infectados por *Candidatus R. andeanae*, infecções por *R. parkeri* mais uma vez não foram evidenciadas nestas populações de ixodídeos (ABARCA et al., 2013; BOTTERO; TARRAGONA; NAVA, 2015).

O resultado mais expressivo do presente estudo em relação a epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira para o estado do Rio Grande do Sul, refere-se à primeira detecção molecular, aqui demonstrada, de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica infectando carrapatos *A. ovale* coletados na área endêmica para FMB no município de Cerro Largo, localizado na região noroeste do RS sobre a área de transição bioma Mata Atlântica-Pampa, Tabela 11. Esta cepa de riquetsia é comprovadamente um patógeno para humanos, agente de um quadro mais brande de FMB e devido sua distribuição vem sendo denominada de Febre Maculosa da Mata Atlântica (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011; KRAWCZAK et al., 2016c).

Rickettsia sp cepa Mata Atlântica já foi identificada em *A. ovale* em Belize e Colômbia; *A. dubitatum* na Argentina e *Amblyomma parvitarsum* na Argentina e Chile (LONDOÑO et al., 2014; MONJE et al., 2015; LOPES et al., 2016; OGRZEWSKA et al., 2016). No Brasil, esta cepa foi primeiramente identificada em um caso humano por Spolidorio et al. (2010). Szabó et al. (2013) isolaram pela primeira vez no país esta riquetsia de *A. ovale* coletados na Mata Atlântica de SP. Entretanto, *A. ovale* amostrados no Pantanal do Mato Grosso e na Mata Atlântica da Bahia, Paraná, Santa Catarina e São Paulo também já foram detectados através de técnicas moleculares (PCR) infectados com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (MEDEIROS et al., 2011;

BARBIERI et al., 2014; MELO et al., 2016b; NIERI-BASTOS et al., 2016; WITTER et al., 2016).

Dos 29 exemplares adultos de *A. ovale* coletados em Cerro Largo-RS, 23 estavam parasitando cães e seis foram amostrados da vegetação. A partir da PCR realizada em 26 destes carrapatos, analisando juntamente ixodídeos do ambiente e de cães, 15,4% (4/26) estavam infectados com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, sendo que as sequências do fragmento do gene *OmpA* foram 100% correspondentes ao depósito no *Genbank* KJ855085 (BARBIERI et al., 2014), de acordo com as Tabelas 11 e 14. A taxa de infecção evidenciada neste estudo é idêntica à observada por Melo et al. (2016b) em *A. ovale* oriundos de cães amostrados no Pantanal e muito próximo aos valores apresentados por Szabó et al. (2013) e Sabatini et al. (2010) onde 12,9% e 13,6%, respectivamente, dos *A. ovale* capturados de cães em área de Mata Atlântica, endêmicas para a Febre Maculosa da Mata Atlântica no estado de SP, estavam infectados com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. Porém, Barbieri et al. (2014) avaliando a taxa de infecção desta riquetsia em ixodídeos oriundos de cães habitando área endêmica para esta doença no estado de Santa Catarina, evidenciaram que somente 7,8% (6/77) destes carrapatos estavam infectados com a cepa Mata Atlântica.

R. bellii foi detectada em *I. loricatus* na Mata Atlântica e na área endêmica para FMB no RS, do modo que para ambas localidades o isolamento em cultivo celular desta espécie de riquetsia foi obtido com êxito, sendo estes os primeiros isolados de riquetsia oriundos do estado do Rio Grande do Sul, Tabelas 11 e 12.

R. bellii nomeada primariamente como cepa 369-C foi descrita na década de 80 por Philip et al. (1983) nos Estados Unidos, estando associada na oportunidade a ixodídeos e argasídeos, contemplando oito espécies de carrapatos: *Dermacentor andersoni*, *D. albipictus*, *D. occidentalis*, *D. parumapertus*, *D. variabilis*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Argas cooleyi*, *Ornithodoros concanensis*. Porém, até o momento esta bactéria é considerada não patogênica para animais e humanos (LABRUNA et al., 2004c; PAROLA et al., 2013).

Na América Latina, *R. bellii* tem sido encontrada em *I. loricatus*, *H. juxtakochi* e em 14 espécies do gênero *Amblyomma* (*A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. humerale*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. neumanni*, *A. nodosum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. rotundatum*, *A. sabanerae*, *A. scalpturatum*, *A. tigrinum* e *A. varium*) (LABRUNA et al., 2004a, 2004b, 2011; PACHECO et al., 2009; BARBIERI; ROMERO; LABRUNA, 2012; OGRZEWSKA et al.,

2012a; MCINTOSH et al., 2015). A ocorrência elevada de espécies do gênero *Amblyomma* infectadas com *R. bellii*, levou alguns autores a sugerir a existência de uma co-evolução simbiótica destas espécies (LABRUNA et al., 2004b). Entretanto, isolados de *R. bellii* na América Latina foram obtidos somente no Brasil de: *Amblyomma aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. ovale*, *H. juxtakochi*, *I. loricatus* e da Argentina em *A. neumanni* (HORTA et al., 2006; PINTER; LABRUNA, 2006; LABRUNA et al., 2007c, 2007d; PACHECO et al., 2008, 2009; SZABÓ et al., 2013).

Pulgas do gênero *Ctenocephalides* spp. foram coletadas de cães oriundos do fragmento de Mata Atlântica analisado no presente estudo e foram testadas pela PCR em 3 *pools*, todos eles foram positivos (dados não apresentados). Com o auxílio do sequenciamento de um fragmento do gene codificador da citrato sintase (*gltA*) foi possível observar que as sequências obtidas foram 100% idênticas com a sequência KJ569090 do *Genbank* de *Candidatus Rickettsia asemboensis* (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2016), de acordo com a Tabela 14. Esta é a primeira detecção desta riquetsia infectando pulgas no Brasil.

Candidatus Rickettsia asemboensis foi descrita recentemente, infectando pulgas em Asembo no oeste do Quênia (JIANG et al., 2013). Na América do Sul esta riquetsia foi constatada infectando 87,5% (7/8) de *Ctenocephalides felis* coletadas de cães no Equador e na Colômbia DNA de *Candidatus Rickettsia asemboensis* também foi identificado em *C. felis* (OTEO et al., 2014; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2016).

6.7 Sororreatividade frente a antígenos de riquetsias em pequenos mamíferos coletados na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS

A sorologia em pequenos mamíferos visando analisar a frequência de anticorpos frente a antígenos de riquetsias do GFM é uma ferramenta importante para as pesquisas em relação a epidemiologia das riquetsioses, fornecendo também informações para os serviços de vigilância. Uma vez que, além de pequenos mamíferos atuarem como hospedeiros de estágios imaturos de uma grande diversidade de espécies de carrapatos (SARAIVA et al., 2012), estes animais podem estar envolvidos na manutenção do ciclo enzoótico das riquetsias transmitidas por carrapatos, já que vários estudos sorológico realizados em pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos

evidenciaram nestes animais anticorpos reagentes a riquetsias pertencentes ao GFM (PENA et al., 2009; MILAGRES et al., 2010, 2013; DANTAS-TORRES et al., 2012; COELHO et al., 2016; MELO et al., 2016a). Neste sentido, algumas espécies como *D. aurita* e *E. russatus* foram apontadas como hospedeiros amplificadores competentes de riquetsias patogênicas para humanos em populações de carrapatos na natureza (HORTA et al., 2009; KRAWCZAK; LABRUNA, 2012).

Apesar da grande importância de estudos sorológicos para riquetsias em populações de pequenos mamíferos, menos de uma dezena de trabalhos neste sentido foram desenvolvidos no Brasil. Com exceção de um estudo realizado na Mata Atlântica do nordeste brasileiro (Pernambuco) todos os demais foram aplicados na Mata Atlântica de São Paulo e Minas Gerais (MG) e um relacionado ao bioma Cerrado de MG (HORTA et al., 2007; PENA et al., 2009; MILAGRES et al., 2010, 2013; DANTAS-TORRES et al., 2012; OGRZEWALSKA et al., 2012b; SZABÓ et al., 2013; SILVEIRA et al., 2015; COELHO et al., 2016; MELO et al., 2016a). Sendo assim, o presente estudo é a primeira investigação sorológica de riquetsias do GFM realizada em pequenos mamíferos no bioma Pampa e na Mata Atlântica na região Sul do Brasil.

Obtivemos 33,5% (55/164) dos pequenos mamíferos amostrados na Mata Atlântica (Parque Estadual do Turvo) sororreativos na RIFI, para riquetsias do GFM e *R. bellii*, já para a área endêmica, com características fitofisionômicas de Mata Atlântica (Cerro Largo), 40% (16/40) dos roedores e marsupiais amostrados foram soropositivos frente a pelo menos um dos seis antígenos estudados, assim como exposto nas Tabelas 4 e 5. No entanto apesar do percentual de animais soropositivos da área endêmica ter sido superior aos animais capturados na Mata Atlântica, sugerindo assim um maior contato com bioagentes pertencentes ao GFM dos pequenos mamíferos de Cerro Largo (área endêmica), estes valores não apresentaram diferença estatística ($p=0.51$).

Dantas-Torres et al. (2012) detectaram anticorpos reagentes frente a riquetsias em 68.8% (150/218) dos pequenos mamíferos coletados em um fragmento de Mata Atlântica em região não endêmica no nordeste brasileiro, valor este superior ao encontrado no presente estudo (33,5%). Fato este, que pode ser justificado pelo motivo de que na presente pesquisa 14,6% dos roedores e marsupiais da Mata Atlântica apresentavam algum grau de ixodidose (Tabela 9), já no estudo de Dantas-Torres et al. (2012), 32,9% dos animais estavam parasitados por carrapatos no momento das coletas.

Pena et al. (2009) avaliando pequenos mamíferos de área não endêmica na Mata Atlântica de Minas gerais observaram que 32% destes animais apresentavam anticorpos frente à riquetsias, resultado este que se assemelha muito ao evidenciado no presente estudo (33,5%). Contudo, demais estudos realizados em áreas consideradas não endêmicas ou de baixa endemicidade sobre fragmentos de Mata Atlântica nos estados de SP e MG, demonstram que a soropositividade para riquetsias do GFM em pequenos mamíferos destas áreas variou de 50 a 85% (HORTA et al., 2007; MILAGRES et al., 2013)

Em relação aos didelfídeos amostrados, observamos que 75% (3/4) dos *D. albiventris* capturados na área endêmica foram positivos na RIFI para riquetsias, onde 50% (2/4) apresentaram reação homóloga para *R. parkeri* (Tabela 5). Na Mata Atlântica 28,6% (2/7) dos soros de *D. aurita* foram positivos na RIFI para riquetsias e ambos também apresentaram reação homóloga para *R. parkeri* (Tabela 4). Quando analisamos somente a sorologia nos didelfídeos foi possível constatar que 75% destes animais foram positivos na área endêmica em contraste aos 28,6% de positivos encontrados na área não endêmica no fragmento de Mata Atlântica. Horta et al. (2007) demonstraram através da sorologia de didelfídeos amostrados em áreas endêmicas e não endêmicas para *R. rickettsii*, no estado de SP, que até 78,6% dos animais provenientes de áreas endêmicas foram positivos na RIFI para riquetsias pertencentes ao GFM, frente aos 50% de positivos oriundos da área não endêmica. Entretanto, Melo et al. (2016a) pesquisando anticorpos reagentes à *R. rickettsii* em gambás (*D. aurita* e *D. albiventris*) capturados em oito cidades do estado de São Paulo, cinco não endêmicas para FMB e 3 endêmicas, verificaram que 41% (9/22) dos animais oriundos de área não endêmica apresentavam anticorpos para *R. rickettsii* contra os 26,4% (23/87) dos soropositivos na área endêmica.

Estudos sorológicos em didelfídeos são relevantes para melhor entendermos a epidemiologia da FMB em determinadas áreas, visto que estes animais podem agir como hospedeiros amplificadores de espécies patogênicas de riquetsias para o homem, como *R. rickettsii* e *R. parkeri* nas populações de carrapatos, sendo também constantemente encontrados parasitados por carrapatos em áreas endêmicas para FMB e em muitas situações são os pequenos mamíferos que apresentam o maior grau de ixodidose na natureza (HORTA et al., 2009; SPONCHIADO et al., 2015).

Szabó et al. (2013) coletando pequenos mamíferos em áreas endêmicas para riquetsiose causada pela *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica constataram que 56% (28/50) do total de

pequenos mamíferos capturados foram soropositivos para pelo menos um dos cinco antígenos de riquetsia testados. Entretanto, em um estudo realizado em fragmentos de Mata Atlântica no estado de SP, comparando locais considerados áreas endêmicas e não endêmicas para FMB causada por *R. rickettsii*, Ogrzewalska et al. (2012b) demonstraram que contrariamente do que foi verificado na sorologia dos cães, uma maior positividade nos pequenos mamíferos amostrados nas áreas endêmicas em relação as não endêmicas não foi evidenciada. Os resultados supracitados, por outros autores, geram questionamentos e dúvidas em relação a interpretação dos percentuais de soropositivos para riquetsias do GFM nas populações de pequenos mamíferos silvestres, quando comparamos áreas endêmicas e não endêmicas, incitando assim a necessidade de mais estudos neste quesito, para assim melhor entendermos a real importância dos animais silvestres na manutenção do ciclo natural das riquetsias.

Em uma área endêmica para Febre Maculosa da Mata Atlântica no estado de SP, um estudo sugeriu que o roedor da espécie *E. russatus* estaria agindo como hospedeiro amplificador de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, em populações de *A. ovale*. Pois além deste roedor ter sido a espécie com maior número de captura entre os roedores, 30% (6/20) dos animais estavam infestados por imaturos de *A. ovale* e ainda 29,4% (5/17) foram positivos na RIFI para pelo menos um dos antígenos de riquetsia testados do GFM, onde três destes apresentaram reação homóloga para *R. parkeri*, assim como já mencionado a cepa Mata Atlântica está filogeneticamente próxima à *R. parkeri* (SPOLIDORIO et al., 2010; SZABÓ et al., 2013). Krawczak e Labruna (2012) demonstraram que *E. russatus* pode agir como hospedeiro amplificador de *Rickettsia* sp cepa Mata Atlântica no *A. ovale*. Neste mesmo sentido, notamos que o roedor da espécie *A. montensis* foi o mais frequente na área endêmica para FMB no RS, e 44,8% (13/29) destes roedores foram soropositivos para pelo menos um dos seis antígenos de riquetsias empregados na RIFI e além disto 14% (4/29) estavam infestados por imaturos de *A. ovale* (Tabela 10), dentre as três espécies de roedores capturadas na área (*A. montensis*, *S. angouya* e *O. nigripes*) somente *A. montensis* estava parasitado por carrapatos. Portanto, sugerimos que assim como *E. russatus* na Mata Atlântica de SP, *A. montensis* pode estar agindo como hospedeiro amplificador de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica no *A. ovale* no estado do RS. Porém estudos são necessários para comprovar a veracidade desta hipótese aqui observada.

No Parque Estadual do Espinilho, fragmento do Pampa aqui estudado, somente 2,9% (1/34) dos pequenos mamíferos capturados apresentaram anticorpos que reagiram somente para

R. rickettsii e *R. rhipicephali*. Curiosamente o animal que reagiu positivamente na RIFI pertencia a espécie *C. aperea* e foi coletado de forma fortuita da boca de um cão que caçava dentro do perímetro do parque. Já Coelho et al. (2016) em uma área do Cerrado, bioma este que mais se assemelha ao Pampa, detectaram a partir da RIFI que 16,8% (70/416) dos pequenos mamíferos coletados apresentavam anticorpos reativos para pelo menos um dos antígenos do GFM e/ou *R. bellii* testados.

A baixa frequência de animais soropositivos frente a antígenos de riquetsias para o fragmento do Pampa, aqui analisado, pode ser atribuída ao fato de que na área estudada a ixodidose seja muito baixa nas populações de pequenos mamíferos, fato que evidenciamos no momento das coletas onde nenhum pequeno mamífero do Pampa foi encontrado parasitado por carrapatos, assim como discutido no item 6.3. Justificando assim a baixa frequência de animais soropositivos para riquetsias do GFM encontrada nos pequenos mamíferos coletados no bioma Pampa. Corroborando com isto, podemos citar o estudo de Coelho et al. (2016), realizado no Cerrado, onde 16,8% (70/416) dos pequenos mamíferos foram sororreagentes para antígenos de riquetsias, porém no mesmo trabalho os autores constataram que 11,5% (48/416) dos pequenos mamíferos estavam parasitados por ixodídeos.

6.8 Sororreatividade frente a antígenos de riquetsias em cães coletados em fragmentos dos biomas Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS

Nas Américas uma das primeiras correlações no uso de cães como sentinelas para Febre Maculosa (FM) foi apontada no estudo de Shepard e Topping (1946), os autores observaram altos títulos para riquetsias na sorologia de cães em áreas sabidamente endêmicas para FM nos Estados Unidos. Desde então, nos EUA outros estudos têm indicado que o cão pode ser usado como sentinela de FM para populações humanas, sugerindo que FM em cães podem premeditar casos humanos. Portanto a sorologia em populações caninas serviria de alerta à população humana em relação a circulação de bioagentes transmitido por carrapatos na área (PADDOCK et al., 2002; NICHOLSON et al., 2010).

Rickettsia conorii agente da Febre Maculosa do Mediterrâneo também conhecida como Febre Botonosa ou ainda Febre Maculosa Israelense, que têm como principal vetor o *R.*

sanguineus, pode usar o cão como um reservatório, já que recentemente Levin, Killmaster e Zemtsova (2012) demonstraram que cães são capazes de se infectar com *R. conorii* a partir da picada de carrapatos *R. sanguineus* infectados, atuando também como fonte de infecção desta riquetsia para populações de *R. sanguineus* não infectadas. Demonstrando assim pela primeira vez que os cães atuam como reservatórios competentes de *R. conorii*.

Magalhães (1957) no Brasil sugeriu pela primeira vez a importância do cão na epidemiologia do tifo exantemático neotrópico do Brasil, assim como era chamada a FMB na época. Desde então outros autores sugerem que o cão possa ser usado, em determinadas situações, como sentinela para FMB servindo de alerta para os sistemas de vigilância e estimulando atitudes na prevenção de casos humanos, já que em algumas circunstâncias cães e seus ectoparasitas são responsáveis pela manutenção do ciclo enzoótico peridomiciliar de *Rickettsia* spp., onde o cão assume o papel de transportador de carrapatos possivelmente infectados do ambiente natural (mata) para dentro das habitações humanas (GAZETA et al., 2009; OGRZEWALSKA et al., 2012b; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

Rozental et al. (2015) propõem pela primeira vez que a FMB possa ser uma doença de caráter ocupacional, pois a proximidade do homem com animais infestados com carrapatos aumentaria o risco de casos de FMB. Neste mesmo estudo os autores verificaram através da sorologia que 97,5% (114/117) dos cães residentes de um abrigo de animais na cidade do Rio de Janeiro, local onde cinco funcionários tinham vindo a óbito com diagnóstico de FMB, apresentavam anticorpos frente à *R. rickettsii*. Alertando assim, para a importância do controle de carrapatos em canis, abrigo de animais, *pet shops* e clínicas veterinárias visando a manutenção do bem-estar e integridade física dos funcionários que trabalham nestes setores.

Diversos estudos sorológicos buscando analisar a frequência de anticorpos frente a antígenos de riquetsias do GFM têm sido realizados em cães no Brasil, abrangendo áreas endêmicas e não endêmicas, estudos já foram realizados em cães que habitavam áreas dos biomas, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal ou seja todos os biomas no país já foram estudados (LABRUNA et al., 2007a; SAITO et al., 2008; GAZETA et al., 2009; MELO et al., 2011a; OGRZEWALSKA et al., 2012b; BARBIERI et al., 2014; SOARES et al., 2014; ARAES-SANTOS et al., 2015; COSTA et al., 2015; SILVEIRA et al., 2015).

Piranda et al. (2008) inoculando *R. rickettsii* cepa Taiaçu (PINTER; LABRUNA, 2006) em cães, verificaram que os mesmos mantiveram uma estabilidade na resposta imunológica por

no mínimo seis meses, neste período títulos de anticorpos ≥ 2048 foram detectados a partir da RIFI frente à *R. rickettsii*. Um experimento semelhante foi realizado nos Estados Unidos, onde *R. rickettsii* cepa Sheila Smith foi inoculada em cães da raça Beagle, sendo que os autores verificaram que os cães apresentaram anticorpos detectáveis pela RIFI até um ano após a primoinfecção e notaram que esta imunidade foi capaz de proteger os cães frente a uma reexposição a *R. rickettsii* (KEENAN et al., 1977). Entretanto não existe nenhum estudo que determinou por quanto tempo (superior a um ano) anticorpos seriam detectáveis no soro de cães após uma infecção primária com riquetsias.

Diante do acima exposto, o que demonstra a extrema importância da realização da sorologia de cães para riquetsias do GFM, realizamos a RIFI frente a seis antígenos de riquetsias do soro de cães coletados em fragmentos de Mata Atlântica e Pampa não endêmicos para FMB e uma área de transição entre os biomas considerada endêmica para FMB no RS, como demonstrado na Figura 4. Sendo assim, verificamos que 8,3% (3/36), 13,9 (5/36) e 20,4 (28/137) dos cães amostrados na Mata Atlântica, Pampa e área endêmica, respectivamente, foram sororreativos para pelo menos um dos seis antígenos avaliados (Tabela 6). Apesar da área endêmica ter apresentado um percentual superior de cães soropositivos, em relação as demais áreas, diferença estatisticamente significativa analisando a positividade entre os cães das áreas estudadas não foi evidenciada ($P = 0.1496$).

Labruna et al. (2007a) e Soares et al. (2014) realizando RIFI de soros de cães coletados em áreas rurais e urbanas no bioma Amazônia, detectaram que de 3 a 11,6% dos cães foram soropositivos frente a antígenos de riquetsias. Em área também não endêmica sobre o bioma Cerrado, no Maranhão, Costa et al. (2015) constataram que 18,9% (61/322) dos cães foram positivos na RIFI para riquetsias. Na Caatinga sobre o estado de Pernambuco e Bahia mais uma vez em áreas consideradas não endêmicas para FMB, uma análise através da sorologia de 504 soros de cães frente a antígenos de riquetsias pertencentes ao GFM, constatou que 12,1% (61/504) destes animais haviam tido contato com alguma espécie de riquetsia (ARAES-SANTOS et al., 2015). Já em um estudo realizado em duas cidades consideradas áreas de baixa endemicidade para FMB, sobre a Mata Atlântica de Minas Gerais, foi encontrado uma frequência de 8,33 a 20,9% de anticorpos reagentes a antígenos de riquetsia nas populações de cães pesquisadas (MILAGRES et al., 2010). Sobre a Mata Atlântica do estado do Paraná em região

não endêmica para FMB 2,7% (2/73) do soro de cães expostos a antígenos de riquetsias do GFM foram positivos na RIFI.

Estudos comparando a frequência de anticorpos para riquetsias do GFM entre áreas endêmicas e não endêmicas para *R. rickettsii*, em fragmentos da Mata Atlântica e Cerrado, em cães amostrados no estado de SP, evidenciaram que nas áreas não endêmicas o percentual de animais soropositivos variou de 0 a 20%, já para áreas endêmicas a soropositividade encontrada nos cães foi de 20 a 69,2% (HORTA et al., 2004, 2007; SANGIONI et al., 2005; OGRZEWALSKA et al., 2012b). Apesar de não termos encontrado diferenças estatísticas no presente estudo entre as áreas avaliadas, nossos resultados onde cães da área endêmica apresentaram um percentual superior de soropositivos em relação as áreas não endêmicas corroboram com os estudos anteriormente citados.

Entre os 20,4% dos cães soropositivos na área endêmica, frente aos antígenos de riquetsia analisados, 57,1% (16/28) apresentaram reação homóloga para *R. parkeri* (Tabela 6), o que corresponde com a infecção de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica detectada nos *A. ovale* desta área, assim como já mencionada a cepa Mata Atlântica está filogeneticamente próxima de *R. parkeri*. Deste modo, cabe destacar que *A. ovale* foi a única espécie de carrapato encontrada parasitando cães na área endêmica e este ixodídeo é incriminado como vetor de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica no Brasil (SPOLIDORIO et al., 2010; KRAWCZAK et al., 2016a).

Szabó et al. (2013) e Barbieri et al. (2014) demonstraram que 88,6% e 67,3%, respectivamente, de cães amostrados em áreas endêmicas para Febre Maculosa da Mata Atlântica, nos estados de SP e SC, foram soropositivos para riquetsias do GFM. Apesar destes resultados terem sido superiores aos 20,4% de positividade detectada nos soros dos cães coletados no presente estudo, nenhum deles superou o percentual de 57,1% de homologia para *R. parkeri* entre os animais soropositivos, assim como evidenciado na presente análise, pois Szabó et al. (2013) detectaram 25% (7/28) dos cães oriundos da área de SP com homologia para *R. parkeri*, já Barbieri et al. (2014) em SC observaram homologia para esta mesma riquetsia em 42,8% (15/35) dos animais soropositivos.

Nossos resultados corroboram com um estudo que amostrou cães exatamente na mesma área endêmica (Cerro Largo-RS), aqui estudada, logo após um caso de Febre Maculosa ter sido comprovado na área, os autores constataram que 22,3% (6/27) dos cães apresentavam anticorpos para riquetsias do GFM, na ocasião homologia para *R. parkeri* também foi observada em 33,3%

(2/6) dos positivos, destacando que o intervalo entre as coletas do presente estudo e o anterior foi de seis anos (SANGIONI et al., 2011).

Saito et al. (2008) amostrando soro de cães em 33 áreas, de 10 cidades, no bioma Pampa, observaram que 42,4% (165/389) dos animais possuíam anticorpos frente a antígenos de riquetsias e destes 60,6% (100/165) evidenciaram reação homóloga para *R. parkeri*. No presente estudo 13,9% (5/36) dos cães oriundos do Pampa foram positivos na RIFI frente a antígenos de riquetsias, dos quais 80% (4/5) apresentaram reação homóloga para *R. parkeri*, entretanto *R. parkeri* e *Rickettsia* sp. Mata Atlântica não foram detectadas infectando carrapatos na área.

Arrais (2013) analisando soros de lobos-guará obteve resultados semelhantes aos observados no presente estudo, onde muitos animais com sorologia positiva para riquetsias apresentaram reação homóloga para *R. parkeri* porém a população de *A. tigrinum* encontrada parasitando estes animais estava infectada com *Candidatus R. andeanae*, indicando assim uma possível reação cruzada na sorologia entre estas duas bactérias.

Interessantemente em área não endêmica para FMB no Pantanal do Mato Grosso, Melo et al. (2011a) observaram que 47,5% (152/320) dos cães coletados foram soropositivos frente a antígenos de riquetsias, contrariando os resultados encontrados nos estudos supracitados, em que regiões não endêmicas para FMB demonstraram baixa prevalência de anticorpos frente a antígenos de riquetsias. Porém esta soropositividade elevada encontrada no estudo de Melo et al. (2011a) pode ser justificada pelo fato de que os cães neste estudo estavam constantemente parasitados por *A. sculptum*, na mesma área de estudo ixodídeos desta espécie tem sido encontrados infectados com *Candidatus R. amblyommii* (MELO et al., 2016b), o que corresponde com a sorologia evidenciada por Melo et al. (2011a), pois quando o soro dos cães coletados naquele estudo foram expostos ao antígeno de *Candidatus R. amblyommii* altos títulos foram observados. Diante deste fato, ressaltamos que a interpretação de estudos soroepidemiológicos em cães para riquetsias do GFM devem ser cuidadosamente analisados, levando sempre em consideração a ixodofauna existente na área, as espécies de riquetsias circulantes nestas populações de carrapatos e as características ambientais da área, fatores bióticos e abióticos devem ser analisados, evitando assim um possível equívoco na interpretação dos dados, pois se não visualizarmos os resultados com uma visão holística certamente cometeremos erros de interpretação.

7 CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

A partir dos resultados adquiridos no presente estudo é possível concluir que:

- *Candidatus R. andeanae*, *Candidatus R. amblyommii*, *R. bellii*, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e *R. rhipicephali* foram detectadas pela primeira vez no RS.
- *A. brasiliense* foi detectado pela primeira vez infectado com riquetsia, na ocasião detectamos *Candidatus R. amblyommii* infectando esta espécie de ixodídeo.
- Foi descrito *A. yucumense*, como uma nova espécie de ixodídeo.
- Pela primeira vez foi encontrada uma riquetsia infectando *A. yucumense*, *R. rhipicephali* estava infectando esta espécie de carrapato.
- *Candidatus R. asemboensis* foi descrita pela primeira vez infectando pulgas do gênero *Ctenocephalides* no Brasil.
- *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica é o provável agente dos casos de FMB para o estado do Rio Grande do Sul.
- *R. bellii* foi isolada pela primeira vez de carrapatos coletados no estado do Rio Grande do Sul.
- *Rickettsia* spp. está (ou esteve) circulando numa prevalência $\geq$ a 10% na população de cães amostrados na Mata Atlântica e Pampa.
- A frequência de anticorpos frente à *Rickettsia* spp. nos cães da área endêmica foi de 20,4%.
- Pequenos Mamíferos dos fragmentos de Mata Atlântica, Pampa e área endêmica para FMB no RS estão ou estiveram expostos a bactérias do gênero *Rickettsia*, sinalizando que estes animais foram espoliados por ectoparasitas infectados por estes bioagentes.

REFERÊNCIAS

- ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; LEPE, P.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. A Third Amblyomma Species and the First Tick-Borne Rickettsia in Chile. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 219–222, 2012.
- ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; MARTÍNEZ-VALDEBENITO, C. Identificación de Rickettsia andeanae en dos regiones de Chile. **Revista Chilena de Infectología**, v. 30, n. 4, p. 388–394, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.cl/pdf/rci/v30n4/art06.pdf>>. Acesso em: 1 jul. 2016.
- ALBUQUERQUE, E. P. Considerações sobre a necessidade de Pesquisa em Conservação biológica nos parques estaduais do Rio Grande do Sul. **Roessléria**, v. 7, n. 3, p. 200–205, 1985.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic Local Alignment Search Tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403–410, 1990.
- ANGERAMI, R. N.; DA SILVA, A. M. R.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S.; WADA, M. Y.; DOS SANTOS, F. C. P.; MANCINI, D. M.; DE OLIVEIRA, R. C.; KATZ, G.; MARTINS, E. C.; DA SILVA, L. J. Brazilian spotted fever: Two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. p. 207–208, 2009. Supplement, 2. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02160.x>>. Acesso em: 25 out. 2013.
- APPERSON, C. S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W. L.; MEAD, D. G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M. J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, D. W. Tick-Borne Diseases in North Carolina: Is “Rickettsia amblyommii” a Possible Cause of Rickettsiosis Reported as Rocky Mountain Spotted Fever? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 5, p. 597–606, 2008. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2007.0271>>. Acesso em: 25 out. 2013.
- ARAES-SANTOS, A. I.; MORAES-FILHO, J.; PEIXOTO, R. M.; SPOLIDORIO, M. G.; AZEVEDO, S. S.; COSTA, M. M.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. Ectoparasite Infestations and Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in a Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 11, p. 645–51, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26565771>>. Acesso em: 18 abr. 2016.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. IX. O complexo ovale do gênero Amblyomma. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 131–148, 1961.
- ARAUJO, R. N.; FRANCO, P. F.; RODRIGUES, H.; SANTOS, L. C. B.; MCKAY, C. S.; SANHUEZA, C. A.; BRITO, C. R. N.; AZEVEDO, M. A.; VENUTO, A. P.; COWAN, P. J.; ALMEIDA, I. C.; FINN, M. G.; MARQUES, A. F. Amblyomma sculptum tick saliva: α -Gal identification, antibody response and possible association with red meat allergy in Brazil.

International Journal for Parasitology, v. 46, n. 3, p. 213–220, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0020751916000060>>. Acesso em: 14 jun. 2016.

ARRAIS, R. C. **Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do parque nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, bras.** 2013. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2013. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10134/tde-17072014-113127/pt-br.php>>. Acesso em: 1 jul. 2016.

ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 623–632, 2005.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 179–186, 1998.

BARBIERI, A. R. M.; FILHO, J. M.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOUZA, J. C.; SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 848–853, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.010>>. Acesso em: 15 maio. 2015.

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.

BARBIERI, J. M.; ROCHA, C. M. B. M. da; BRUHN, F. R. P.; CARDOSO, D. L.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Altitudinal Assessment of *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), Vectors of Spotted Fever Group Rickettsiosis in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 5, p. 1170–1174, 2015.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical**. São Paulo-SP: Butantan, 2006.

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; LUZ, H. R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V. C.; FAMADAS, K. M. *Ornithodoros faccinni* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 268, 2015. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/8/1/268>>. Acesso em: 6 mar. 2016.

BERMÚDEZ C, S. E.; CASTRO, A.; ESSER, H.; LIEFTING, Y.; GARCÍA, G.; MIRANDA, R. J. Ticks (Ixodida) on humans from central Panama, Panama (2010-2011). **Experimental & Applied Acarology**, v. 58, n. 1, p. 81–8, set. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22544074>>. Acesso em: 23 jul. 2012.

BERMÚDEZ, C. S. E.; ZALDÍVAR, a Y.; SPOLIDORIO, M. G.; MORAES-FILHO, J.; MIRANDA, R. J.; CABALLERO, C. M.; MENDOZA, Y.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. **Veterinary Parasitology**, v. 177, n. 1-2, p. 134–8, 19 abr. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21144663>>. Acesso em: 17 out. 2012.

BERMÚDEZ, S. E.; CASTRO, A. M.; TREJOS, D.; GARCÍA, G. G.; GABSTER, A.; MIRANDA, R. J.; ZALDÍVAR, Y.; PATERNINA, L. E. Distribution of Spotted Fever Group Rickettsiae in Hard Ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments (2007–2013). **EcoHealth**, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10393-016-1118-8>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

BERMUDEZ, S. E.; EREMEEVA, M. E.; KARPATY, S. E.; SAMUDIO, F.; ZAMBRANO, M. L.; ZALDIVAR, Y.; MOTTA, J. A.; DASCH, G. A. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in Eastern Panama. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 4, p. 856–861, 2009. Disponível em: <http://esa.publisher.ingentaconnect.com/content/esa/jme/2009/00000046/00000004/art00018\http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=caba6&AN=20093314264\http://ucelinks.cdlib.org:8888/sfx_local?sid=OVID:cabadb&issn=0022-2585&isb>. Acesso em: 25 out. 2014.

BIANCHIN, J. F. Mastofauna não-voadora do Parque Estadual do Espinilho, Barra do Quaraí, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista da Graduação**, v. 4, n. 1, p. 1–66, 2011. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/graduacao/article/view/8839/6191>>. Acesso em: 15 abr. 2016.

BILLETER, S. A.; BLANTON, H. L.; LITTLE, S. E.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Detection of “Rickettsia amblyommii” in Association with a Tick Bite Rash. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 607–610, 2007. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2007.0121>>. Acesso em: 28 jun. 2015.

BIOMATTERS DEVELOPMENT TEAM. **Geneious**, 2016. . Disponível em: <www.geneious.com>. Acesso em: 18 jun. 2016

BLAIR, P. J.; JIANG, J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; MENDOZA, L.; VILLASECA, P.; SUMNER, J. W.; RICHARDS, A. L.; OLSON, J. G. Characterization of Spotted Fever Group Rickettsiae in Flea and Tick Specimens from Northern Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4961–4967, 2004.

BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; ANDREA, P. S. **Guia dos roedores do brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. 120 p. Rio de Janeiro: 2008.

BOTTERO, M. N. S.; TARRAGONA, E. L.; NAVA, S. Spotted Fever Group Rickettsiae in

Amblyomma ticks likely to infest humans in rural areas from northwestern Argentina. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 75, p. 391–395, 2015.

BRASIL. **Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2016.** Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2016/abril/27/tabela-casos-febre-maculosa-2016.pdf>>. Acesso em: 31 maio. 2016a.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente Pampa.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/pampa>>. Acesso em: 30 maio. 2016b.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente Mata Atlântica.** Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em: 30 maio. 2016c.

BRITES-NETO, J.; MARIA DUARTE RONCATO, K.; MARTINS, T. F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 301–315, 2015.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. A technique for detection of rickettsiae in ticks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 6, p. 1010–1014, 1970.

BURGDORFER, W.; SEXTON, D. J.; GERLOFF, R. K.; ANACKER, R. L.; PHILIP, R. N.; THOMAS, L. A. Rhipicephalus sanguineus: vector of a new spotted fever group rickettsia in the United States. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 1, p. 205–210, 1975.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias en Mexico. **Revista Inst Salubr Enferm Trop**, v. 8, p. 3–14, 1947.

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. Characterization of Rickettsia spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495–501, 2006.

CARTER, C.; YAMBEM, O.; CARLSON, T.; HICKLING, G. J.; COLLINS, K.; JACEWICZ, M.; TSAO, J. W. Male tick bite: A rare cause of adult tick paralysis. **Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation**, v. 3, n. 4, p. e243–e243, 2016. Disponível em: <<http://nn.neurology.org/cgi/doi/10.1212/NXI.0000000000000243>>. Acesso em: 27 jun. 2016.

CASTRO D, A. M.; GARCÍA S, G. G.; DZUL-ROSADO, K.; AGUILAR, A.; CASTILLO, J.; GABSTER, A.; TREJOS, D.; ZAVALA-CASTRO, J.; BERMÚDEZ C, S. E. Questing Amblyomma mixtum and Haemaphysalis juxtakochi (Acari: Ixodidae) infected with Candidatus “Rickettsia amblyommii” from natural environmental in Panama Canal Basin, Panama. **Tropical Medicine and Health**, v. 43, n. 4, p. 217–222, 2015. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/tmh/advpub/0/advpub_2015-07/_article>. Acesso em: 18 fev. 2016.

COELHO, M. G.; RAMOS, V. D. N.; LIMONGI, J. E.; DE LEMOS, E. R. S.; GUTERRES, A.; DA COSTA NETO, S. F.; ROZENTAL, T.; BONVICINO, C. R.; D'ANDREA, P. S.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 03, p. 275–282, 2016. Disponível em: <<http://www.jidc.org/index.php/journal/article/view/7084>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

COLOMBO, A. F.; JOLY, C. A. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3 Suppl, p. 697–708, 2010.

COSTA, A. P. da; COSTA, F. B.; LABRUNA, M. B.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; SOARES, J. F.; SPOLIDORIO, M. G.; GUERRA, R. de M. S. N. de C. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 28–35, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25909250>>. Acesso em: 18 mar. 2016.

COSTA-JUNIOR, L. M.; REMBECK, K.; MENDONÇA, F. L. D. M.; AZEVEDO, S. C.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Occurrence of ectoparasites on dogs in rural regions of the state of Minas Gerais, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 21, n. 3, p. 237–242, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23070433>>. Acesso em: 18 set. 2015.

COSTA, L. P.; LEITE, Y. L. R.; MENDES, S. L.; DITCHFIELD, A. D. Conservação de mamíferos no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 103–112, 2005.

COUTO, D. V.; FILHO, G. H.; BARBOSA, A. B.; MEDEIROS, M. Z.; DE LIMA, A. M.; VICARI, C. F. S. Brazilian Spotted Fever : the importance of dermatological signs for early diagnosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 2, p. 248–250, 2015.

CUNHA, A. S.; SANTOS, J. F.; BALESTRIN, R. F.; FONTE, L. F. M.; LEONARDI, S. B.; PEREIRA, M. S.; PETERS, F. .; ROTH, R. **Relatório da quinta campanha de monitoramento da fauna terrestre no período pré-enchimento na área de influência da uhe são josé**. Porto Alegre: 2009.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 25, p. 1–17, 2008. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1186/1756-3305-1-25>>. Acesso em: 25 out. 2013.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v. 3, 2010. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2857863&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 20 jul. 2013.

DANTAS-TORRES, F.; ALÉSSIO, F. M.; SIQUEIRA, D. B.; MAUFFREY, J.-F.; MARVULO, M. F. V.; MARTINS, T. F.; MORAES-FILHO, J.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; LABRUNA, M. B.; SILVA, J. C. R. Exposure of small mammals to ticks and rickettsiae in Atlantic Forest patches in the metropolitan area of Recife, North-eastern Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 01, p. 83–91, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437–46, out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22902521>>. Acesso em: 21 mar. 2013.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64–67, 2006.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 587–594, 2005.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. **American Journal Tropical Medicine**, v. 19, p. 103–108, 1939.

EREMEEVA, M. E.; ZAMBRANO, M. L.; ANAYA, L.; BEATI, L.; KARPATY, S. E.; SANTOS-SILVA, M. M.; SALCEDA, B.; MACBETH, D.; OLGUIN, H.; DASCH, G. A.; ARANDA, C. A. Rickettsia rickettsii in Rhipicephalus ticks, Mexicali, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 418–421, 2011. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/content/48/2/418>>. Acesso em: 9 jun. 2016.

ESPEJO-ARENAS, E.; RAOULT, D. First Isolates of Rickettsia conorii in Spain Using a Centrifugation-Shell Vial Assay. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 6, p. 1158–1159, 1989.

ESTRADA-PENÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental & Applied Acarology**, v. 23, n. 9, p. 685–715, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10581710>>. Acesso em: 17 abr. 2016.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453–70, 2000. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10904399>>. Acesso em: 13 jan. 2014.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; FORERO-BECERRA, E.;

CORTÉS-VECINO, J. A.; ESCANDÓN, P.; RODAS, J. D.; PALOMAR, A. M.; PORTILLO, A.; OTEO, J. A.; HIDALGO, M. Molecular Evidence of Different Rickettsia Species in Villeta, Colombia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 16, n. 2, p. 85–87, fev. 2016. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/10.1089/vbz.2015.1841>>. Acesso em: 21 jun. 2016.

FERRARI, F. A. G.; GODDARD, J.; MORARU, G. M.; SMITH, W. E. C.; VARELA-STOKES, A. S. Isolation of “Candidatus Rickettsia andeanae” (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Embryonic Cells of Naturally Infected Amblyomma maculatum (Ixodida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 1118–1125, 2013. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/content/50/5/1118.abstract>>. Acesso em: 10 maio. 2016.

FIGUEIREDO, F. C. B. **Rickettsias isoladas em portugal: contribuição para a identificação e classificação de estirpe**. Tese (Doutorado) Universidade de Évora, Portugal, 1996. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/10174/11716>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

FLORES-MENDOZA, C.; FLORIN, D.; FELICES, V.; POZO, E. J.; GRAF, P. C. F.; BURRUS, R. G.; RICHARDS, A. L. Detection of Rickettsia parkeri from within Piura, Peru, and the first reported presence of Candidatus Rickettsia andeanae in the tick Rhipicephalus sanguineus. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 7, p. 505–508, 2013. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3700472&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 mar. 2016.

FRIEDHOFF, K. T. Interaction between parasite and tick vector. **International Journal for Parasitology**, v. 20, n. 4, p. 525–535, 1990.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica; período 1995-2000**. São José dos Campos: INPE, 2003

GALVANI, F. R.; BAPTISTA, L. R. de M. Flora do Parque Estadual do Espinilho – Barra do Quaraí /RS. **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária Agronomia Uruguiana**, v. 10, n. 1, p. 42–62, 2003.

GAZETA, G. S.; SOUZA, E. R.; ABBOUD-DUTRA, A. E.; AMORIM, M.; BARBOSA, P. R.; ALMEIDA, A. B.; GOMES, V.; GEHRKE, F. S.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. Potential vectors and hosts of rickettsia spp: Epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 269–270, 2009. Supplement, 2. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02230.x>>. Acesso em: 18 jun. 2016.

GIMENEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135–140, 1964.

GRAY, J.; DANTAS-TORRES, F.; ESTRADA-PEÑA, A.; LEVIN, M. Systematics and ecology of the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p.

171–180, abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23415851>>. Acesso em: 21 ago. 2013.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C. A.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841–5, dez. 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; VENZAL, J. M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J. E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273–288, maio 2003. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304401703000839>>. Acesso em: 5 nov. 2012.

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-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83–100, jan. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17103085>>. Acesso em: 25 set. 2012.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Rodents Of The Subfamily Caviinae (Hystricognathi, Caviidae) As Hosts For Hard Ticks (Acari: Ixodidae). **Mastozoología Neotropical**, v. 17, n. 2, p. 279–286, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0327-93832010000200003&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 25 set. 2012

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PENÁ, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of a valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1–28, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1025381712339>>. Acesso em: 03 set. 2012

HOOGSTRAAL, H. Ticks in Relation To Human Diseases. **Annual Review of Entomology**, v. 12, p. 377–420, 1967. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971214015537>>. Acesso em: 01 set. 2015

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 793–801, nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094887>>. Acesso em: 10 out. 2014.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.;

GALVÃO, M. A M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever gro. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93–97, jul. 2004. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15238696>>. Acesso em: 30 set. 2015.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 109–118, 2009. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2008.0114>>.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. Natural infection, transovarial transmission, and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the Tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 285–90, out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114723>>. Acesso em: 6 dez. 2012.

HORTA, M. M. C.; SABATINI, G. S. G.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWSKA, 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 (Larchmont, N.Y.)**, v. 10, n. 10, p. 959–967, 2010. Disponível em:

<<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/vbz.2009.0149>>. Acesso em: 5 dez. 2012.

HUN, L.; TROYO, A.; TAYLOR, L.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. First report of the isolation and molecular characterization of *Rickettsia amblyommii* and *Rickettsia felis* in Central America. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 10, p. 1395–7, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21612539>>. Acesso em: 6 maio. 2016.

IB-FLORESTAS. **Instituto Brasileiro de Florestas-Bioma Mata Atlântica**. Disponível em: <<http://www.ibflorestas.org.br/bioma-mata-atlantica.html>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- Censo 2010 População Urbana e Rural**. Disponível em: <<http://www.censo2010.ibge.gov.br/sinopse/index.php?dados=8>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística: População do Rio Grande do Sul, 2015**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs>>. Acesso em: 10 jul. 2016a.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- Cidades: Barra do Quaraí- RS.**

Disponível em:

<<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=430187&search=rio-grande-do-sul|barra-do-quarai>>. Acesso em: 30 maio. 2016b.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- Cidades: Derrubadas-RS.** Disponível

em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codmun=430632&search=rio-grande-do-sul|derrubadas>>. Acesso em: 30 maio. 2016c.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- Cidades: Cerro Largo-RS.** Disponível

em: <<http://cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?codmun=430520>>. Acesso em: 30 maio. 2016d.

JIANG, J.; MAINA, A. N.; KNOBEL, D. L.; CLEAVELAND, S.; LAUDISOIT, A.; WAMBURU, K.; OGOLA, E.; PAROLA, P.; BREIMAN, R. F.; NJENGA, M. K.; RICHARDS, A. L. Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia Asembiensis* in Fleas from Human Habitats, Asembo, Kenya. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 8, p. 550–558, 2013. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23675818>><http://online.liebertpub.com/doi/pdfplus/10.1089/vbz.2012.1123>>. Acesso em: 17 jul. 2014

KASPER, C. B.; MAZIM, F. D.; SOARES, J. B. G.; OLIVEIRA, T. G. de; FABIÁN, M. E. Composição e abundância relativa dos mamíferos de médio e grande porte no Parque Estadual do Turvo, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 24, n. 4, p. 1087–1100, 2007.

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C.; HUXSOLL, D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K.; CAMPBELL, J. M.; STEPHENSON, E. H. Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 135, n. 6, p. 911–917, 1977. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/405432>>. Acesso em: 5 jul. 2016.

KRAWCZAK, F. S.; AGOSTINHO, W. C.; POLO, G.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Comparative evaluation of *Amblyomma ovale* ticks infected and noninfected by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, the agent of an emerging rickettsiosis in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 502–507, 2016a. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X16300218>>. Acesso em: 8 mar. 2016.

KRAWCZAK, F. S.; BINDER, L. C.; OLIVEIRA, C. S.; COSTA, F. B.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; SPONCHIADO, J.; MELO, G. L.; GREGORI, F.; POLO, G.; OLIVEIRA, S. V.; LABRUNA, M. B. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 69, n. 5, 2016b. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/s10493-016-0070-1>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B. The rice rat *Euryoryzomys russatus*, an amplifier host of

Rickettsia parkeri to *Amblyomma ovale* ticks. In: FAMERP-UTMB: Emerging infections in the Americas- common interests and collaboration between Brazil and USA, São José do Rio Preto. **Anais**. São José do Rio Preto: 2012.

KRAWCZAK, F. S.; MARTINS, T. F.; OLIVEIRA, C. S.; BINDER, L. C.; COSTA, F. B.; NUNES, P. H.; GREGORI, F.; LABRUNA, M. B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, p. 28–37, 2015. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jme/tju007>>. Acesso em: 6 out. 2015.

KRAWCZAK, F. S.; MUNOZ-LEAL, S.; GUZTAZAKY, A. C.; OLIVEIRA, S. V.; SANTOS, F. C. P.; ANGERAMI, R. N.; MORAES-FILHO, J.; DE SOUZA, J. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest Infection in a Patient from a Spotted Fever-Endemic Area in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, 2016c. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/cgi/doi/10.4269/ajtmh.16-0192>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

KRAWCZAK, F. S.; NIERI-BASTOS, F.; 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, p. 7, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3892071&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 1 fev. 2015.

KRINSKY, W. L. Dermatoses associated with the bites of mites and ticks (Arthropoda: Acari). **International Journal of Dermatology**, v. 22, p. 75–91, 1983.

KUHNEN, C. F. C.; MARCOLAN, D. C.; ROCHA, M. C. da. Proposta de Educação Ambiental na unidade de conservação parque Estadual do turvo , Derrubadas- Rio Grande do Sul. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 19, n. 1, p. 88–96, 2015. Disponível em: <<http://periodicos.ufsm.br/reget/article/viewFile/19198/pdf>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

LABRUNA, M. B. BIOLOGIA-ECOLOGIA DE *Rhipicephalus sanguineus* (Acari : Ixodidae). **Brazilian Journal Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 123–124, 2004. Supplement 1

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156–66, maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538276>>. Acesso em: 22 ago. 2011.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 169–174, 2005a.

LABRUNA, M. B.; HOMEM, V. S. F.; HEINEMANN, M. B.; NETO, J. S. F. Ticks (Acari : Ixodidae) Associated with Rural Dogs in Uruará , Eastern Amazon , Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 5, p. 774–776, 2000. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/full/10.1603/0022-2585-37.5.774>>. Acesso em: 23 jun. 2015.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. Prevalence of Rickettsia infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249–255, 2007a.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JÁCOMO, A. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; GOMES, A. A. B.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C. R.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F. V.; MORATO, R. L. G.; ALHO, C. J. R.; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, n. 1, p. 149–163, 2005b.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65–77, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11879967>>. Acesso em: 12 jul. 2016.

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, 2004a.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Human Parasitism by the Capybara Tick, Amblyomma dubitatum (Acari: Ixodidae). **Entomological News**, v. 118, n. 1, p. 77–80, 2007b. Disponível em: <[http://www.bioone.org/doi/abs/10.3157/0013-872X\(2007\)118\[77:HPBTCT\]2.0.CO;2](http://www.bioone.org/doi/abs/10.3157/0013-872X(2007)118[77:HPBTCT]2.0.CO;2)>. Acesso em: 28 jun. 2016.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; NAVA, S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; GUGLIELMONE, A. A. Infection by Rickettsia bellii and Candidatus “Rickettsia amblyommii” in Amblyomma neumanni ticks from Argentina. **Microbial Ecology**, v. 54, n. 1, p. 126–133, 2007c.

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. 869–73, fev. 2007d. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1800744&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 23 maio. 2013.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. de C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária**, v. 30, p. 24–32, 2001.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, V. S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R. de; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011.

LABRUNA, M. B.; SANTOS, F. C. P.; OGRZEWALSKA, M.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S.; MARCILI, A.; ANGERAMI, R. N. Genetic Identification of Rickettsial Isolates from Fatal Cases of Brazilian Spotted Fever and Comparison with Rickettsia rickettsii Isolates from the American Continents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3788–3791, 2014. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/cgi/doi/10.1128/JCM.01914-14>>.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES, J. S.; PACHECO, R. C.; PINTER, A.; GENNARI, S. M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 553–556, 2001.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M. a; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, 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 Species Infecting Amblyomma cooperi Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90–98, 2004c.

LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, v. 129, p. S221–S245, 2004. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182004005220>. Acesso em: 24 maio. 2016.

LADO, P.; CASTRO, O.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. First molecular detection of Rickettsia parkeri in Amblyomma tigrinum and Amblyomma dubitatum ticks from Uruguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 660–662, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X1400140X>>. Acesso em: 15 maio. 2016.

LAMATTINA, D.; NAVA, S. Ticks infesting humans in Northern Misiones, Argentina. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 76, n. 2, p. 89–92, 2016.

LANE, R. S.; KLEINJAN, J. E.; SCHOELER, G. B. Diel Activity of Nymphal Dermacentor occidentalis and Ixodes pacificus (Acari, Ixodidae) in Relation To Meteorological Factors and Host Activity Periods. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 3, p. 290–299, 1995.

Disponível em: <<Go to ISI>://WOS:A1995QW42900011>. Acesso em: 27 jun. 2016.

LAVINA, M. S.; DE SOUZA, A. P.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; MOURA, A. B.; FAMADAS, K. M. Ixodídeos coletados em equinos e caninos no Estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 1, p. 79–84, 2014.

LEMA, T. Importância da fauna do Parque do Turvo, RS. **Ciência e Cultura**, v. 32, n. 3, p. 328–330, 1980.

LEVIN, M. L.; KILLMASTER, L. F.; ZEMTSOVA, G. E. Domestic Dogs (*Canis familiaris*) as Reservoir Hosts for *Rickettsia conorii*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 1, p. 28–33, 2012. Disponível em: <<http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/vbz.2011.0684>>. Acesso em: 4 jul. 2016.

LONDOÑO, A. F.; DÍAZ, F. J.; VALBUENA, G.; GAZI, M.; LABRUNA, M. B.; HIDALGO, M.; MATTAR, S.; CONTRERAS, V.; RODAS, J. D. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 672–675, 2014.

LONDOÑO, I. M. Transmission of *Microfilariae* and Infective Larvae of *Dipetalonema viteae* (Filarioidea) among Vector Ticks, *Ornithodoros tartakowskyi* (Argasidae), and Loss of *Microfilariae* in Coxal Fluid. **The Journal of Parasitology**, v. 62, n. 5, p. 786–788, 1976.

LOPES, M. G.; JUNIOR, J. M.; FOSTER, R. J.; HARMSSEN, B. J.; SANCHEZ, E.; MARTINS, T. F.; QUIGLEY, H.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 62, 2016. Disponível em: <<http://www.parasitesandvectors.com/content/9/1/62>>. Acesso em: 6 maio. 2016.

LUCE-FEDROW, A.; WRIGHT, C.; GAFF, H. D.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; RICHARDS, A. L. In vitro propagation of *Candidatus Rickettsia andeanae* isolated from *Amblyomma maculatum*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 74–81, 2012.

LUGARINI, C.; MARTINS, T. F.; OGRZEWSKA, M.; DE VASCONCELOS, N. C. T.; ELLIS, V. a.; DE OLIVEIRA, J. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; SILVA, J. C. R. Rickettsial agents in avian ixodid ticks in northeast Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 364–375, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X15000370>>. Acesso em: 1 jul. 2016.

LUZ, H. R.; MATHIAS, C.; HORACIO, L.; R, A. L. H.; MATHIAS, C.; TICKS, F. J. L. H. Carrapatos parasitando cães em uma área insular do estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil *. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 4, p. 437–442, 2014.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento das doenças do grupo “Tifo

Exantemático” do Brasil: (Tifo Exantemático Neotrópico). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 55, n. 2, p. 191–208, 1957.

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, p. 478–484, 1998.

MARQUES, A. A. B.; FONTANA, C. .; VÉLEZ, E.; BENCKE, G. A.; SCHNEIDER, M.; REIS, R. E. **Lista das espécies da fauna ameaçadas de extinção no rio grande do sul**. Porto Alegre: Fundação Botânica, 2002.

MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 2, p. 197–199, 1989.

MARTINS, J. R.; RECK, J.; DOYLE, R. L.; DA CRUZ, N. L. N.; VIEIRA, A. W. D. M.; SOUZA, U. A. *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus wiedii*) in Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 19, n. 3, p. 189–91, 2010a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20943026>>. Acesso em: 26 set. 2013.

MARTINS, J. R.; SALOMÃO, É. L.; DOYLE, R. L.; TEIXEIRA, M. C.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. FIRST RECORD OF *Amblyomma aureolatum* (PALLAS, 1772) (ACARI: IXODIDAE) parasitizing *Alouatta guariba* (HUMBOLDT, 1812) (PRIMATA: ATELIDAE) in southern Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 15, n. 4, p. 203–205, 2006.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A.; PETERKA, C. R. L.; DE C. PACHECO, R.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G. A.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 186, 2016a. Disponível em: <<http://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-016-1460-2>>. Acesso em: 5 maio. 2016.

MARTINS, T. F.; MOURA, M. M.; LABRUNA, M. B. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental & Applied Acarology**, v. 56, n. 2, p. 151–8, fev. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22113779>>. Acesso em: 22 jul. 2012.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75–99, jun. 2010b. Disponível

em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21771514>>. Acesso em: 17 jul. 2012.

MARTINS, T. F.; PERES, M. G.; COSTA, F. B.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINARIO, C. M.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. Ticks infesting wild small rodents in three areas of the state of São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 871–875, 2016b.

MASTROPAOLO, M.; TARRAGONA, E. L.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; THIEL, C.; NAVA, S. High prevalence of “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” in *Amblyomma* ticks from a Spotted Fever Endemic Region in North Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 46, p. 73–76, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2016.05.001>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

MCINTOSH, D.; BEZERRA, R. A.; LUZ, H. R.; LUIZ, J.; FACCINI, H.; AMATO GAIOTTO, F.; ANDRÉS, G.; GINÉ, 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.

MEDEIROS, A. P.; DE SOUZA, A. P.; DE MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926–30, dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22241112>>. Acesso em: 24 set. 2012.

MELO, A. L. T.; AGUIAR, D. M. De; SPOLIDORIO, M. G.; YOSHINARI, N. H.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. Serological evidence of exposure to tick-borne agents in opossums (*Didelphis* spp.) in the state of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, 2016a. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612016005004105&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 22 jun. 2016.

MELO, A. L. T.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 213–218, 2011a. Disponível em: <http://ac.els-cdn.com/S1877959X11000689/1-s2.0-S1877959X11000689-main.pdf?_tid=688ed3d8-4255-11e6-8d8f-00000aabb0f26&acdnat=1467684707_caffcf532e698c64ef59d2bb4d72a5ba>. Acesso em: 4 jul. 2016.

MELO, A. L. T.; WITTER, R.; MARTINS, T. F.; PACHECO, T. A.; ALVES, A. S.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 30, n. 1, p. 112–116, 2016b.

MELO, G. L.; SPONCHIADO, J.; MACHADO, a. F.; CÁCERES, N. C. Small-mammal

community structure in a South American deciduous Atlantic Forest. **Community Ecology**, v. 12, n. 1, p. 58–66, 2011b.

MENTZ, M. B.; TROMBKA, M.; SILVA, G. L. da; SILVA, C. E. Rhipicephalus sanguineus (ACARI: IXODIDAE) biting a human being in Portoalegre city, Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 1, p. 2–4, 2016. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652016005000404&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 6 jun. 2015.

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 379–405, 2011.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; BARCELOS, R. M.; GOMES, G. G.; MONTANDON, C. E.; PENA, D. C. H.; NIERI-BASTOS, F. A.; SILVEIRA, I.; PACHECO, R.; LABRUNA, M. B.; BOUYER, D. H.; FREITAS, R. N.; WALKER, D. H.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M. Rickettsia in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern Region of Minas Gerais, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1305–1307, 2010.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; MONTANDON, C. E.; FREITAS, R. N.; PACHECO, R.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M. Spotted fever group Rickettsia in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern Region of Minas Gerais State, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 937–939, 2013.

MINERVINO, A. H. H.; LIMA, J. T. R.; SOARES, H. S.; MALHEIROS, A. F.; MARCILI, A.; KRAWCZAK, F. da S.; LOPES, M. G.; MARTINS, T. F.; MOREIRA, T. R.; RIBEIRO, M. F. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Seroprevalence of Tick-Borne Pathogens and Tick Infestation in Dogs from Tapirapé and Karajá Indigenous Communities, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 7, p. 412–8, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26186512>>. Acesso em: 8 mar. 2016.

MIRANDA, J.; MATTAR, S. Molecular detection of rickettsia bellii and rickettsia sp. strain colombianensi in ticks from Cordoba, Colombia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 2, p. 208–212, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.10.008>>. Acesso em: 02 maio. 2015.

MONJE, L. D.; NAVA, S.; EBERHARDT, A. T.; CORREA, A. I.; GUGLIELMONE, A. a; BELDOMENICO, P. M. Molecular Detection of the Human Pathogenic Rickettsia sp. Strain Atlantic Rainforest in Amblyomma dubitatum Ticks from Argentina. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 2, p. 167–9, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25700048>>. Acesso em: 6 maio. 2016.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.;

GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. a; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on brazilian spotted Fever in an endemic area of the state of são paulo, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 73–78, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18847319>>. Acesso em: 25 abr. 2013.

MORELLATO, L. P. C.; HADDAD, C. F. B. Introduction : The Brazilian Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 786–792, 2000.

NAVA, S.; ELSHENAWY, Y.; EREMEEVA, M. E.; SUMNER, J. W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK, C. D. Rickettsia parkeri in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1894–1897, 2008.

NAVA, S.; LARESCHI, M.; REBOLLO, C.; BENÍTEZ USHER, C.; BEATI, L.; ROBBINS, R. G.; DURDEN, L. A.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Paraguay. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v. 101, n. 3, p. 255–270, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1179/136485907X176319>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; MASTROPAOLO, M.; GONZÁLEZ, E. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of Amblyomma dubitatum (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 51, n. 4, p. 335–351, 2010.

NICHOLSON, W. L.; ALLEN, K. E.; MCQUISTON, J. H.; BREITSCHWERDT, E. B.; LITTLE, S. E. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. **Trends in Parasitology**, v. 26, n. 4, p. 205–212, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.01.007>>. Acesso em: 3 jul. 2015.

NICHOLSON, W. L.; MASTERS, E.; WORMSER, G. P. Preliminary serologic investigation of “Rickettsia amblyommii” in the aetiology of Southern tick associated rash illness (STARI). **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. SUPPL. 2, p. 235–236, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02155.x>>. Acesso em: 2 jun. 2016.

NIERI-BASTOS, F. A.; HORTA, M. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MORAES-FILHO, J.; RAMIREZ, D. G.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B. Isolation of the Pathogen Rickettsia sp. Strain Atlantic Rainforest From Its Presumed Tick Vector, Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae), From Two Areas of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, n. 2011, p. tjw062, 2016. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1093/jme/tjw062>>. Acesso em: 20 jun. 2016.

NIERI-BASTOS, F. A.; LOPES, M. G.; CANÇADO, P. H. D.; ROSSA, G. A. R.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Candidatus Rickettsia andeanae, a spotted fever group agent infecting Amblyomma parvum ticks in two Brazilian biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 259–261, 2014.

OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; CARDENAS-CALLIRGOS, J. M.; CAPEK, M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 254–256, 2012a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.05.003>>. Acesso em: 4 maio. 2015.

OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections in ticks from wild birds in Paraguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 2, p. 83–89, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.08.004>>. Acesso em: 6 maio. 2014.

OGRZEWALSKA, M.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; NAVA, S.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MUÑOZ-LEAL, S.; RUIZ-ARRONDO, I.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A.; LABRUNA, M. B. A novel spotted fever group *Rickettsia* infecting *Amblyomma parvitarsum* (Acari: Ixodidae) in highlands of Argentina and Chile. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 439–442, 2016.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; LEONARDO, J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B.; RICHTZENHAIN, L. J. Ticks (Acari : Ixodidae) Infesting Birds in an Atlantic Rain Forest Region of Brazil Ticks (Acari : Ixodidae) Infesting Birds in an Atlantic Rain Forest Region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p. 1225–1229, 2009.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D. G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; COSTA, F. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1283–1300, set. 2012b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22716923>>. Acesso em: 6 nov. 2012.

OGRZEWALSKA, 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. 320–31, set. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22173291>>. Acesso em: 17 out. 2012.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research**, v. 108, n. 3, p. 665–670, 2011.

OLIVEIRA-FILHO, A.; FONTES, M. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate1. **Biotropica**, v. 32, n. 4b, p. 793–810, 2000. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1744-7429.2000.tb00619.x/abstract>>. Acesso em: 15 maio. 2016.

OLIVEIRA, H. H.; GOMES, V.; AMORIM, M.; GAZETA, G. S.; SERRA-FREIRE, N. M.; QUINELATO, I. P. F.; MORELLI-AMARAL, V. F.; ALMEIDA, A. B.; CARVALHO, R. W.; CARVALHO, A. G. Diversidade de ixodida em roedores e marsupiais capturados no Parque Estadual da Pedra Branca, Rio de Janeiro, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**

e **Zootecnia**, v. 66, n. 4, p. 1097–1104, 2014.

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.; PORTILLO, A.; PORTERO, F.; ZAVALA-CASTRO, J.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B. “*Candidatus Rickettsia asemboensis*” and *Wolbachia* spp. in *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* fleas removed from dogs in Ecuador. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 210, p. 455, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4186946&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 2 jul. 2016.

PACHECO, R. C.; ARZUA, M.; NIERI-BASTOS, F. A.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsial* infection in ticks (Acari: Ixodidae) collected on birds in southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 710–716, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22679880>>. Acesso em: 2 jul. 2016.

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

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J.; CATROXO, M. H. B.; BOUYER, D. H.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5207–5211, 2011.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; NAVA, S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 1, p. 63–71, 2007.

PACHECO, R.; ROSA, S.; RICHTZENHAIN, L.; SZABO, M. P. J.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from Southern Brazil. **Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia Córdoba**, v. 13, n. 2, p. 1273–1279, 2008. Disponível em: <<http://apps.unicordoba.edu.co/revistas/revistamvz/mvz-132/v13n2a1.pdf>><<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&CSC=Y&NEWS=N&PAGE=fulltext&D=caba6&AN=20093059904>><http://ucelinks.cdlib.org:8888/sfx_local?sid=OVID:cabadb&issn=0122-0268&isbn=&volume=13&issue>. Acesso em: 24 mar. 2016.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the western hemisphere. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 315–326, 2005.

PADDOCK, C. D. The science and fiction of emerging rickettsioses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 133–43, maio 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19538273>>. Acesso em: 13 dez. 2012.

PADDOCK, C. D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D. B.; BERG, J. M.; JOSEPH, R. J.; ZAKI, S. R.; CHILDS, J. E. Short report: Concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 2, p. 197–199, 2002.

PADDOCK, C. D.; DENISON, A. M.; DRYDEN, M. W.; NODEN, B. H.; LASH, R. R.; ABDELGHANI, S. S.; EVANS, A. E.; KELLY, A. R.; HECHT, J. A.; KARPATY, S. E.; GANTA, R. R.; LITTLE, S. E. High prevalence of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” and apparent exclusion of *rickettsia parkeri* in adult *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) from Kansas and Oklahoma. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 297–302, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.02.001>>. Acesso em: 24 mar. 2015.

PADDOCK, C. D.; FERNANDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMNER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKI, S. R.; REMONDEGUI, C. E. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 687–692, 2008a. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385370>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

PADDOCK, C. D.; FINLEY, R. W.; WRIGHT, C. S.; ROBINSON, H. N.; SCHRODT, B. J.; LANE, C. C.; EKENNA, O.; BLASS, M. A.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A.; MCLELLAN, S. L. F.; GODDARD, J.; HOLMAN, R. C.; OPENSHAW, J. J.; SUMNER, J. W.; ZAKI, S. R.; EREMEEVA, M. E. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis and Its Clinical Distinction from Rocky Mountain Spotted Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, n. 9, p. 1188–1196, 2008b. Disponível em: <<http://cid.oxfordjournals.org/lookup/doi/10.1086/592254>>. Acesso em: 5 maio. 2016.

PADDOCK, C. D.; FOURNIER, P. E.; SUMNER, J. W.; GODDARD, J.; ELSHENAWY, Y.; METCALFE, M. G.; LOFTIS, A. D.; VARELA-STOKES, A. Isolation of *Rickettsia parkeri* and identification of a novel spotted fever group *Rickettsia* sp. from Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2689–2696, 2010.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. a; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. a. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 805–11, 15 mar. 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14999622>>. Acesso em: 24 set. 2012.

PAROLA, P.; MATSUMOTO, K.; SOCOLOVSCHI, C.; PARZY, D.; RAOULT, D. A tick-borne rickettsia of the spotted-fever group, similar to *Rickettsia amblyommii*, in French Guyana. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 101, n. 2, p. 185–188, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17316505>>. Acesso em: 30 jun. 2016.

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, n. 4, p. 657–702, out. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24092850>>. Acesso em: 20 nov. 2013.

PATÍÑO-CAMARGO, L. Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial (Manulosa) en el Hemisferio Americano. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 20, n. 11, p. 1112–1124, 1941.

PENA, D. C. H.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; LABRUNA, M. B.; MILAGRES, B. S.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. Suppl.2, p. 243–244, dez. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19392893>>. Acesso em: 25 mar. 2015.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; ANACKER, R. L.; CORY, J.; HAYES, S. F.; BURGDORFER, W.; YUNKER, C. E. *Rickettsia bellii* sp. nov.: a Tick-Borne Rickettsia, Widely Distributed in the United States, That Is Distinct from the Spotted Fever and Typhus Biogroups. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 33, n. 1, p. 94–106, 1983.

PINTER, A. dos S. **Aspectos epidemiológicos da Febre Maculosa em uma área endêmica do município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do ciclo de vida do provável vetor *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae)**. 2003. Mestrado (Mestre em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 324–332, 2004.

PINTER, A. dos S. **Aspectos ecológicos da Febre Maculosa Brasileira em um foco endêmico no estado de São Paulo**. 2007.86 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2007.

PINTER, A.; HORTA, C. .; PACHECO, R. .; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. . Serosurvey of *Rickettsia* spp . in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo , Brazil. **Caderno de Saúde Pública do Rio De Janeiro**, v. 24, n. 2, p. 247–252, 2008.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523–9, out. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17114770>>. Acesso em: 22 maio. 2013.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; CANÇADO, P. H. D.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 11, n. 1, p. 29–36, 2011.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 696–701, nov. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057821>>. Acesso em: 4 jul. 2014.

PIRES COSTA, L.; R. LEITE, Y. L.; DA FONSECA, G. A.; DA FONSECA, M. T. Biogeography of South American forest mammals: Endemism and diversity in the Atlantic Forest. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 872–881, 2000. Disponível em: <<http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-0035023671&partnerID=40>>. Acesso em: 27 maio. 2016.

PIZA, J. O carrapato como transmissor do Typho exanthemático de São Paulo? **Boletim da Sociedade e Cirúrgica de São Paulo**, v. 15, n. 12, p. 350, 1932.

QGIS DEVELOPMENT TEAM 2016. **QGIS Geographic Information System** Open Source Geospatial Foundation, , 2016. . Disponível em: <<http://qgis.osgeo.org/en/site/>>. Acesso em: 15 jun. 2016.

QUEIROGAS, V. L. de; DE OLIVEIRA, L. M.; MARQUES, R. L.; OLIVEIRA, D. S. F.; SZABÓ, M. P. J. Carrapatos (Acari: Ixodidae) em cães domésticos no Parque Estadual Serra de Caldas Novas, Goiás: Considerações epidemiológicas. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 347–349, 2010.

QUEIROGAS, V. L.; DEL CLARO, K.; NASCIMENTO, A. R. T.; SZABÓ, M. P. J. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: Ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 1, p. 75–82, 2012.

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. Supl.1, p. 38–51, 2013. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/bio/v33s1/v33s1a06.pdf>>nhttp://www.revistabiomedica.org/index.

php/biomedica/article/view/735/2267\http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-41572013000500006&lng=en&nrm=iso&tlng=es>. Acesso em: 25 jun. 2016.

R TEAM, C. **R: A language and environment for statistical computing** Viena, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2015. . Disponível em: <<http://www.r-project.org/>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

RAMBO, B. P. **A fisionomia do Rio Grande do Sul**. 2. ed. Porto Alegre: Ed. Selbach, 1956.

RAMOS, V. do N.; OSAVA, C. F.; PIOVEZAN, U.; SZABÓ, M. P. J. Complementary data on four methods for sampling free-living ticks in the Brazilian Pantanal. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 516–521, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000400516&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 27 jun. 2016.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694–719, 1997. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=172941&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 31 mar. 2016.

REDIN, C. G.; LONGHI, R. V.; WATZLAWICK, L. F.; LONGHI, S. J. Composição florística e estrutura da regeneração natural do Parque Estadual do Espinilho, RS. **Ciência Rural**, v. 41, n. 7, p. 1195–1201, 2011.

REGNERY, R. L.; SPRUIL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraespecific sequences divergence for portion of two Rickettsial gene. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576–1589, 1991.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. De. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v. 27, n. 2, p. 285–289, jun. 1997. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84781997000200019&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 18 ago. 2013.

RODANICHE, E. C. de. Natural infection of the tick, *Amblyomma cajennense*, with *Rickettsia rickettsii* in Panama. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, n. 4, p. 696–699, 1953.

RODRIGUES, D. F.; DAEMON, E.; RODRIGUES, A. F. S. F. Caracterização da população de ectoparasitos em cães de núcleos de expansão urbana de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 4, p. 185–188, 2008.

ROMER, Y.; NAVA, S.; GOVEDIC, F.; CICUTTIN, G.; DENISON, A. M.; SINGLETON, J.; KELLY, A. J.; KATO, C. Y.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis in Different

Ecological Regions of Argentina and its association with *Amblyomma tigrinum* as a potential vector. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 6, p. 1156–1160, 2014.

ROMER, Y.; SEIJO, A. C.; CRUDO, F.; NICHOLSON, W. L.; VARELA-STOKES, A.; LASH, R. R.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1169–73, jul. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21762568>>. Acesso em: 18 abr. 2012.

ROUX, V.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2058–2065, 1996.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E. R. S. De. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 155–158, 2002.

ROZENTAL, T.; FERREIRA, M. S.; GOMES, R.; COSTA, C. M.; BARBOSA, P. R. A.; BEZERRA, I. O.; GARCIA, M. H. O.; OLIVEIRA E CRUZ, D. M.; GALLIEZ, R.; OLIVEIRA, S.; BRASIL, P.; REZENDE, T.; DE LEMOS, E. R. S. A cluster of *Rickettsia rickettsii* infection at an animal shelter in an urban area of Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 11, p. 2446–2450, 2015. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0950268814003161>. Acesso em: 20 jan. 2016.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their *Rickettsia* in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 913–916, set. 2010. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1603/ME10073>>. Acesso em: 27 nov. 2012.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A. R.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102–108, jul. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18606772>>. Acesso em: 1 dez. 2013.

SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. F.; CADORE, G.; HILGER, R.; TONIM, R.; PACHECO, R.; OGRZEWSKA, M.; LABRUNA, M. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 511–514, 2011.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265–70, fev. 2005. Disponível em:

<<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3320454&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 10 out. 2013.

SANGIONI, L. A. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de são paulo**. 2003. 86 f. Tese (Doutorado em Ciências), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2003.

SARAIVA, D. G.; FOURNIER, G. F. S. R.; MARTINS, T. F.; LEAL, K. P. G.; VIEIRA, F. N.; CÂMARA, E. M. V. C.; COSTA, C. G.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; GUGLIELMONE, A. a; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 58, n. 2, p. 159–166, 15 maio 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22585005>>. Acesso em: 21 maio. 2012.

SARAIVA, D. G.; NIERI-BASTOS, F. A.; HORTA, M. C.; SOARES, H. S.; NICOLA, P. A.; PEREIRA, L. C. M.; LABRUNA, M. B. Rickettsia amblyommii Infecting Amblyomma auricularium Ticks in Pernambuco, Northeastern Brazil: Isolation, Transovarial Transmission, and Transstadial Perpetuation. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 9, p. 615–618, 24 maio 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23705586>>. Acesso em: 15 jun. 2013.

SARAIVA, D. G.; SOARES, H. S.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Feeding period required by Amblyomma aureolatum ticks for transmission of Rickettsia rickettsii to vertebrate hosts. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1504–1510, 2014.

SCHULZE, T. L.; JORDAN, R. A.; HUNG, R. W. Suppression of subadult Ixodes scapularis (Acari: Ixodidae) following removal of leaf litter. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 5, p. 730–733, 1995.

SEMA-RS. **Secretaria do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável-RS- Parque Estadual do Espinilho**. Disponível em: <http://www.sema.rs.gov.br/conteudo.asp?cod_menu=174>. Acesso em: 30 maio. 2016.

SEMA-RS. **Secretária do Ambiente e Desenvolvimento Sustentável-RS**. Disponível em: <<http://www.sema.rs.gov.br/>>. Acesso em: 30 maio. 2016.

SERRA FREIRE, N. M. Tick paralysis in Brazil. **Tropical Animal Health and Production**, v. 15, n. 2, p. 124–126, 1983. Disponível em: <<http://download.springer.com/static/pdf/676/art:10.1007/BF02239808.pdf?originUrl=http://link.springer.com/article/10.1007/BF02239808&token2=exp=1467092074~acl=/static/pdf/676/art%3A10.1007%2FBF02239808.pdf?originUrl%3>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

SERRA-FREIRE, N. M.; SENA, L. M. M.; BORSOI, A. B. P. Parasitismo humano por

carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 4, n. 2, p. 67–72, 2011.

SHEPARD, C. C.; TOPPING, N. H. A study of complement fixation in the serum of certain dogs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 78, p. 63–68, 1946.

SILVA, L. J. da; GALVÃO, M. A. M. Epidemiologia das riquetsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 13, p. 197–198, 2004. Supplement 1.

SILVA, C. P.; MÄHLER, J. J. K. F.; MARCUZZO, S. .; FERREIRA, S. . **Plano de manejo do Parque Estadual do Turvo**. 355 p. Secretaria Estadual do Meio Ambiente, Porto Alegre: 2005. Disponível em: <<http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:PLANO+DE+MANEJO+DO+PARQUE+ESTADUAL+DO+TURVO#0>> Acesso em: 15 mai 2015

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A. G.; FAVACHO, A. R. M.; REIS, M. G.; DASCH, G. a; DE LEMOS, E. R. S.; KO, A. I. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 275–8, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3204763&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>. Acesso em: 12 maio. 2012.

SILVA, P. M. R. B.; PEREIRA, S. C.; FONSECA, L. X.; MANIGLIA, F. V. P.; OLIVEIRA, S. V; DE CALDAS, E. P. Febre maculosa : uma análise epidemiológica dos registros do sistema de vigilância do Brasil. **Scientia Plena**, v. 10, n. 4, p. 1–9, 2014.

SILVEIRA, I.; MARTINS, T. F.; OLEGÁRIO, M. M.; PETERKA, C.; GUEDES, E.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection in Animals, Humans and Ticks in Paulicéia, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 7, p. 525–533, 2015.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111–1113, 2007.

SIMAS, V. R.; COSTA, E. C.; SIMAS, C. A. Vegetação arbórea fanerógama ocorrente em área de nidificação de *Atta vollenweideri* (Forel, 1893) (Hymenoptera: Formicidae). **Revista da Faculdade de Zootecnia Veterinária e Agronomia Uruguaiana**, v. 9, n. 1, p. 79–88, 2002. Disponível em: <<http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/viewFile/2147/1656> or pdf available through <http://revistaseletronicas.pucrs.br/ojs/index.php/fzva/article/view/2147>>. Acesso em: 15 out. 2015.

SOARES, H. S.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Survey of canine tick-borne diseases in Lábrea, Brazilian Amazon: “accidental” findings of *Dirofilaria immitis* infection. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 4, p. 473–480, 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612014000400473&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 18 out. 2015.

SOARES, J. F.; SOARES, C. D. M.; GALLIO, M.; SILVA, A. S.; MOREIRA, J. P.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MONTEIRO, S. G. Occurrence of *Amblyomma longirostre* in *Ramphastos dicolorus* in Southern Brazil. **Ciência Rural**, v. 39, n. 3, p. 930–932, 2009.

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. 139–51, jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22007869>>. Acesso em: 24 ago. 2012.

SONESHINE, D. E.; PETERS, A. H.; LEVY, G. F. Rocky Mountain Spotted Fever in Relation to Vegetation in the Eastern United States, 1951–1971. **American Journal of Epidemiology**, v. 96, n. 1, p. 59–69, 1972. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1056/NEJM196901092800201>>. Acesso em: 14 ago. 2014

SONESHINE, D. E.; ROE, R. M. **Biology of Ticks vol 1**. Second ed. New York: Oxford University Press, 2014.

SOTO, F. R. M.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; NOGARI, F.; RISSETO, M. R.; SOUZA, O. de; AMAKU, M. Dinâmica populacional canina no Município de Ibiúna-SP : estudo retrospectivo. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 2, p. 178–185, 2006. Disponível em: <<http://en.scientificcommons.org/21071645>>. Acesso em: 27 abr. 2013.

SOUZA, S. S. A. L. de; SOUZA, C. E. de; RODRIGUES NETO, E. J.; PRADO, A. P. do. 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, p. 887–891, 2006.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, 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.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521–3, mar. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20202436>>. Acesso em: 8 dez. 2011.

SPONCHIADO, J. **Estrutura das comunidades de pequenos mamíferos de duas unidades de conservação (taim e espinilho) do bioma pampa, sul do brasil**. 2011.75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

SPONCHIADO, J.; MELO, G. L.; MARTINS, T. F.; KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, N. C. Association patterns of ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae, Argasidae) of small

mammals in Cerrado fragments, western Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 65, n. 3, p. 389–401, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10493-014-9877-9>>. Acesso em: 11 maio. 2015.

SZABÓ, M. J. P.; MARQUEZ CUNHA, T.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 25, p. 909–916, 2001.

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. 3-4, p. 339–346, 2006.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PACHECO, R. C.; CASTRO, M. B.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 57–72, 2009.

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 131–140, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 06, p. 719–728, 30 maio 2013. Disponível em: <http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182012002065>. Acesso em: 25 mar. 2013.

SZABÓ, M. P. J.; OLEGÁRIO, M. M. M.; SANTOS, A. L. Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental & Applied Acarology**, v. 43, n. 1, p. 73–84, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828441>>. Acesso em: 22 nov. 2012.

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, n. 27, 2013.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M. M.; BEDÊ, L. C. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 132–138, 2005.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. **MEGA6: Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0** *Molecular Biology and Evolution*, 2013.

.Disponível em: <www.megasoftware.net/pdfs/TamuraStecher13.pdf>. Acesso em: 20 mai. 2016.

TARRAGONA, E. L.; CICUTTIN, G. L.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; NAZARENA DE SALVO, M.; NAVA, S. Rickettsia infection in Amblyomma tonelliae, a tick species from the Amblyomma cajennense complex. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 173–177, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25544308>>. Acesso em: 28 jun. 2016.

TELFORD, S. R. I.; GOETHERT, H. K. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly “new”? **Parasitology**, v. 129, p. S301–S327, 2004.

TERASSINI, F. A.; BARBIERI, F. S.; ALBUQUERQUE, S.; SZABO, M. P. J.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Comparison of two methods for collecting free-living ticks in the Amazonian forest. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 4, p. 194–196, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.08.002>>. Acesso em: 17 maio. 2016.

TOMASSONE, L.; NUÑEZ, P.; CEBALLOS, L. A.; GURTNER, R. E.; KITRON, U.; FARBER, M. Detection of “Candidatus Rickettsia sp. strain Argentina” and Rickettsia bellii in Amblyomma ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v. 52, n. 1, p. 93–100, 2010.

VENZAL, J. M.; GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA PEÑA, A.; CABRERA, P. A.; CASTRO, O. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasitising humans in Uruguay. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n. 7, p. 769–772, 2003.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. Rickettsia parkeri in Amblyomma triste from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493–1495, 2004.

VERONEZ, V. A.; FREITAS, B. Z.; OLEGÁRIO, M. M. M.; CARVALHO, W. M.; PASCOLI, G. V. T.; THORGA, K.; GARCIA, M. V.; SZABO, M. P. J. Ticks (Acari: Ixodidae) within various phytophysionomies of a Cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 50, n. 2, p. 169–179, 2010.

WINKEL, K. T.; RIBEIRO, P. B.; ANTUNES, L. O.; CÁRCAMO, M. C.; VIANNA, É. E. S. Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Ixodidae) in synantropic rodents in Rio Grande do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 276–279, 2014.

WITTER, R.; MARTINS, T. F.; CAMPOS, A. K.; MELO, A. L. T.; CORRÊA, S. H. R.; MORGADO, T. O.; WOLF, R. W.; MAY-JÚNIOR, J. A.; SINKOC, A. L.; STRÜSSMANN, C.; AGUIAR, D. M.; ROSSI, R. V.; SEMEDO, T. B. F.; CAMPOS, Z.; DESBIEZ, A. L. J.; LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 415–423, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X15300601>>. Acesso em:

11 mar. 2016.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; DOS SANTOS COSTA, J.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; DE CAMPOS PACHECO, R.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel Babesia and Hepatozoon agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 449–456, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X1630005X>>. Acesso em: 6 abr. 2016.

YU, X.-J.; WALKER, D. H. **The Order Rickettsiales**. 3rd. ed. New York: Springer, 2006.

ZANIRATO, S. H. O patrimônio natural do Brasil. **Revista do Programa de Estudos Pós-Graduados de História**, v. 40, p. 127–145, 2010. Disponível em: <<http://revistas.pucsp.br/index.php/revph/article/viewArticle/6127>>. Acesso em: 15 maio. 2016.

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no Uso de Animais

DECLARAÇÃO

Declaramos, para os devidos fins, que o aluno Felipe da Silva Krawczak entregou, nesta data, o projeto de pesquisa intitulado: "Pesquisa de infecção por *rickettsias* do grupo da febre maculosa em cães, equinos, pequenos mamíferos e carrapatos em áreas endêmicas e não endêmicas nos biomas de Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul", sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, o qual foi protocolado sob o nº 2908/2013.

São Paulo, 31 de janeiro de 2013.

Roseli da Costa Gomes
Chefe do Serviço de Apoio Acadêmico
e secretária da Comissão de Ética no Uso de Animais

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fone: + 55 11 3091-7671/7676
Fax: +55 11 3032-2224
E-mail: fmvz@usp.br
<http://www.fmvz.usp.br>

APÊNDICE B

QUESTIONÁRIO TABELA DOS CÃES COLETAS DOUTORADO												
ID ANIMAL	NOME	SEXO	ADUL/FILH	PROPRIETÁRIO	LOCAL	LOCALIDADE	DATA	COLETA	ADENT. MATA ?	TICKS 1ª COLETA	TICKS 2ª COLETA	TICKS 3ª COLETA
1	Dora	f	A	Elário Becker	Derrubadas	Cidade	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
2	NI	m	A	amila	Derrubadas	Cidade	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
3	Fredi	m	A	Adilson	Derrubadas	Cidade	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
4	Mico	m	A	carlos	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	já teve		
5	petequinha	f	A	carlos	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
6	Betoven	m	A	carlos	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
7	xarope	m	A	Rui Renner	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
8	Fifi	f	A	Igmar	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
9	Bilu	m	A	Igmar	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
10	Bolota	m	A	Bigolini	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
11	Peludinho	m	A	Bigolini	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
12	Bolinha	f	A	Bigolini	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
13	Branco	m	A	Bigolini	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
14	Urso	m	A	Bigolini	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
15	Dino	m	A	Bigolini	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
16	Pequeninha	f	A	Bigolini	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
17	Tulão	m	A	Bigolini	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
18	Boby	m	A	Alfredo	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
19	NI	m	A	Alfredo	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
20	NI	m	A	Alfredo	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
21	NI	f	A	Alfredo	Derrubadas	Estrada CN	4.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
22	Fredi	m	A	Eloir	Derrubadas	Centro Novo	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não	Tinha 1m e 1f	Tinha 1 F
23	Nina	f	A	Laura	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
24	scooby	m	A	Laura	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
25	Mike	m	A	Laura	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
26	Guri	m	A	Lurdes	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	já teve	Tinha 2f e 3m	
27	Luke	m	A	Lurdes	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
28	Neguinha	f	A	Lurdes	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não	Tinha 6 adultos	
29	Neguinho Preto	m	A	Lurdes	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
30	Neguinho Branco	m	A	Lurdes	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não	Tinha 3 m e 1f	
31	Rebeca	f	A	Lurdes	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não	Tinha 1m e 1f	
32	Drica	f	A	Rosangela	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
33	Susi	f	A	Rosangela	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		
34	NI	f	a	Paulo	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	Sim	já teve		
35	NI	m	A	Paulo	Derrubadas	Estrada CN	6.7.2013.	1ª COLETA	SIM	não		

APÊNDICE C

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 38502-1	Data da Emissão: 17/05/2013 18:36	Data para Revalidação*: 16/06/2014
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Felipe Da Silva Krawczak	CPF: 006.851.240-61
Título do Projeto: Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em cães, equinos, pequenos mamíferos e carrapatos em região endêmica e não endêmicas nos biomas de Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul.	
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	CNPJ: 63.025.530/0019-33

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de Soro dos animais e Carrapatos	06/2013	07/2013
2	Coleta de Soro dos Animais e Carrapatos	09/2013	10/2013
3	Coleta de Soro dos Animais e Carrapatos	01/2014	02/2014

APÊNDICE D

SECRETARIA ESTADUAL DO MEIO AMBIENTE
DEPARTAMENTO DE FLORESTAS E ÁREAS PROTEGIDAS
DIVISÃO DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO

Autorização Especial de Pesquisa nº 05/2013 – DUC

Prezados Pesquisadores,

Venho por meio deste, informar que o projeto enviado a esta divisão intitulado **“Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em cães, equinos, pequenos mamíferos e carrapatos em áreas endêmicas e não endêmicas nos biomas de Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul”** está autorizado para ser realizado no Parque Estadual do Turvo e Parque Estadual do Espinilho. Esse projeto está cadastrado com o número 428 nesta divisão. O projeto será realizado pelos seguintes pesquisadores vinculados a Universidade de São Paulo (UFSP): Felipe da Silva Krawczak (Doutorando), Arlei Marcili e Marcelo Bahia Labruna (Orientador). Os pesquisadores devem informar por escrito, à DUC quando houver mudanças nos integrantes da equipe, sendo necessário enviar novos formulários de identificação.

A coleta de material de qualquer natureza no interior das Unidades de Conservação deverá restringir-se estritamente à coleta prevista no projeto aprovado pela DUC. O material biológico a ser mostrado é o seguinte: **Pequenos mamíferos silvestres para coletas de amostras de tecidos sanguíneos; (Os animais capturados cuja identificação não for possível em campo serão eutanasiados, para posterior identificação em laboratório) e parasitas da Ordem Ixodida quando encontrados nos pequenos mamíferos.**

Obs: Não está autorizado a coleta para eutanásia de espécies da fauna ameaçadas de extinção no Rio Grande do Sul de acordo com a lista no Decreto Estadual nº 41.672/02.

DUC/DEFAP. Rua Carlos Chagas, 55, sala 1014. Cep 90030-020-Porto Alegre. (51)3288-8108, 3288-8109

MS.

APÊNDICE E

MORPHOLOGY, SYSTEMATICS, EVOLUTION

***Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil**

FELIPE S. KRAWCZAK,¹ THIAGO F. MARTINS,¹ CAROLINE S. OLIVEIRA,² LINA C. BINDER,¹
 FRANCISCO B. COSTA,¹ PABLO H. NUNES,³ FÁBIO GREGORI,¹ AND
 MARCELO B. LABRUNA^{1,4}

J. Med. Entomol. 52(1): 28–37 (2015); DOI: 10.1093/jme/tju007

ABSTRACT During 2013–2014, adult ticks were collected on the vegetation and subadult ticks were collected from small mammals [*Didelphis aurita* Wied-Neuwied, *Sooretamys angouya* (Fischer), *Euryoryzomys russatus* (Wagner), *Akodon montensis* Thomas, *Oxymycterus judex* Thomas] in an Atlantic rainforest reserve in southern Brazil. Analyses of the external morphology of the adult ticks revealed that they represent a new species, *Amblyomma yucumense* n. sp. Partial 16S rRNA sequences generated from males, females, and nymphs were identical to each other and closest (95% identity) to corresponding sequences of *Amblyomma dubitatum* Neumann. *A. yucumense* is morphologically and genetically closest related to *A. dubitatum*. Dorsally, male of these species can be separated by major longitudinal pale orange stripes associated with a pseudoscutum indicated by a pale stripe in *A. yucumense*, in contrast to pale creamy longitudinal stripes and absence of pseudoscutum in *A. dubitatum*. Ventrally, male coxal I spurs are separated by a space narrower than external spur width in *A. yucumense*, and wider than external spur width in *A. dubitatum*. Females of the two species can be separated by coxal I spurs, longer in *A. yucumense* than in *A. dubitatum*. In addition, the adult capitulum and ventral idiosoma of *A. yucumense* are generally dark brown colored, while *A. dubitatum* is yellowish or light brown colored. The nymph of *A. yucumense* differs from *A. dubitatum* by the scutal cervical groove length, slightly shorter in the former species. Currently, *A. yucumense* is restricted to southern Brazil.

KEY WORDS *Amblyomma*, new species, description, Brazil

ANEXO

Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2016*

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016*
Região Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	2	3	2	3	0
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	2	3	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0
Região Sudeste	41	25	20	54	76	90	62	57	50	78	77	104	90	77	87	122	5
Minas Gerais	23	9	10	9	24	11	18	13	11	9	10	13	7	14	10	14	0
Espírito Santo	2	0	0	13	11	0	0	3	1	0	4	7	5	4	1	4	0
Rio de Janeiro	0	1	1	2	0	24	7	10	7	8	5	13	4	4	13	14	1
São Paulo	16	15	9	30	41	55	37	31	39	61	58	71	74	55	63	90	4
Região Sul	0	0	0	6	8	39	22	33	27	41	27	28	41	35	45	22	8
Paraná	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	3	2	4	2	2	5	0
Santa Catarina	0	0	0	6	8	36	21	29	25	38	24	25	37	31	42	16	8
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	3	0	2	0	2	0	1	0	2	1	1	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2	1	2	4	1
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Goias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	2	4	1
Distrito Federal	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brasil	41	25	20	60	84	130	85	91	77	121	106	132	135	116	136	152	14

Fonte: Sinan - atualizado em 27/04/2016

*Dados sujeitos à revisão