

Elizângela Guedes

T636.083 69

G 924e

2005



ESTUDO BIOMOLECULAR DE *Rickettsia rickettsii* (Ricketts, 1909) EM *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) E *Amblyomma dubitatum* (Neumann, 1899) (Acari: Ixodidae) EM CORONEL PACHECO, MINAS GERAIS. 2004.

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Veterinária.

Área: Medicina Veterinária Preventiva

Orientador: Romário Cerqueira Leite

**Belo Horizonte
Escola de Veterinária – UFMG
2005**

ESCOLA DE VETERINÁRIA
BIBLIOTECA UNIVERSITÁRIA
BIBLIOTECA 01/09/05

DA UFMG 1556205-11

374896

G924e Guedes, Elizângela, 1979-

Estudo biomolecular de *Rickettsia rickettsii* (Ricketts, 1909) em *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e *Amblyomma dubitatum* (Neumann, 1899) (Acari: Ixodidae) em Coronel Pacheco, Minas Gerais, 2004 / Elizângela Guedes. – 2005.

33 p. :il.

Orientador: Romário Cerqueira Leite

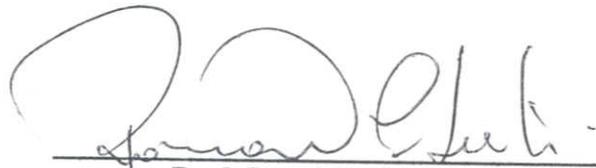
**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais,
Escola de Veterinária**

Inclui bibliografia

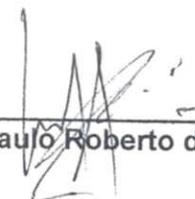
**1. Carrapato – Teses. 2. Doenças transmitidas por carrapato - Teses.
3. Rickettsioses – Teses. I. Leite, Romário Cerqueira. II. Universidade
Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título**

CDD – 636.089 696 8

Dissertação defendida e aprovada em 11 de fevereiro de 2005 pela comissão examinadora constituída por:



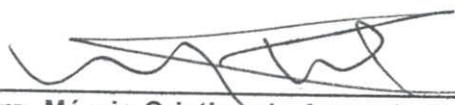
Prof. Romário Cerqueira Leite
(Orientador)



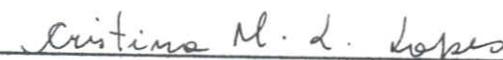
Prof. Paulo Roberto de Oliveira



Dr. John Furlong



Dra. Márcia Cristina de Azevedo Prata



Dra. Cristina Marques Lisboa Lopes

DEDICATÓRIA

Aos meus pais pelo apoio incondicional, pela dedicação, pelas sábias palavras, ainda que simples, pelo colo que sempre me acalentou e ainda o faz.

Ao André pelo seu amor, companheirismo, compreensão pelos momentos de ausência e pela cumplicidade.

Ao meu "príncipe" Felipe a quem tanto amo e sem o qual nada disso teria razão de ser.

Ao Yan por ter ajudado a cuidar do Felipinho enquanto me ausentava.

Dedico este trabalho.

*"Quando a hora dobra em triste e tardo toque
E em noite horrenda vejo escoar-se o dia,
Quando vejo esvair-se a violeta
Ou que a prata a preta têmpera assedia,
Quando vejo sem folha o tronco antigo
Que ao rebanho estendia sombra franca
E em feixe atado agora o verde trigo
Seguir o carro a barba hirsuta e branca,
Sobre a tua beleza então questiono
Que há de sofrer a dura prova,
Pois a graça no mundo em abandono
Morre ao ver nascendo a graça nova,
Quando a foice do tempo é vão combate
Salvo a prole que o enfrenta se te abate."*

Shakespeare

AGRADECIMENTOS

A Deus pela luz que sempre ilumina meus caminhos e pela realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmãs e sobrinhos pela corrente de positividade que sempre me cercou.

Aos meus sogros, Heloísa e Zé Luís, pelo carinho com que cuidaram de meu filho Felipe na minha ausência.

Ao André e ao Yan pelo amor, carinho e paciência dispensados a mim ao longo deste percurso.

Ao "Príncipe" por compreender que a mamãe, às vezes, precisa ficar longe.

Ao Professor Romário Cerqueira Leite pela orientação e pelo desprendimento com que doou seus nobres conhecimentos a mim.

Ao Prof. Paulo Roberto de Oliveira, ou simplesmente, ao amigo Paulinho pelas nobres dicas que engrandeceram este trabalho.

À Cristina Marques Lisboa Lopes pelas sugestões e pelo carinho.

Ao John e à Marcinha pelas dicas, pelo exemplo profissional, pelo carinho com que sempre me trataram e pela amizade.

Ao Dedi e companhia limitada do Laboratório de Parasitologia da Embrapa: Henrique, Caio, Mateus, Cíntia, Aline, Carlos, Júlio, pela ajuda a campo e pela alegre convivência.

Ao professor e amigo Marcelo Bahia Labruna pelo carinho com que me recebeu no VPS da USP em São Paulo e por toda ajuda na realização deste trabalho.

Aos amigos Lelene, Leandro, Carla, Rogério, Pedro e Daniele, pela companhia durante essa caminhada.

À chefia da Embrapa Gado de Leite – CNPGL por ceder, gentilmente, suas instalações para execução deste projeto.

Aos funcionários do Campo Experimental de Coronel Pacheco, em especial, ao Klinger, por toda colaboração nas coletas de carrapatos.

À Nádia pela ajuda na formatação deste trabalho.

Ao Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e a todos os professores pela oportunidade desta convivência.

Ao colegiado de pós-graduação e a todos seus funcionários, em especial, à Nilda, pela contribuição ao longo da execução deste projeto.

SUMÁRIO

	RESUMO	9
	ABSTRACT	9
1	INTRODUÇÃO	11
2	LITERATURA CONSULTADA	12
2.1	Aspectos gerais	12
2.2	Epidemiologia de <i>Amblyomma cajennense</i>	13
2.3	Epidemiologia de <i>Amblyomma dubitatum</i>	15
2.4	Relação macho: fêmea para adultos de <i>Amblyomma cajennense</i> e de <i>Amblyomma dubitatum</i>	16
2.5	Importância de <i>Amblyomma cajennense</i> e de <i>Amblyomma dubitatum</i> no ciclo enzoótico de rickettsias do grupo da febre maculosa	16
2.6	Técnicas para detecção, isolamento e identificação de rickettsias	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Local e duração do experimento	20
3.2	Coleta de carrapatos	20
3.3	Identificação do material	20
3.4	Teste de hemolinfa	21
3.5	Análise pela reação em cadeia de polimerase (PCR)	21
3.6	Dados meteorológicos	22
3.7	Análise dos dados	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
4.1	Dados meteorológicos	22
4.2	Flutuação da população da fase de vida livre de adultos de <i>Amblyomma cajennense</i> e de <i>Amblyomma dubitatum</i>	23
4.3	Teste de hemolinfa	25
4.4	Isolamento de rickettsias	26
4.5	Análise pela reação em cadeia de polimerase (PCR)	26
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	27
6	CONCLUSÕES	27
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
8	ANEXOS	33

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 Temperaturas máximas, médias e mínimas observadas no município de Coronel Pacheco, MG, no período de novembro de 2003 a maio de 2004..... 22
- Figura 2 Umidade relativa do ar e índices pluviométricos no município de Coronel Pacheco, MG, no período de novembro de 2003 a maio de 2004..... 23
- Figura 3 Flutuação da população de adultos de vida livre de *Amblyomma cajennense* e de *Amblyomma dubitatum* coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de novembro de 2003 a maio de 2004 24

RESUMO

Devido ao potencial papel atribuído a *Amblyomma cajennense* e a *Amblyomma dubitatum* no ciclo enzoótico de *Rickettsia rickettsii*, o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB), neste estudo avaliou-se a flutuação de populações de adultos de vida livre destas duas espécies de carrapatos, bem como a frequência de infecção de carrapatos por *R. rickettsii* numa área focal de FMB em Minas Gerais. Um total de 78 exemplares de *A. cajennense* e 78 de *A. dubitatum* foram coletados e, posteriormente, submetidos ao teste de hemolinfa com resultado negativo para todas as amostras analisadas. A análise pela reação em cadeia de polimerase (PCR) usando primers *gltA*, 17 kDa e *ompA*, detectou DNA de rickettsias do GFM em um pool de três fêmeas de *A. cajennense*. O seqüenciamento de DNA do fragmento amplificado do gene *gltA* e do gene *ompA* mostrou 100% de similaridade com a seqüência correspondente de *R. rickettsii* no Gen Bank. Estes resultados comprovam a circulação de *R. rickettsii* em populações de *A. cajennense* na área estudada e permitem sua caracterização molecular pela primeira vez nesta espécie de carrapato, no Brasil e na América Latina.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dubitatum*, *Rickettsia rickettsii*, febre maculosa.

ABSTRACT

Owing to the potential role attributed to *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the enzootic cycle of *Rickettsia rickettsii*, the etiologic agent of Brazilian Spotted Fever (BSF), this study evaluated the fluctuation of populations of free-living adults these two species of the ticks, as well the frequency of ticks infection by *R. rickettsii* in an focal area of BSF in Minas Gerais. A total of 78 *A. cajennense* and 78 *A. dubitatum* were collected and, subsequently, submitted to the hemolinf test with negative results for all analysed samples. PCR analysis using primers *gltA*, 17 kDa and *ompA* detected DNA of SFG rickettsias in one pool of three females of *A. cajennense*. DNA sequence of the amplified fragment of the *gltA* gene and *ompA* gene demonstrated 100% of similarity with correspondent sequence of *R. rickettsii* in Gen Bank database. These results show that the circulation of *R. rickettsii* in populations of *A. cajennense* in studied area and describe the molecular characterization for the first time in this specie tick, in Brazil and in Latin America.

Key-words: *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma dubitatum*, *Rickettsia rickettsii*, spotted fever.

1 INTRODUÇÃO

A febre maculosa brasileira, doença geralmente fatal quando não tratada precocemente, é causada por rickettsias do grupo da febre maculosa e transmitida para o homem por carrapatos do gênero *Amblyomma*, principalmente *Amblyomma cajennense*, sendo semelhante à febre maculosa das Montanhas Rochosas que tem como agente etiológico *Rickettsia rickettsii* (Dias e Martins, 1939).

A doença possui como potenciais reservatórios vários grupos de mamíferos entre eles cães, cavalos, gatos, bois, capivaras e outros que também podem apresentar sorologia positiva para rickettsias (Lemos, 2002). Em virtude disso, tem-se levantado a hipótese da participação de vários outros carrapatos no ciclo enzoótico de *R. rickettsii* como é o caso de *Amblyomma dubitatum*, parasita quase que exclusivo da capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*).

A doença ocorre, principalmente, na região Sudeste do país, com especial importância no Estado de Minas Gerais (Lemos *et al.*, 1997). No entanto, acredita-se que haja sub-notificação dos casos de febre maculosa no Brasil em razão das dificuldades no seu diagnóstico clínico, pois pode ser facilmente confundida com várias outras doenças como, por exemplo, leptospirose, febre tifóide, etc. (Melles *et al.*, 1999). Convém ressaltar ainda, que formas oligossintomáticas ou frustras da doença não chegam, muitas vezes, a serem diagnosticadas.

No ano de 2001, ocorreu um agravo para febre maculosa envolvendo um trabalhador rural funcionário do Centro Nacional de Pesquisas em Gado de Leite – CNPGL – Embrapa, no Campo Experimental de Coronel Pacheco em Minas Gerais, cujos antecedentes epidemiológicos indicaram o envolvimento de área agrícola experimental, animais domésticos da instituição e animais da fauna silvestre, que se encontram em franca expansão na região, livres de qualquer programa de manejo de fauna.

Durante o mesmo período, de janeiro de 2001 a julho de 2004, Costa (2004) num estudo com pacientes febris em centros hospitalares da cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, área de abrangência administrativa da microrregião de Juiz de Fora, através de métodos sorológicos, diagnosticou infecções rickettsiais em nove pacientes aidéticos e em 56 não aidéticos portadores de síndromes clínicas. Dessas 65 síndromes analisadas, ocorreram 11 óbitos com a identificação de *R. rickettsii* em sete deles mostrando, claramente, o impacto da endemicidade da doença no local estudado.

Recentemente, em julho de 2004, outras sete pessoas vieram a falecer em uma área rural de Juiz de Fora, vítimas da “doença do carrapato”, como foi notificado pelo telejornal local. Ainda sim, a desinformação das pessoas a respeito da doença, seus vetores e riscos é fato nestes locais com casuística recente e em outros no Estado de Minas Gerais e no Brasil como um todo.

Estes fatos permitiram o desenvolvimento desta pesquisa na área escolhida, face às facilidades operacionais existentes no local onde se situa um dos mais importantes Centros Nacionais de Pesquisa em Gado de Leite do país. Como se sabe, pesquisas sobre agentes infecciosos transmitidos por vetores são usualmente complexas, particularmente, quando envolvem espécies transmissoras de ciclo biológico trioxênico como são as espécies aqui estudadas, de difícil identificação taxonômica dos instares parasitários intermediários.

Em virtude do exposto, escolheu-se trabalhar com a fase adulta dos carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum*. Alia-se ao fato de que, segundo Silva e Galvão (2004), a maior ocorrência da doença se dá em outubro, período em que tais carrapatos se encontram nesta fase de seu ciclo biológico, além da facilidade de identificação das espécies.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo geral:

- Verificar a ocorrência de infecções por *Rickettsia rickettsii* em carrapatos adultos das espécies *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* numa área focal de febre maculosa no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais.

Como objetivos específicos o trabalho visou:

- Avaliar a importância dos carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* na ecologia de *Rickettsia rickettsii* na área estudada.
- Identificação de rickettsias através de técnicas biomoleculares.

2 LITERATURA CONSULTADA

2.1 Aspectos gerais

Os ixodídeos são ectoparasitas de vertebrados terrestres, o que inclui, homens e animais. Das 3500 espécies de acarinos (pertencentes à Classe Arachnida, Subclasse Acari, Ordem Ixodida, Subordem Ixodides, Superfamília Ixodoidea), 825 são de carrapatos divididas em três famílias: Ixodidae (650 espécies), Argasidae (174 espécies) e Nutalliellidae (uma espécie). No Brasil, são descritas 57 espécies de ixodídeos, distribuídos em seis gêneros da família Ixodidae e quatro gêneros da família Argasidae (Aragão e Fonseca, 1961).

A espécie *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) é uma das mais prevalentes e a que melhor se encontra distribuída pelo continente americano. Ocorre ao sul dos Estados Unidos da América espalhando-se pelo México, América Central e Caribe, disseminando-se pela América do Sul, especialmente ao longo da costa do Atlântico (Robinson, 1926). No Brasil, embora um grande número de exemplares seja encontrado na região Sudeste, apresenta ampla distribuição ocorrendo em todo o território nacional (Rozental *et al.*, 2002). O carrapato estrela, como é conhecido popularmente, tem ciclo trioxênico sendo encontrado com maior frequência parasitando eqüídeos. Entretanto, em virtude de sua baixa

especificidade parasitária, pode infestar outros mamíferos como bovídeos, cervídeos, canídeos domésticos e silvestres, além de aves e o próprio homem (Lopes *et al.*, 1998).

Por sua total dependência do sangue e dos tecidos de seus hospedeiros, tais carrapatos atuam como vetores de uma série de agentes infecciosos, entre eles protozoários, vírus e bactérias. *A. cajennense* está relacionado à transmissão de *Cowdria ruminantium* no Novo Mundo (Uilemberg *et al.*, 1984) e de *Ehrlichia bovis* no Brasil (Massard, 1984) a bovinos. Novos subsídios sobre os prejuízos induzidos por *A. cajennense* foram relatados por Cunha (1979) sobre o poder toxicóforo deste carrapato para coelhos. Serra-Freire (1984) incriminou tal carrapato como agente indutor de paralisia para ruminantes domésticos, em virtude da inoculação de toxinas paralisantes juntamente com sua saliva. A picada é dolorosa podendo causar severa reação local acompanhada de febre e estresse, tanto no homem como nos animais. Estes últimos, devido ao parasitismo, podem apresentar significativa queda na produção e produtividade, além da depreciação da qualidade do couro (Oliveira, 1998).

Além da sua importância do ponto de vista econômico-zootécnico nos sistemas de exploração animal, *A. cajennense* também se destaca na saúde pública, já que é incriminado como o principal vetor e reservatório de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa, a qual é transmitida transovarianamente à sua progênie. A transmissão do patógeno também ocorre a partir das larvas para ninfas e destas para os adultos caracterizando a transmissão transtadiária (Pereira e Labruna, 1998). No Brasil, embora poucos estudos tenham sido realizados, a doença está difundida principalmente na região Sudeste, incluindo os Estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (Lemos *et al.*, 1997). Casos na Bahia, Goiás e Rio Grande do Sul, também já foram confirmados (Del Guercio *et al.*, 1997). Recentemente, um surto de febre maculosa foi notificado e

confirmado pela primeira vez no Estado de Santa Catarina (Madeira e Wiesbrich, 2004). No entanto, apenas os Estados de Minas Gerais e São Paulo mantêm uma vigilância sistemática da doença.

Segundo Silva e Galvão (2004), no período de 1990 a 1994, o Estado de Minas Gerais apresentou uma incidência da ordem de 0,35 casos por 100.000 habitantes, maior no sexo masculino, na faixa etária de 5 a 14 anos e no mês de outubro, com uma letalidade de 10%. De 1995 a 2003, 106 casos foram confirmados com uma letalidade de 18%. Em São Paulo, por sua vez, de 1985 a 2002, 76 casos da doença foram confirmados com o registro de 36 óbitos e uma letalidade de 47,6%.

Menos prevalente, mas não menos importante, tem-se ainda no Brasil a espécie *Amblyomma dubitatum* (Neumann, 1899), antes chamado de *A. cooperi*, de acordo com a redescoberta realizada por Estrada-Peña *et al.* (2002). Segundo Figueiredo *et al.* (1999) é um parasita quase que exclusivo da capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*) e, além do Brasil, encontra-se distribuído na América do Sul, principalmente no Paraguai, Argentina e Bolívia. Os relatos da ocorrência deste carrapato em bovinos na região do Chaco na Bolívia (Squire, 1972) e sua prevalência em 97% das capivaras da Estação Ecológica do Taim no Estado do Rio Grande do Sul (Sincok *et al.*, 1997), citados por Almeida *et al.* (2001), sugerem que *A. dubitatum* pode ter sido colocado em contato com o homem em virtude da criação de bovinos próxima a áreas de capivaras.

No Brasil, *A. dubitatum* também possui um papel importante no ciclo enzoótico de *R. rickettsii*. Observações da ecologia da febre maculosa numa área endêmica do Estado de São Paulo, sugerem o potencial papel das capivaras como reservatórios naturais de *R. rickettsii* na natureza. A reemergência de casos de febre maculosa em muitas áreas do Estado de São Paulo a partir dos anos 90, coincide com o explosivo aumento da população de carrapatos em capivaras nessas áreas (Labruna *et al.*, 2004a). Lemos *et al.* (1996) isolaram uma rickettsia

do grupo da febre maculosa (GFM) a partir de um carrapato *A. dubitatum* coletado de uma capivara no município de Pedreira, área endêmica de febre maculosa no Estado de São Paulo. De acordo com Travassos e Vallejo-Freire (1942), as capivaras são capazes de manter rickettsias na corrente sanguínea por mais de 15 dias após inoculação experimental por *A. dubitatum*. Dessa forma, as espécies domésticas podem ser elos epidemiológicos entre o ambiente doméstico e o silvestre, com potencial risco de exposição humana ao *A. dubitatum* e ao agente etiológico da febre maculosa.

No Brasil, o diagnóstico das rickettsioses tem sido realizado por alguns Laboratórios de Saúde Pública como a Fundação Ezequiel Dias em Minas Gerais, o Instituto Adolfo Lutz em São Paulo e a Fundação do Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro e, que empregam usualmente testes sorológicos, dentre eles, a reação de imunofluorescência indireta (Nascimento e Schumaker, 2004). Outra metodologia utilizada para o diagnóstico laboratorial da doença é o isolamento do agente. As rickettsias podem ser isoladas a partir de triturado de coágulo, plasma, biópsia de pele, tecido de necropsia e amostras de artrópodes (Nascimento e Schumaker, 2004). O isolamento de rickettsias do GFM a partir de amostras de carrapatos em cultura de células Vero pelo sistema "shell vial" tem sido implantado objetivando agilizar e tornar mais segura a prática laboratorial no diagnóstico da febre maculosa (Melles *et al.*, 1999). A metodologia molecular, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), por exemplo, é também um método novo e promissor para a identificação de uma variedade de microrganismos, incluindo as rickettsias (Nascimento e Schumaker, 2004).

2.2 Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*

Segundo Oliveira (1998), a distribuição sazonal do carrapato dos equinos é determinada pelas condições do ambiente natural e social, resultando em

comportamento epidemiológico diferenciado para os diversos ecossistemas.

Smith (1975) em estudo sobre a distribuição sazonal de *A. cajennense* em Trinidad e Tobago, assinalou a predominância dos estádios imaturos na estação seca do ano (novembro a março) e enfatizou a redução dos ixodídeos no período chuvoso.

Guglielmone e Hadani (1982), por sua vez, observando a distribuição sazonal de três espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados de bovinos no noroeste da Argentina, encontraram as maiores infestações por larvas e ninfas de *A. cajennense* durante as estações secas (outono e inverno) e por adultos durante o verão. Guglielmone *et al.* (1990) estudando ainda carrapatos no nordeste da Argentina observaram que a abundância dos diferentes instares numa seqüência de picos populacionais de *A. cajennense* indicou a ocorrência de apenas uma geração por ano deste carrapato.

No Brasil, Serra-Freire (1982) estudou a ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários de *A. cajennense* em quatro áreas de pastagens com manejos diferentes no Estado do Rio de Janeiro e observou que, embora os três estádios estejam presentes o ano todo, ocorrem picos bem definidos com predominância de larvas no primeiro trimestre, de ninfas entre maio e agosto e de adultos entre setembro e dezembro.

Moreno (1984) observando a incidência de ixodídeos em bovinos de leite e sua prevalência em animais domésticos da Região Metalúrgica de Minas Gerais, relatou que as espécies mais freqüentes foram *Boophilus microplus*, *A. cajennense* e *Anocentor nitens*. A maior ocorrência de larvas de *A. cajennense* se deu nos meses de abril a julho, de ninfas nos meses de junho a outubro e adultos de outubro a junho.

Cunha (1986) estudando sobre o parasitismo por *A. cajennense* em bovinos leiteiros no Estado do Rio de Janeiro, observou que ninfas e adultos deste

ixodídeo ocorreram durante todo o ano e que a intensidade do parasitismo tende a atingir seu ponto máximo em julho para ninfas e em novembro para as formas adultas.

Serra-Freire *et al.* (1990) avaliando a disponibilidade de estádios não parasitários de ixodídeos em pastagem submetida ao pastejo contínuo por bovinos, descreveram um pico de larvas de *A. cajennense* entre os meses de fevereiro a abril.

Souza e Serra-Freire (1992) estudando a variação sazonal dos estádios adultos de *A. cajennense* e *A. nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí no Estado do Rio de Janeiro verificaram que as maiores infestações por *A. cajennense* ocorreram de outubro a maio e as menores de junho a setembro durante todo o período de investigações. Com relação à fase não parasitária de *A. cajennense* e *A. nitens*, ainda no município de Itaguaí, Souza e Serra-Freire (1994a) encontraram as maiores infestações das pastagens por larvas de *A. cajennense* nos meses de maio a setembro, no primeiro ano e de junho a setembro no segundo ano do experimento; pelas ninfas foi de julho a novembro, nos dois anos do experimento e, por adultos de outubro a maio e de janeiro a abril, no primeiro e segundo ano, respectivamente. Em Paracambi, Estado do Rio de Janeiro, Souza e Serra-Freire (1994b) analisando a fase não parasitária de *A. cajennense* e *B. microplus* observaram que as maiores infestações das pastagens por larvas de *A. cajennense* ocorreram de junho a setembro, pelas ninfas de julho a setembro e por adultos de fevereiro a abril. Observaram ainda que o fato da ocorrência de larvas e ninfas nas pastagens apresentar índices muito próximos de zero nos períodos de outubro a maio e de novembro a junho, respectivamente, provavelmente indica que ocorra apenas uma geração deste carrapato por ano.

Lemos *et al.* (1997) no Estado de São Paulo, em um estudo da dinâmica populacional, demonstraram que adultos de *A. cajennense* foram colhidos durante todo o ano, com picos nos meses de fevereiro e

março. Larvas foram encontradas entre março e agosto e ninfas foram mais abundantes entre os meses de junho a setembro com pico populacional no mês de agosto.

Oliveira *et al.* (2000) avaliando técnicas para estudo da dinâmica populacional e bioecologia do *A. cajennense* no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, coletou larvas da pastagem de abril a outubro, com pico populacional em maio nos dois anos do experimento. Ninfas foram coletadas de junho a setembro, com pico populacional no mês de julho nos dois anos de investigações. Já os adultos ocorreram durante o ano todo com aumento populacional de agosto até maio nos dois anos de duração do experimento.

Segundo Pereira e Labruna (1998), *A. cajennense* completa apenas uma geração por ano e estudos epidemiológicos mostram os três estádios parasitários marcadamente distribuídos ao longo do ano, com larvas ocorrendo basicamente entre os meses de março a julho, as ninfas entre os meses de julho a novembro e os adultos entre novembro a março. Labruna *et al.* (2002) avaliando a dinâmica sazonal de carrapatos em cavalos no Estado de São Paulo, observaram o predomínio de larvas de abril a julho e de ninfas de junho a outubro. Os adultos predominaram de outubro a março com maior número de machos em relação às fêmeas.

2.3 Epidemiologia de *Amblyomma dubitatum*

Se o número de estudos existentes sobre a bioecologia de *A. cajennense* em nosso país que visem expor com maior realidade os aspectos intrínsecos ao comportamento deste parasita é reduzido, para *A. dubitatum* torna-se mais escasso ainda. Segundo Almeida *et al.* (2001), os carrapatos de animais silvestres na América do Sul, como é o caso de *A. dubitatum*, por exemplo, ainda não são bem estudados, principalmente no que diz respeito ao seu ciclo biológico em laboratório ou sob condições naturais. Os poucos estudos

disponíveis são relativos à presença de novos hospedeiros.

Há poucos anos somente é que se iniciaram alguns trabalhos a respeito do ciclo biológico de *A. dubitatum*. Almeida *et al.* (2001), sob condições de laboratório, iniciaram um estudo a partir de duas fêmeas ingurgitadas de *A. dubitatum* coletadas de uma capivara selvagem naturalmente infestada. As larvas provenientes da postura foram utilizadas para obtenção de adultos, por meio de infestação artificial em coelhos. As fases parasitária e de vida livre das fêmeas foram avaliadas utilizando-se infestação artificial em capivara. A média de peso corporal foi de 958 mg, a média do período de pré-postura de 8,5 dias e dos índices de eficiência reprodutiva e nutricional de 59,5 e 77,3, respectivamente. Os períodos de incubação e eclosão foram de 41,9 e 5,9 dias, respectivamente. A taxa de eclosão foi de 64%.

Labruna *et al.* (2004b) testando diferentes espécies de hospedeiros no ciclo de *A. dubitatum* sob condições de laboratório, observaram que as capivaras são os hospedeiros mais suscetíveis para os estádios imaturos de *A. dubitatum* com 63,6% de larvas e 48% de ninfas recuperadas. Constataram ainda, que as infestações por carrapatos adultos em capivaras renderam mais de 76% de fêmeas ingurgitadas recuperadas. O ciclo de vida de *A. dubitatum* em laboratório foi completado em um período médio de 189,4 dias.

Teixeira *et al.* (2002) estudando o efeito de diversas exposições à temperatura de 38,5° C sobre a fase de vida livre de larvas ingurgitadas de *A. dubitatum* observaram que não houve ecdise no grupo mantido por 120 horas e somente uma larva das 90 que formavam o grupo de 48 horas realizou muda, apresentando um período de pré-ecdise de 25 dias. O maior período de pré-ecdise foi encontrado no grupo mantido por seis horas e o menor no de 24 horas. Com relação ao período de ecdise, a maior média foi encontrada no grupo controle e a menor no de 12 horas. Já no referente ao percentual de ecdise, o grupo mantido por seis horas apresentou o menor valor

enquanto que o grupo controle apresentou o maior valor encontrado.

Freitas *et al.* (2002a) ao estudarem a relação entre o peso e o número de larvas e ninfas ingurgitadas de *A. dubitatum* sob condições de laboratório, constataram que larvas ingurgitadas recuperadas entre os dias 4 e 5 ou 5 e 6 de parasitismo são ideais para conversão do peso em número de larvas ingurgitadas de *A. dubitatum*, pois seus valores não diferem entre os dias de recuperação. Já para a conversão do peso em número de ninfas ingurgitadas de *A. dubitatum* o ideal foi entre os dias 5 e 6, pois além de não diferirem significativamente entre si, concentraram o maior número de exemplares recuperados. Em outro estudo, avaliando parâmetros biológicos de ninfas ingurgitadas e o sexo de adultos de *A. dubitatum*, Freitas *et al.* (2002b), observaram que machos originam-se de ninfas mais leves e possuem menor período de ecdise.

Chacón *et al.* (2002) num estudo sobre o efeito de três temperaturas sobre a fase não parasitária de larvas ingurgitadas de *A. dubitatum* em condições de laboratório, observaram que estas apresentaram período parasitário variando de quatro a oito dias, sendo os dias 5 e 6 de parasitismo os que acumularam maior quantidade de larvas recuperadas. Mostraram também que a temperatura tem influência sobre a fase não parasitária das larvas ingurgitadas. O período de pré-ecdise foi maior na temperatura de 18°C quando comparado ao período de pré-ecdise a 27°C e a 32°C. O mesmo foi observado com relação ao período de ecdise e ao percentual de ecdise, chegando-se à conclusão de que a temperatura de 27°C é a mais eficiente para a manutenção de larvas ingurgitadas de *A. dubitatum* no laboratório.

2.4 Relação macho: fêmea para adultos de *Amblyomma cajennense* e de *Amblyomma dubitatum*

A proporção de machos para fêmeas em ixodídeos tem sido observada em espécies distintas de carrapatos, em estudo de laboratório e/ou sob condições naturais, por

vários autores. Segundo Oliveira (1998), a proporção sexual assumida nos modelos relativos aos ixodídeos é de um macho para uma fêmea havendo, no entanto, evidências de que, pelo menos para algumas espécies, ocorram desvios significativos à razão indicada em determinadas épocas do ano. Assinalou ainda, para o período de agosto a outubro nos dois anos de seu experimento uma proporção de 4,17:1 e, para o restante do ano, a relação de 1,67 machos para cada fêmea de *A. cajennense*.

Diaz *et al.* (1988) observaram a proporção sexual de 1 macho para 1,2 fêmeas de *B. microplus*. Observaram ainda que houve predomínio de adultos machos originados dos primeiros dias de postura e inversão posterior no quociente sexual.

Davey e Cooksey (1988) observaram em seu estudo, com uma grande amostra de ixodídeos, que a relação macho: fêmea não se afastou muito da proporção 1:1, embora apontem para um marcado desvio para fêmeas por volta da emergência dos imagos.

Labruna *et al.* (1997) referem-se à razão sexual de machos para fêmeas de 0,59 para *Ixodes loricatus* em estudo de laboratório.

Labruna *et al.* (2002) observaram em seu estudo com infestações de *A. cajennense* em cavalos a proporção de 4:1 e de 2:1 em outubro a dezembro de 1997 e outubro a dezembro de 1998, respectivamente.

2.5 Importância de *Amblyomma cajennense* e de *Amblyomma dubitatum* no ciclo enzoótico de rickettsias do grupo da febre maculosa

O agente da febre maculosa está intimamente associado a diversas espécies de carrapatos e com seus hospedeiros vertebrados. A incidência da doença em humanos, que não servem como reservatórios, depende, em grande proporção, dos vetores, sua distribuição e ecologia (Lemos, 1991). Assim, a distribuição geográfica da febre maculosa corresponde a dos seus vetores, além de depender de uma complexa interação de

densidade populacional e ciclos anuais dos carrapatos e hospedeiros vertebrados envolvidos.

Lemos (1991) ainda afirma que na febre maculosa, a curta duração da circulação de *R. rickettsii* no sangue dos pequenos mamíferos hospedeiros suscetíveis enfatiza o papel dos carrapatos como reservatórios. Dessa forma, a relação dos carrapatos com as rickettsias é extremamente importante para a manutenção dos microrganismos na natureza. Segundo Philip e Burgdorfer (1961), após um carrapato infectar-se com uma rickettsia durante sua alimentação sanguínea, no décimo dia aproximadamente, pode ocorrer uma infecção completa com disseminação do microrganismo para todos os tecidos, principalmente para as glândulas salivares e ovários. A partir de um indivíduo, outros podem tornar-se infectados através da transmissão vertical ou transovariana, da transmissão transestadial, além da possibilidade de alimentação simultânea de carrapatos infectados com os não infectados em animais com suficiente rickettsemia.

Considerando-se que um grande número de carrapatos suscetíveis a *R. rickettsii* venha eventualmente parasitar mamíferos hospedeiros com suficiente rickettsemia e que outros carrapatos possam se tornar infectados através da transmissão transovariana, é de se esperar um índice elevado desses artrópodes infectados na natureza. Porém, diversos estudos demonstram que os índices de infecção são geralmente baixos, mesmo considerando a presença de outras rickettsias do GFM (Elliot *et al.*, 1990).

Nem sempre a relação entre *R. rickettsii* e seus hospedeiros artrópodes é inócua. A infecção no carrapato, por exemplo, pode ser incompleta abortando, assim, a transmissão de rickettsia. Pode ocorrer ainda, mesmo com a infecção completa de rickettsia no carrapato, redução da viabilidade, da fecundidade e até mesmo, morte do artrópode após algumas gerações, contrariando o conceito de que o vetor serve indefinidamente como reservatório (McDade e Newhouse, 1986). Segundo Pereira e

Labruna (1998), a prevalência de carrapatos infectados, tanto em áreas consideradas endêmicas como em áreas sem relatos de casos humanos de febre maculosa, pode oscilar entre 0,14% e 13,5%. A existência de outras rickettsias, aparentemente não patogênicas, como *R. montanensis*, por exemplo, também pode atuar como fator limitante da infecção de *R. rickettsii* nestes vetores (Macaluso *et al.*, 2002).

Niebylski *et al.* (1999) utilizando algumas cepas virulentas de *R. rickettsii* em carrapatos *Dermacentor andersoni*, observaram que cerca de 98% das ninfas infectadas na fase de larva morreram durante a ecdise. Dos adultos infectados na fase de ninfa, 34,9% morreram na ecdise e daqueles que sobreviveram, 88,3% das fêmeas não conseguiram se alimentar e os autores concluíram que o efeito letal de *R. rickettsii* explica, pelo menos em parte, a baixa taxa de infecção dos carrapatos adultos a campo.

Macaluso *et al.* (2002) estudando as infecções por rickettsias em carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis* constataram que estes são incapazes de manter duas espécies de rickettsias ao mesmo tempo via transmissão transovariana. Admite-se que numa competição entre diferentes espécies de rickettsias pelo estabelecimento dentro de um mesmo vetor, a primo-infecção por uma dada espécie pode dificultar o estabelecimento de uma segunda.

No Brasil, o mais importante vetor de *R. rickettsii* é *A. cajennense*. É um carrapato trioxênico, abundante durante praticamente todos os meses do ano, embora sua maior atividade esteja entre os meses de julho a setembro. É encontrado com maior frequência parasitando eqüídeos, entretanto, em virtude de sua baixa especificidade parasitária, pode infestar outros mamíferos como bovídeos, cervídeos, canídeos domésticos e silvestres, além de aves e o próprio homem (Lopes *et al.*, 1998).

De Rodaniche (1953) identificou uma cepa altamente virulenta de *R. rickettsii* a partir de um grupo de 11 adultos de vida parasitária

de *A. cajennense* numa área endêmica para a febre maculosa no Panamá.

Billings *et al.* (1998) detectaram pela primeira vez no Texas e nos Estados Unidos, uma rickettsia do GFM a partir de carrapatos da espécie *A. cajennense* através da reação em cadeia de polimerase (PCR).

Ripoll *et al.* (1999) coletaram vários adultos de *A. cajennense* em cães e cavalos de uma área com claras evidências de infecções por rickettsias do GFM em Jujuy na Argentina.

Lima *et al.* (1995), no Município de Pedreira, São Paulo, encontraram *A. cajennense* como a espécie mais numerosa parasitando humanos e também no cão e no cavalo chamando a atenção para a possibilidade de participação destes animais no transporte deste vetor para os ambientes próximo ao homem.

Ainda em Pedreira, São Paulo, Lemos *et al.* (1997) encontraram *A. cajennense* como o carrapato mais abundante na região, reafirmando sua importância como principal vetor de *R. rickettsii*.

Com relação a *A. dubitatum*, que é um parasita quase que exclusivo da capivara (*Hydrochoerus hydrochoeris*), não há relatos de seu parasitismo em humanos, mas tem se destacado pelo seu importante papel no ciclo enzoótico de *R. rickettsii*, no Brasil.

Travassos e Vallejo-Freire (1942) inocularam capivaras com doses letais para porquinhos da índia (*Cavia porcellus*) do agente da febre maculosa (possivelmente *R. rickettsii*) e mostraram que esses animais não se tomaram doentes, embora rickettsias viáveis tenham sido recuperadas de seu sangue por pelo menos 11 dias. No entanto, carrapatos não infectados tomaram-se infectados após se alimentarem nessas capivaras.

Vários anos mais tarde, Lemos *et al.* (1996) isolaram uma rickettsia do GFM a partir de um carrapato *A. dubitatum* coletado de uma capivara de vida livre no município de

Pedreira, área endêmica de febre maculosa no Estado de São Paulo.

Labruna *et al.* (2004a) isolaram rickettsias do GFM de três carrapatos da espécie *A. dubitatum* infectados, de uma área endêmica do Estado de São Paulo. Também relataram que a reemergência de casos de febre maculosa em muitas áreas do Estado de São Paulo a partir dos anos 90, coincide com o explosivo aumento da população de carrapatos em capivaras nessas áreas.

Segundo Figueiredo *et al.* (1999), os mamíferos silvestres, principalmente capivaras infestadas por carrapatos vivem em próximo contato com o gado, cavalos e cachorros, com quem compartilham os mesmos carrapatos. Assim, as espécies domésticas podem ser elos epidemiológicos entre o ambiente doméstico e o silvestre, com potencial risco de exposição humana a *A. dubitatum* e ao agente etiológico da febre maculosa.

2.6 Técnicas para detecção, isolamento e identificação de rickettsias

Para uma rápida detecção de microrganismos semelhantes a rickettsias é designado o teste de hemolinfa a partir de carrapatos adultos experimental ou naturalmente infectados. O teste consiste na coleta de uma gota de hemolinfa por amputação da porção distal do primeiro par de patas do carrapato em uma lâmina de vidro (Burgdorfer, 1970). Após, procede-se à coloração da lâmina pelo método de Giménez (Giménez, 1964) e ao exame microscópico. As rickettsias podem aparecer como microrganismos cor de rosa em forma de bastonetes, cocóides e algumas vezes pleomórficos (Burgdorfer, 1970).

A confirmação laboratorial da presença ou não de rickettsias pode ser feita através da pesquisa de anticorpos específicos em humanos ou animais, através do isolamento do agente em amostras de sangue e/ou biópsia e ainda, de amostras de carrapatos coletados em humanos, animais, reservatórios ou do próprio ambiente.

Dentre os testes sorológicos, os mais utilizados são a imunofluorescência indireta (RIFI), o ensaio imunoenzimático (ELISA) e o teste de Weil-Felix (WF) como método de triagem. Zavala-Velazques *et al.* (1999) testando 390 amostras de soro, observaram que 22 delas continham anticorpos que reagiram com *R. akari*, duas reagiram com *R. akari* e *R. rickettsii* e, duas reagiram com *R. akari* e *R. typhi*, através do teste de RIFI.

Ripoll *et al.* (1999), também avaliaram soros de pacientes suspeitos de febre maculosa cujos anticorpos reagiram com antígenos de *R. rickettsii*, *R. typhi* e *Ehrlichia chaffensis*, também através do teste de RIFI.

Calic (1996) estudando 671 amostras de soro provenientes de pacientes de várias cidades do Estado de Minas Gerais com suspeita clínica de febre maculosa, comparou o teste de WF com os testes de RIFI e ELISA e constatou que os antígenos *Proteus* OX₂ e OX₁₉ podem ser usados como teste de triagem para a febre maculosa.

Pesquisa na hemolinfa de *A. cajennense* coletados em áreas endêmicas para a febre maculosa em São Paulo indicou positividade para rickettsias do GFM empregando RIFI (Lemos, 2002). Ainda neste mesmo Estado, rickettsias detectadas neste carrapato foram tipificadas como do sorotipo *R. rickettsii* através da microimunofluorescência (Philip *et al.*, 1978), citado por Nascimento e Schumaker (2004).

A técnica de centrifugação em "shell-vial" com estabelecimento em cultura de células Vero tem sido descrita como um confiável e eficiente método para o isolamento de rickettsias do GFM a partir da hemolinfa de carrapatos infectados ou sangue de pacientes com suspeita clínica de febre maculosa. Kelly *et al.* (1991) utilizando essa técnica para isolar rickettsias de sete carrapatos positivos no teste de hemolinfa, conseguiram estabelecer quatro das cinco infecções por rickettsias em cultura de células Vero.

Melles *et al.* (1999) estabeleceram um método de isolamento de rickettsias em cultura de células Vero com amostra padrão de *R. rickettsii*, cepa Sheyla Smith. A identificação foi feita através de RIFI sendo constatada a presença de microrganismos verdes fluorescentes no interior do citoplasma das células caracterizando o crescimento do agente.

Em uma pesquisa realizada com 75 lotes de carrapatos adultos de *A. cajennense* coletados na região de Campinas em São Paulo, Nascimento (2003) detectou genes rickettsiais (*gltA* e/ou *ompA*) em 29% deles, obtendo sucesso no cultivo em células Vero pelo sistema "shell vial" em 6%.

A reação em cadeia de polimerase (PCR) é também um método novo e promissor para a identificação de uma variedade de microrganismos, incluindo as rickettsias. Sexton *et al.* (1994) realizaram PCR para amplificação ribossomal do DNA de *R. rickettsii* em amostras de sangue e urina de dez pacientes com suspeita clínica de febre maculosa, tendo sido detectada em quatro deles.

Billings *et al.* (1998) detectaram pela primeira vez nos Estados Unidos, em carrapatos da espécie *A. cajennense*, rickettsias do GFM utilizando a técnica de PCR.

Em municípios da região de Campinas em São Paulo, Horta (2002) identificou rickettsias do GFM em larvas e adultos de *A. cajennense* coletados em áreas endêmicas, através do seqüenciamento parcial do gene da proteína 17kDa, não tendo sido possível a amplificação de outros genes testados.

Labruna *et al.* (2004a) detectaram DNA de *Rickettsia bellii* em 16 exemplares da espécie *A. dubitatum* e em outros três exemplares da mesma espécie foram detectadas rickettsias do GFM, possivelmente, *R. parkeri*, *R. africae* e *R. sibirica*. Em todas as análises de DNA foi utilizada a técnica de PCR.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local e duração do experimento

O presente trabalho foi realizado na fazenda da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Centro Nacional de Pesquisa em Gado de Leite (Embrapa – CNPGL) no Campo Experimental de Coronel Pacheco (21°35' S, 43°15' W), Minas Gerais, Brasil, a 435 m de altitude, de novembro de 2003 a maio de 2004, época na qual os carrapatos *A. cajennense* e *A. dubitatum* se encontravam na fase adulta de seu ciclo de vida. A região apresenta uma estação seca de abril a setembro e uma estação chuvosa de outubro a março, com temperaturas variando de 16°C no inverno a $\geq 23^\circ\text{C}$ no verão (Antunes, 1986). É uma área de várzea recortada em toda sua extensão por um córrego, no qual quase sempre é possível se observar trilhas e grupos de capivaras atraídas pela disponibilidade de alimento traduzidas nas plantações de milho e cana-de-açúcar do campo experimental. Nos campos gramados há a presença de bovinos de leite e em alguns pontos, alguns bovinos mestiços, bem como cavalos que auxiliam no trabalho diário da fazenda, seja puxando carroças ou para montaria dos peões. Também não é raro de se ver alguns cães errantes perambulando pela área. Dessa forma, o referido local foi escolhido em virtude de haver a presença de bovinos, eqüinos, canídeos e capivaras convivendo na mesma região e pela confirmação laboratorial recente de um caso de febre maculosa na referida área.

A segunda parte do experimento, que compreende os exames laboratoriais, foi realizada no Laboratório de Parasitologia da sede da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, Minas Gerais, e no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de São Paulo (USP). Na Embrapa foram realizados os teste de hemolinfa nos carrapatos, concomitantemente, com as coletas destes, ou seja, no período de novembro de 2003 a maio de 2004. Já na USP foram realizados os testes

biomoleculares no período de julho a agosto de 2004.

3.2 Coleta de carrapatos

Os adultos de vida livre de carrapatos *A. cajennense* e *A. dubitatum* foram capturados do ambiente segundo a técnica empregada por Oliveira (1998) com algumas pequenas modificações. Utilizou-se 500 g de gelo seco em pequenos pedaços como fonte de dióxido de carbono, colocados no interior de uma caixa de isopor de dois litros e com quatro orifícios laterais de 0,5 cm de diâmetro. Esta caixa foi exposta durante uma hora sobre uma flanela branca medindo 100 cm de largura por 100 cm de comprimento (1,0 m² de área) estendida na pastagem nos dias de coleta. Vez por outra o gelo seco era soprado no intuito de aumentar a área de expansão do dióxido de carbono e, conseqüentemente, atrair mais carrapatos para o local. Foi utilizado um total de quatro armadilhas dispostas em pontos estratégicos na pastagem. Nas bordas da flanela foi colocada vaselina líquida para que os carrapatos ali atraídos não pudessem escapar. Os carrapatos foram então recolhidos e acondicionados em sacos plásticos para posterior identificação dos exemplares em laboratório. As coletas seriam realizadas a cada 15 dias, mas em virtude das adversidades climáticas os intervalos tiveram de ser alterados e as coletas ocorreram nos dias: 30/11/2003, 04/12/2003, 05/01/2004, 13/02/2004, 20/02/2004, 26/03/2004, 16/04/2004, 23/04/2004, 13/05/2004.

3.3 Identificação do material

Após cada captura na pastagem, os carrapatos foram acondicionados em sacos plásticos e conduzidos ao Laboratório de Parasitologia da sede da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, Minas Gerais, para separação e identificação dos exemplares. A identificação foi feita com o auxílio de um microscópio estereoscópio utilizando a chave de identificação de Aragão e Fonseca (1961), após lavagem dos exemplares em água corrente e secagem em papel toalha.

3.4 Teste de hemolinfa

Os testes de hemolinfa também foram realizados no Laboratório de Parasitologia da sede da Embrapa Gado de Leite em Juiz de Fora, Minas Gerais. Antes da realização do teste de hemolinfa, no entanto, os carrapatos foram colocados em uma estufa a 35°C e UR ≥80% por três a quatro dias, para incrementar a multiplicação de rickettsias. A partir daí, os carrapatos foram processados individualmente, segundo a técnica descrita por Burgdorfer (1970). Cortou-se a porção distal do primeiro par de patas de cada carrapato e coletou-se uma gota da hemolinfa em lâminas de vidro. As lâminas passaram pelo processo de secagem sem o uso de qualquer fixador para que não atrapalhasse a visualização de rickettsias e, só então foram coradas pelo método de Giménez (Giménez, 1964). As lâminas foram deixadas na solução de trabalho de fucsina básica fenolada por cerca de 1 a 2 minutos e, posteriormente, lavadas em água corrente. Depois foram imersas na solução de oxalato de verde de malaquita cerca de 9 segundos, foram lavadas e mais uma vez imersas no verde de malaquita por 9 segundos. A seguir, foram lavadas novamente e secas em papel absorvente. As lâminas foram então examinadas em microscópio óptico utilizando-se objetiva de imersão (100x).

Após realização do teste de hemolinfa, os carrapatos foram congelados a -80°C até processamento para isolamento de rickettsias ou análise pela reação em cadeia de polimerase (PCR).

3.5 Análise pela reação em cadeia de polimerase (PCR)

Os carrapatos negativos no teste de hemolinfa foram processados de acordo com a técnica descrita por Labruna *et al.* (2004a) para análise pela PCR no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP em São Paulo. Para o procedimento de extração de DNA, os exemplares foram divididos em *pools* de três carrapatos e utilizou-se o *Dneasy tissue kit* (Qiagen, Chatsworth, Califórnia) de acordo

com o protocolo do fabricante para isolamento de DNA de amostras de sangue animal. Nos *ependorfs* contendo 20 µl de proteinase K e 180 µl de PBS (fosfato buffer salina), foram colocados os *pools* de carrapatos e procedeu-se à trituração destes com auxílio de uma agulha estéril. A seguir, realizou-se a maceração com o auxílio de uma ponteira de micropipeta. Foram adicionados 200 µl de Buffer AL em cada *ependorf* e estes foram levados ao vortex por 30 segundos. Após incubação por 10 minutos a 70°C, foram adicionados a cada tubo 200 µl de etanol e estes foram levados ao vortex por 30 segundos. Pipetou-se todo o conteúdo dos *ependorfs* e este foi repassado para os *Dneasy spin column*. Foram centrifugados por 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ (8000 rpm). Os *Dneasy spin column* foram então repassados para tubos coletores de 2 ml aos quais foram adicionados 500 µl de Buffer AW1 e levados para centrifugação por 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ (8000rpm). Os *Dneasy spin column* foram novamente repassados para novos tubos coletores de 2 ml aos quais foram adicionados 500 µl de Buffer AW2 e levados para centrifugação por 3 minutos na rotação máxima. A seguir, os *Dneasy spin column* foram repassados para *ependorfs* aos quais foram adicionados 200 µl de Buffer AE. Após incubação por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugação por 1 minuto a $\geq 6000 \times g$ (8000rpm), os *Dneasy spin column* foram descartados e os *ependorfs* identificados.

Inicialmente, para a realização da PCR, todas as amostras de carrapatos foram processadas com *primers* CS-5 e CS-6, designados para amplificar um fragmento de 147 pares de base do gene citrato-sintase (*gltA*) de *Rickettsia spp.* A PCR foi realizada com 50 µl por reação, que continham 25 µl de PCR iQSupermix (Bio-Rad, Hercules, Calif.), 2 µl de cada *primer* a 15 µM, 1,5 µl de MgCl₂, 14,5 µl de água µQ (ultra pura) e 5 µl da amostra a ser testada. As amostras foram levadas ao termociclador (Gene Amp PCR System 2700) nas seguintes condições: 1 ciclo a 95°C por 2 minutos, seguido por 50 ciclos de 15 segundos a 95°C, 30 segundos a 50°C, e 30 segundos a 60°C. Para cada reação, dois controles

negativos (com 5 µl de água µQ cada) e um controle positivo (com 300 ng de DNA de células Vero infectadas com *Rickettsia sibirica*) foram incluídos. Mais tarde, para amostras positivas, a PCR também foi realizada utilizando os *primers* 17-kDa e *ompA* (maior proteína de membrana externa) utilizando a mesma técnica descrita acima. Dez microlitros dos produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corados com brometo de etídeo e examinados em luz ultravioleta.

3.6 Dados meteorológicos

Dados climáticos referentes à temperatura do ar (mínimas, médias e máximas), índices pluviométricos e umidade relativa foram fornecidos pela Estação Meteorológica (Agroclimatológica) de Coronel Pacheco, Minas Gerais, n° 83037, do 5° DISME (Distrito de Meteorologia), durante o período de novembro de 2003 a maio de 2004.

3.7 Análise dos dados

Não foi realizada estatística, apenas uma análise descritiva dos dados coletados.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Dados meteorológicos

Os dados climáticos mensais relativos às temperaturas médias (mínimas, médias e máximas), umidade relativa e precipitação pluviométrica para o município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, durante o período do experimento, são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente. A região apresenta características de verão chuvoso e inverno seco. As temperaturas médias nos meses mais frios são inferiores a 18°C e nos meses mais quentes superiores a 22°C, típicas de clima do tipo Cwa segundo à classificação de Köppen (Antunes, 1986).

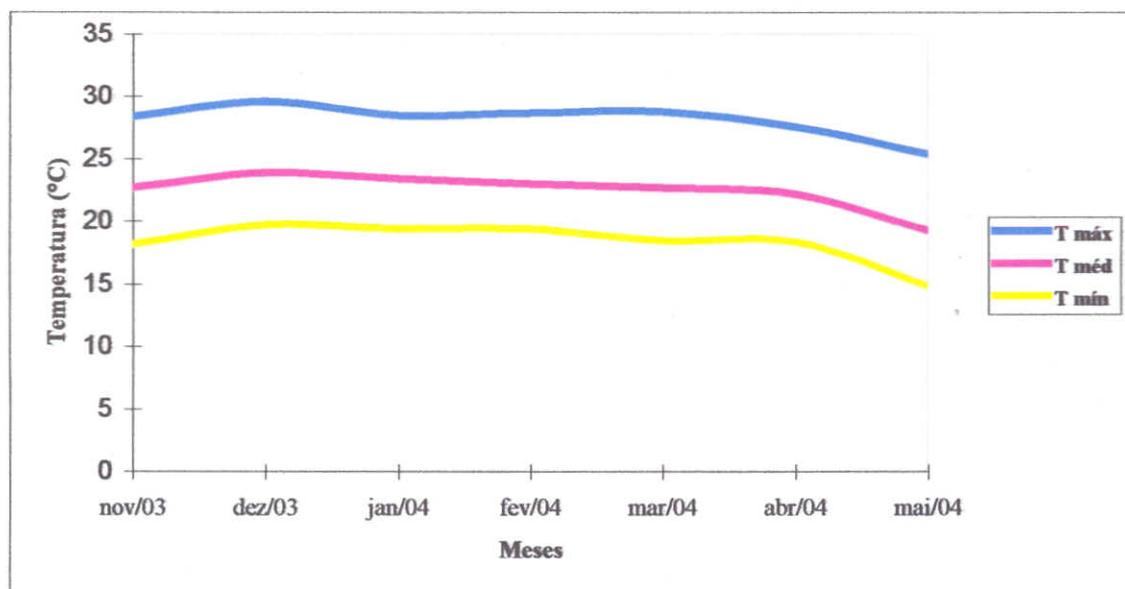


Figura 1 - Temperaturas máximas, médias e mínimas observadas no município de Coronel Pacheco, MG, no período de novembro de 2003 a maio de 2004.

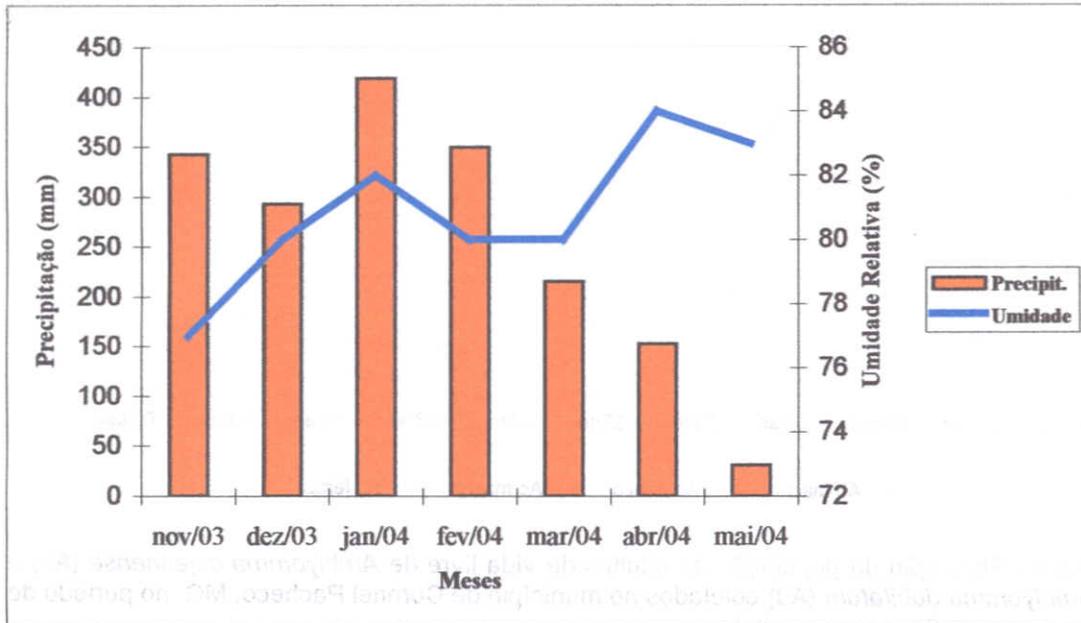


Figura 2 - Umidade relativa do ar e índices pluviométricos no município de Coronel Pacheco, MG, no período de novembro de 2003 a maio de 2004.

Como se pode notar, houve grande adversidade climática na área estudada que se traduziu em chuvas torrenciais durante todo o período do experimento, em especial, nos meses de novembro de 2003 e, janeiro e fevereiro de 2004. No período de janeiro, inclusive, foi declarado no município de Coronel Pacheco, em virtude da destruição massiva provocada pelas águas, estado de calamidade pública no local. Dessa forma, as coletas de carrapatos que estavam previstas para serem realizadas a cada 15 dias, a partir do mês de outubro de 2003, só puderam ser iniciadas no final de novembro desse ano e naqueles poucos dias em que não se estava chovendo no local, o que dificultou enormemente a amostragem de carrapatos. Por este motivo foi reduzido o número de exemplares coletados. O término das coletas que estava previsto para abril de 2004 também foi prorrogado para maio desse mesmo ano, pois nesse mês as chuvas haviam diminuído sobremaneira e ainda era possível de se encontrar alguns exemplares adultos de *A. cajennense* nas pastagens.

4.2 Flutuação da população da fase de vida livre de adultos de *Amblyomma cajennense* e de *Amblyomma dubitatum*

Adultos de vida livre de *A. cajennense* e de *A. dubitatum* foram capturados na pastagem, através de armadilhas de gelo seco no período de novembro de 2003 a maio de 2004. Foram realizadas nove coletas durante o experimento, com um total de 156 exemplares de carrapatos recuperados. Embora não tenha havido uma estreita relação entre o perfil de distribuição de exemplares de *A. cajennense* e de *A. dubitatum* durante os meses de execução do experimento, o número total de carrapatos colhidos nas pastagens foi exatamente o mesmo para as duas espécies ao final do período, 78 para cada uma delas. A Figura 3 mostra a flutuação da população de adultos de vida livre de *A. cajennense* e de *A. dubitatum* coletados no referido período.

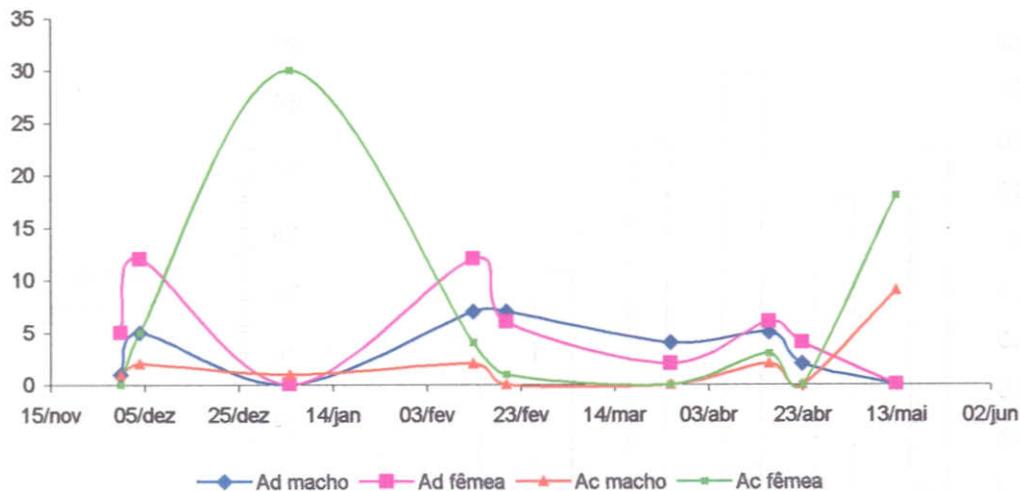


Figura 3 - Flutuação da população de adultos de vida livre de *Amblyomma cajennense* (Ac) e de *Amblyomma dubitatum* (Ad) coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de novembro de 2003 a maio de 2004.

Notou-se a ocorrência de picos do número de fêmeas de *A. cajennense* nas pastagens em janeiro e maio. Não foram recuperados exemplares das pastagens no mês de março e em uma das coletas de abril. O número de machos (17) foi menor em relação ao número de fêmeas (61) coletadas resultando numa proporção de um macho para 3,5 fêmeas.

Estes resultados são, em parte, compatíveis com alguns trabalhos relacionados com a flutuação da população da fase adulta de *A. cajennense*. Guglielmone *et al.* (1990) na Argentina descreveram a maior ocorrência de adultos entre novembro e janeiro. Souza e Serra-Freire (1994a) no Rio de Janeiro encontraram as maiores infestações nas pastagens por esse estágio, de janeiro a abril no primeiro e segundo ano de seu experimento. Lemos *et al.* (1997) em Pedreira, São Paulo, observaram a presença desse estágio principalmente entre os meses de fevereiro e abril. Oliveira *et al.* (2000) em Pedro Leopoldo, Minas Gerais, observaram picos desse estágio em janeiro/fevereiro de 1996 e janeiro/fevereiro de 1997. No entanto, estes dados discordam de Serra-Freire (1982) que encontrou esse estágio durante todos os meses do ano, embora seu experimento

tenha sido realizado em ano atípico, assim referido pelo autor. Esse aumento da população de adultos de vida livre de *A. cajennense* no mês de janeiro de 2004, se deve principalmente à colocação de equinos para pastejo próxima à área de coleta de carrapatos e pelos elevados índices de umidade relativa e de precipitação pluviométrica no referido período.

Com relação à proporção macho: fêmea de 1:3,5 para o dado período, este resultado difere de alguns trabalhos citados na literatura. Diaz *et al.* (1988) observaram, em condições controladas, o predomínio de machos sobre fêmeas de *B. microplus*, eclodidos de ovos obtidos até o terceiro dia de postura. No entanto, estes pesquisadores constataram também uma inversão no quociente sexual após alguns dias. Labruna *et al.* (2002) também encontraram um maior número de machos em relação às fêmeas, porém em vida parasitária em equinos. O maior número de fêmeas nas pastagens deve-se, possivelmente, ao fato de que os machos permanecem por mais tempo no hospedeiro para que este faça seu repasto sanguíneo, amadurecimento sexual e produção de feromônios facilitando o encontro e a fixação sobre o hospedeiro de fêmeas que

se encontram nas pastagens. Dessa forma, haverá um maior número de machos parasitando mais cedo os animais e, conseqüentemente, um maior número de fêmeas permanecerá nas pastagens. Estes achados concordam com os de Gladney (1971) que demonstrou que a taxa de fixação de fêmeas de *A. maculatum* é influenciada pela presença de machos da mesma espécie. Pinter *et al.* (2002) relataram que períodos parasitários prolongados de machos sobre o hospedeiro podem ter implicações importantes, fazendo com que o hospedeiro se torne mais atrativo para as fêmeas não alimentadas. Oliveira (2004) observou uma elevação nas contagens de machos sobre o número de fêmeas, parasitando eqüinos, já no final da estação do inverno.

Com relação a *A. dubitatum*, observou-se que a presença de exemplares foi relativamente estável durante todo o período de coletas, exceto em janeiro e maio onde nenhum exemplar foi recuperado das pastagens. O número de machos (31) foi sensivelmente menor que o número de fêmeas (47) resultando numa relação de um macho para 1,5 fêmea.

Estes resultados corroboram os de Guglielmo e Hadani (1982) na Argentina que encontraram maior proporção de carrapatos adultos durante o verão. Souza e Serra-Freire (1994b) no Rio de Janeiro também observaram que as maiores infestações das pastagens por estádios adultos se deram nos meses de fevereiro a abril. O fato de não terem sido coletados carrapatos dessa espécie no mês de janeiro deve-se, provavelmente, ao aumento da umidade do ar e dos índices pluviométricos que elevaram o nível de água do açude que corta o Campo Experimental de Coronel Pacheco, destruindo plantações, principalmente as de milho e cana-de-açúcar afastando, dessa forma, as capivaras para outras áreas menos alagadiças. Diga-se de passagem, que nesse período foi decretado estado de calamidade pública em Coronel Pacheco em virtude da destruição causada pelas chuvas. Sabe-se também que a regulação do ciclo de vida destes carrapatos está intimamente

relacionada ao efeito da temperatura ambiente. Sendo assim, podem ter seu metabolismo reduzido até que as condições tornem-se novamente propícias à sua atividade normal. A ausência de exemplares no mês de maio, por sua vez, é devida ao decréscimo natural de estádios adultos nesse período dando lugar ao aparecimento dos estádios larvais.

Com relação à proporção macho: fêmea de 1:1,5 observada neste período, mostra que se afastou 50% da proporção 1:1 descrita na literatura. Diaz *et al.* (1988) observaram a proporção sexual de 1 macho para 1,2 fêmeas de *B. microplus*. Davey e Cooksey (1988) também constataram em um grande número de ixodídeos que a relação macho: fêmea estava em torno de 1:1.

4.3 Teste de hemolinfa

Não foi possível a realização do teste de hemolinfa com todos os carrapatos coletados, em virtude de problemas técnicos que causaram a morte de alguns espécimes devido a uma falha de controle da temperatura da estufa em que eram mantidos os carrapatos antes da realização do teste. Dos 131 exemplares testados (85% dos carrapatos coletados), todos se apresentaram negativos para a presença de microrganismos semelhantes à rickettsia. Entretanto, também foram observados problemas operacionais em relação à execução do método nas condições laboratoriais existentes. Excesso de coloração das lâminas, mesmo de acordo com a ordenação do protocolo e a rápida deterioração do corante foram os pontos críticos mais evidentes no uso desta técnica.

Rozental *et al.* (2002), por sua vez, submeteram 153 ixodídeos coletados em seu experimento ao teste de hemolinfa e encontraram uma ninfa de *Amblyomma sp.* com partículas semelhantes a rickettsia no núcleo e no citoplasma dos hemócitos e um adulto de *Rhipicephalus sanguineus* com visualização de microrganismos semelhantes a rickettsias no citoplasma. Labruna *et al.* (2004a) encontraram em 12 carrapatos da espécie *A. dubitatum* microrganismos semelhantes à rickettsia dentro de

hemócitos. No entanto, fato semelhante ocorreu, já que outros 20 carrapatos foram negativos e oito apresentaram resultados inconclusivos porque as células da hemolinfa foram completamente perdidas durante os procedimentos de lavagem do teste. Pinter *et al.* (2004) também submetem 669 exemplares de *A. aureolatum* ao teste de hemolinfa para pesquisa de rickettsias e, assim como neste experimento, tiveram perdas (264 carrapatos) em virtude de falhas técnicas no momento da execução do teste.

4.4 Isolamento de rickettsias

Como todos os testes de hemolinfa realizados apresentaram resultados negativos, o procedimento de isolamento de rickettsias em cultura de células Vero não foi realizado neste experimento.

4.5 Análise pela reação em cadeia de polimerase (PCR)

Como todos os carrapatos testados pelo teste de hemolinfa foram negativos, todos foram analisados pela PCR. Os espécimes foram divididos em *pools* de três carrapatos totalizando 26 amostras de *A. cajennense* e 26 amostras de *A. dubitatum*. Apenas um *pool* de três fêmeas de *A. cajennense* (3,84%) foi positivo para os primers *gltA*, 17-kDa e *ompA*. O gene *gltA* tem sido detectado em todas as espécies de rickettsias. O gene *ompA*, por sua vez, ocorre somente em rickettsias do GFM (Labruna *et al.*, 2004a). O seqüenciamento de DNA do fragmento amplificado mostrou 100% de similaridade com a seqüência correspondente de *R. rickettsii* no Gen Bank tanto para o gene *gltA* como para o *ompA*, como mostram os Anexos 1 e 2, respectivamente.

Resultados semelhantes já haviam sido obtidos por Billings *et al.* (1998), que detectaram rickettsias do GFM, a partir de um *pool* de carrapatos da espécie *A. cajennense* utilizando primers específicos para o gene 17-kDa. Essa foi a primeira vez que rickettsias do GFM foram detectadas em *A. cajennense* no Texas e nos Estados Unidos. Fournier *et al.* (2002) determinaram

também através da PCR, seis isolados japoneses de rickettsias do GFM utilizando primers específicos para os genes 16S rDNA e *gltA*, a partir de seis espécies diferentes de carrapatos. Pinter (2003) em Mogi das Cruzes, São Paulo, investigou genes rickettsiais através da PCR em carrapatos da espécie *A. aureolatum* coletados em cães e confirmou a presença de *R. rickettsii* em 3,2% dos analisados. Outra amostra isolada entre as décadas de 30 e 40, provavelmente de *A. aureolatum*, foi analisada geneticamente por Eremeeva *et al.* (2003), citada por Nascimento e Schumaker (2004), através de PCR e apresentou similaridade com *R. rickettsii*. As cepas caracterizadas neste estudo encontram-se depositadas em laboratório norte-americano.

De Rodaniche (1953), por sua vez, isolou uma cepa altamente virulenta de *R. rickettsii* de um grupo de 11 adultos de *A. cajennense* na região de Caimito, Panamá sem, no entanto, utilizar metodologia biomolecular. O mesmo ocorreu com Patino-Camargo (1941) em Tobia na Colômbia e Bustamante e Varela (1946) em Vera Cruz no México.

A taxa de infecção de carrapatos deste estudo em torno de 3,84% corrobora os dados obtidos por Pereira e Labruna (1998) que mostram uma prevalência variável entre 0,14% e 13,5%, de carrapatos infectados tanto em áreas consideradas endêmicas como em áreas sem relatos de casos humanos de febre maculosa. Reforçam também os relatos de Niebylski *et al.* (1999) sobre o efeito letal de *R. rickettsii* para seu carrapato vetor.

Até o momento, a análise de seqüência gênica não havia permitido o diagnóstico de *R. rickettsii* de forma conclusiva em carrapatos *A. cajennense* coletados em regiões endêmicas. Dessa forma, esse trabalho mostra pela primeira vez a caracterização molecular de *R. rickettsii* isolada de *A. cajennense* no Estado de Minas Gerais e, ao que se sabe, no Brasil e América Latina.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que *A. cajennense* e *A. dubitatum* estão presentes na área em questão, em virtude de haver a presença de bovinos, eqüinos, caninos e capivaras convivendo na mesma região. Baixas taxas de infecção por rickettsias do GFM foram observadas nos exemplares coletados, no entanto, apenas um reduzido número de carrapatos foi testado. Há que se levar em conta que o efeito letal dessas bactérias para seu carrapato vetor é um fator relevante. Há a hipótese também de que nessa área *A. cajennense* possa ser mais suscetível que *A. dubitatum* às infecções por *R. rickettsii*. As condições climáticas também podem interferir sobremaneira nos resultados, já que na área em questão, foram totalmente atípicas em relação a outros anos.

De qualquer forma, como o número de carrapatos estudados foi pequeno, há necessidade de se fazer novos levantamentos na região. Assim, poder-se-á manter uma vigilância epidemiológica adequada com levantamento das populações de carrapatos e das rickettsioses que os acompanham.

6 CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos por meio deste estudo, conduzido no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, no período de novembro de 2003 a maio de 2004, concluiu-se que:

- Apesar do número de carrapatos coletados ter sido reduzido e os testes de hemolinfa terem sido negativos para os carrapatos examinados, há comprovação biomolecular da circulação de *R. rickettsii* nas populações de carrapatos *A. cajennense* da área em questão.
- Os resultados não são suficientes para sustentar o papel de *A. dubitatum* na ecologia de *R. rickettsii* na área estudada, pelo menos para o referido período.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.T.S.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Life cycle of females of *Amblyomma cooperi* (Nuttal & Waburton, 1908) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.53, n.3, p.316-320, 2001.
- ANTUNES, F.Z. Caracterização climática do Estado de Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, v.12, n.138, p.9-13, 1986.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.59, n.2, p.115-129, 1961.
- BILLINGS, A.N.; YU, X.J.; TEEL, P.D.; WALKER, D.H. Detection of a spotted fever group rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. *J. Med. Entomol.*, v.35, n.4, p.474-478, 1998.
- BURGDORFER, W. The hemolinf test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.19, n.6, p. 1010-1014, 1970.
- BUSTAMANTE, M.E.; VARELA, G. Estudios de fiebre manchada en México. Hallazgo del *Amblyomma cajennense* naturalmente infectado, en Veracruz. *Rev. Inst. Salub. y Enf. Trops.*, v.7, p.75-78, 1946.
- CALIC, S.B. *Comparação do teste de Weil Felix com as provas de imunofluorescência indireta e ensaio imunoenzimático como método de triagem para a febre maculosa*. 1996. 75f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte.
- CHACÓN, S.C.; BARBIERI, F.S.; FACCINI, J.L.H. Efeito de três temperaturas sobre a fase não parasitária de larvas ingurgitadas de *Amblyomma cooperi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro: 2002. (CD room).

COSTA, P.S.G. Evidências sorológicas de infecções por *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella quintana*, *Bartonella henselae* e *Ehrlichia chaffeensis* em indivíduos sadios e pacientes febris com e sem AIDS da região de Juiz de Fora, Minas Gerais. 2004. Tese (Doutorado em Medicina). Escola de Medicina da UFMG. Belo Horizonte.

CUNHA, D.W. Estudos da toxidez de alguns carrapatos comumente encontrados no Brasil (Acarina: Ixodidae). 1979. 88f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

CUNHA, D.W. Aspectos do ciclo biológico (fase parasitária), variação estacional e efeito de diferentes graus de sangue sobre o parasitismo por *Amblyomma cajennense* em bovinos leiteiros do Estado do Rio de Janeiro. 1986. 82f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

DAVEY, R.B.; COOKSEY, L.M. Sex ratios of *Boophilus* ticks (Acari: Ixodidae) reaching adulthood on cattle. *J. Med. Entomol.*, v.25, n.2, p.82-84, 1988.

DE RODANICHE, E.C. Natural infection of the tick, *Amblyomma cajennense*, with *Rickettsia rickettsii* in Panama. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.2, n.4, p.696-699, 1953.

DEL GUERCIO, V.M.F.; ROCHA, M.M.M.; MELLES, H.H.B.; LIMA, V.C.L.; PIGNATTI, M.G. Febre maculosa no Município de Pedreira, SP, Brasil. Inquérito sorológico. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, n.3, p.181-135, 1997.

DIAS, E.; MARTINS, A.V. Spotted fever in Brazil. *Am. J. Trop. Med.*, v.19, p.103-108, 1939.

DIAZ, G.; DE LA VEJA, R.; SUARDÍAZ, B. Proporción sexual em *Boophilus microplus* (Ixodoidea: ixodidae). *Rev. Salud. Anim.*, v.10, p.365-368, 1988.

ELLIOT, L.B.; FOURNIER, B.V.; TELTOW, G.L. *Rickettsia* in Texas. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.590, p.221-226, 1990.

EREMEEVA, M.E.; KLEMT, R.M.; SANTUCCI-DOMOTOR, L.A.; SILVERMAN, D.J.; DASCH, G.A. Genetic analysis of isolates of *Rickettsia rickettsii* that differ in virulence. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v.990, p.717-722, 2003.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J.M.; GUGLIELMONE, A.A. *Amblyomma dubitatum* Neumann: description of nymph and redescription of adults, together with the description of the imatures stages of *Amblyomma triste* Koch. *Acarologia*, v.42, p.323-333, 2002.

FIGUEIREDO, L.T.; BADRA, S.J.; PEREIRA, L.E.; SZABA, M.P. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.32, n.6, p.613-619, 1999.

FOURNIER, P.E.; FUJITA, H.; TAKADA, N.; RAOULT, D. Genetic identification of rickettsiae isolated from ticks in Japan. *J. Clin. Microb.*, v.40, n.6, p.2176-2181, 2002.

FREITAS, L.H.T.; CHACÓN, S.C.; BARBIERI, F.S.; FACCINI, J.L.H. Relação entre peso e o número de larvas e ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cooperi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro: 2002a. (CD room).

FREITAS, L.H.T.; CHACÓN, S.C.; BARBIERI, F.S.; FACCINI, J.L.H. Relação entre alguns parâmetros biológicos de ninfas ingurgitadas e o sexo de *Amblyomma cooperi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro: 2002b. (CD room).

GIMÉNEZ, D.F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Techn.*, v.39, p.135-140, 1964.

GLADNEY, W.J. Mate-seeking by female *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) on a bovine. *Nature*, v.232, p.401-402, 1971.

GUGLIELMONE, A.A.; HADANI, A. *Amblyomma* ticks found on cattle in the northwest of Argentina. *Ann. Parasitol.*, v.57, n.1, p.91-97, 1982.

GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; AGUIRRE, D.H.; GAIDO, A.B. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle in Salta, northwest Argentina. *Vet. Parasitol.*, v.35, p.93-101, 1990.

HORTA, M.C. *Pesquisa de infecção por rickettsia do grupo da febre maculosa em humanos, eqüídeos, caninos e em diferentes estádios de vida do Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787), provenientes de área endêmica do Estado de São Paulo*. 2002. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo.

KELLY, J.P.; RAOULT, D.; MASON, P.R. Isolation of spotted fever group Rickettsiae from triturated ticks using a modification of the centrifugation vial technique. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.85, p.397-398, 1991.

LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; FREITAS, C.M.V.; CARVALHO, H.A. Ciclo de vida de *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae). In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 10, 1997, Itapema, SC. *Anais...* Itapema, SC: 1997, p.147.

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. *Vet. Parasitol.*, v.105, p.65-77, 2002.

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. *J. Clin. Microb.*, v.42, n.1, p.90-98, 2004a.

LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; TEIXEIRA, R.H.F. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. *Experim. and Appl. Acarology*, v.32, p.79-88, 2004b.

LEMOS, E.R.S. *Aspectos epidemiológicos da rickettsiose do grupo da febre maculosa em uma área endêmica do Estado de Minas Gerais*. 1991. 159f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

LEMOS, E.R.S. Diseases in Brazil. *Virus Reviews and Res.*, v.7, p.7-16, 2002.

LEMOS, E.R.S.; MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; SANSEVERINO, S.R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted fever group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochoerus hydrochaeris* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.91, n.3, p.273-275, 1996.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R.; GUIMARÃES, M.A.A.; FREIRE, N.M.S.; AMORIM, M.; GAZETA, G.S. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.30, n.3, p.181-185, 1997.

LIMA, V.L.C.; FIGUEIREDO, A.C.; PIGNATTI, M.G.; MODOLO, M. Febre maculosa no município de Pedreira – Estado de São Paulo – Brasil – relação entre ocorrência de casos e parasitismo humano por ixodídeos. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.28, n.2, p.135-137, 1995.

LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B.; OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; ZÉNON, B.R.; CARVALHO, H.A.; FREITAS, C.M.V.; VIEIRA, C.R. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.93, n.3, p.347-351, 1998.

- MACALUSO, K.R.; SONESHINE, D.E.; CERAUL, S.M.; AZAD, A.F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second rickettsia. *J. Med. Entomol.*, v.36, n.6, p.809-813, 2002.
- MADEIRA, A.; WIESBRICH, J. Surto de febre maculosa no Estado de Santa Catarina. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, s.1, p.364, 2004. (Resumo).
- MASSARD, C.A. *Ehrlichia bovis* (Donatien & Lestoquard, 1936). *Diagnóstico, cultivo in vitro e aspectos epidemiológicos em bovinos no Brasil*. 1984. 113f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- McDADE, J.E.; NEWHOUSE, V.F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.40, p.287-309, 1986.
- MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S.; LEMOS, E.R.S. Isolamento de rickettsia em cultura de células Vero. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.32, n.5, p.469-483, 1999.
- MORENO, E.C. *Incidência de ixodídeos em bovinos de leite e prevalência em animais domésticos da região metalúrgica de Minas Gerais*. 1984. 105f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte.
- NASCIMENTO, E.M.M. *Isolamento e detecção molecular de rickettsias do grupo da febre maculosa, a partir de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e espécimes biológicos humanos, procedentes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo*. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo.
- NASCIMENTO, E.M.M.; SCHUMAKER, T.T.S. Isolamento e identificação de rickettsias no Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, s.1, p.193-196, 2004.
- NIEBYLSKI, M.L.; PEACOCK, M.G.; SCHWAN, T.G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *Appl. Env. Microbiol.*, v.65, n.2, p.773-778, 1999.
- OLIVEIRA, P.R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e bioecologia. 1998. 120f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária da UFMG. Belo Horizonte.
- OLIVEIRA, P.R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, s.1, p.118-122, 2004.
- OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. Population dynamics of free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.*, v.92, n.4, p.295-301, 2000.
- PATINO-CAMARGO, L. Nuevas observaciones sobre um tecer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisferio americano. *Bol. de la Ofic. Sanit. Panamericana*, v.20, p.1112-1124, 1941.
- PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. Febre Maculosa: aspectos clínico-epidemiológicos. *Rev. Clín. Vet.*, ano 3, n.12, p.19-24, 1998.
- PHILIP, C.B.; BURGDORFER, W. Arthropod vectors as reservoirs of microbial disease agents. *Ann. Rev. Entomol.*, v.6, n.1, p.391-412, 1961.
- PINTER, A. *Aspectos epidemiológicos da febre maculosa em uma área endêmica no município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do ciclo de vida do vetor *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae)*. 2003. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Universidade de São Paulo, São Paulo.

- PINTER, A.; LABRUNA, M.B.; FACCINI, J.L.H. Feeding period of males and females of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions with special reference to sex ratio. *Vet. Parasitol.*, v.104, p.79-88, 2002.
- PINTER, A.; HORTA, M.C.; GENNARI, S.M.; LABRUNA, M.B. Infecção por *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia belli* em uma população de *Amblyomma aureolatum* no Estado de São Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, s.1, p.357, 2004. (Resumo).
- RIPOLL, C.M.; REMONDEGUE, C.E.; ORDONEZ, G.; ARAZAMENDI, R.; FUSARO, H.; HYMAN, M.J.; PADOCK, C.D.; ZAKI, S.R.; OLSON, J.G.; SANTOS-BUCH, C.A. Evidence of rickettsial spotted fever and ehrlichial infections in subtropical territory of Jujuy, Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.61, n.2, p. 350-354, 1999.
- ROBINSON, L.E. *The genus Amblyomma. Ticks, a monograph of the Ixodoidea*. Local: Cambridge University, v.2, parte VI, 1926. 302p.
- ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M.C.; AMORIM, M.; FREIRE, N.M.S.; LEMOS, E.R.S. Evidence of spotted fever group *Rickettsiae* in State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v.44, n.3, p. 155-158, 2002.
- SERRA-FREIRE, N.M. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*, v.5, n.2, p.187-193, 1982.
- SERRA-FREIRE, N.M. Alterações hematológicas em bovinos leiteiros holando/zebu induzidas por carrapato estrela (*Amblyomma cajennense*). *Hora Vet.*, v.4, n.22, p.45-48, 1984.
- SERRA-FREIRE, N.M.; BONILHA, P.C.; CAIAFA, R.M.; GAZETA, G.S.; CAVALCANTI, P.L. Avaliação da disponibilidade de estádios não parasitários de ixodídeos em pastagem submetida ao pastejo contínuo por bovinos. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*, v.13, n.1, p.37-43, 1990.
- SEXTON, D.J.; KANJ, S.S.; WILSON, K.; COREY, R.; HEGARTY, B.C.; LEVY, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B. The use of a polymerase chain reaction as a diagnostic test for rock mountain spotted fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.50, n.1, p.59-63, 1994.
- SILVA, L.J.; GALVÃO, M.A.M. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.13, s.1, p.197-198, 2004.
- SINKOC, A.L.; BRUM, J.G.W.; MULLER, G. Ocorrência de ixodidae parasitos de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) na Estação Ecológica do Taim, Rio Grande - RS, Brasil. *Ciência Rural*, v.27, p.119-122, 1997.
- SQUIRE, F.A. Entomological problems in Bolívia. *Pans.*, v.18, p.249-268, 1972.
- SOUZA, A.P.; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal dos estádios adultos de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.1, n.1, p.31-34, 1992.
- SOUZA, A.P.; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal da fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*, v.16, n.1, p.67-74, 1994a.
- SOUZA, A.P.; SERRA-FREIRE, N.M. Variação sazonal da fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* e *Boophilus microplus*, no município de Paracambi, RJ, Brasil. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*, v.16, n.1, p.57-65, 1994b.

SMITH, M.W. Some aspects of ecology and lifecycle of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) in Trinidad and their influence on tick control measures. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.69, n.1, p.121-129, 1975.

TEIXEIRA, F.M.; CHACÓN, S.C.; BARBIERI, F.S.; CARDOSO, A.C.B.; FACCINI, J.L.H. Efeito de diversas exposições à temperatura de 38,5°C sobre a fase de vida livre de larvas ingurgitadas de *Amblyomma cooperi*. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 12, 2002, Rio de Janeiro, RJ. *Anais...* Rio de Janeiro: 2002. (CD room).

TRAVASSOS, J.; VALLEJO-FREIRE, A. Comportamento de alguns cavideos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade desses cavideos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. *Mem. Inst. Butantã*, v.15, p.73-86, 1942.

UILENBERG, G.; BARRE, N.; CAMUS, E.; BURRIDGE, M.J.; GARRIS, G.I. Heartwater in the Caribbean. In: RIEMANN, H.P.; Burrige, M.J. Impact in the tropics. *Prev. Vet. Med.*, v.2, p.225-267, 1984.

ZAVALA-VELAZQUES, J.E.; RUIZ-SOSA, J.; VADO-SOLIS, I.; BILLINGS, A.N.; WALKER, D.H. Serologic study of the prevalence of rickettsiosis in Yucatán: evidence for a prevalent spotted fever group rickettsiosis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.61, n.3, p. 405-408, 1999.

8 ANEXOS

ANEXO 1

Seqüências obtidas do carrapato *A. cajennense* 3.3

Gene citrato sintase (*gltA*)

Seqüência (321 nucleotídeos):

5'-

ATTGCTTTACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAGTCTACTATCACCTATA
TAGACGGTGATAAAGGAATCTTGCAGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAA
AAGTGATTTTTAGAAAGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACACCAAGTGGCGAGCAGT
ATAATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTAT
TTCAGACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCAGGCTGTCGGTTCTCT
GCGGCATTTT-3'

Máxima % de similaridades com as seqüências disponíveis do Gen Bank:

- 1- *Rickettsia rickettsii* amostra Bitterroot (U59729): 100% (321/321)
- 2- *Rickettsia conorii* (AE008677): 99,1% (318/321)
- 3- *Rickettsia montanensis* (U74756): 99,1% (318/321)
- 4- *Rickettsia conorii* (U59730): 99,1% (318/321)
- 5- *Rickettsia honei* (U59726): 99,1% (318/321)

ANEXO 2

Seqüências obtidas do carrapato *A. cajennense* 3.3

Gene da proteína 190-kDa (*ompA*)

Seqüência (457 nucleotídeos):

5'-

CCGCTTTATTCACCACCTCAACCGCAGCGATAATGCTGAGTAGTAGCGGGGCACTCGGTG
TTGCTACAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTTAGTAATAATGTTGGCAATAATA
ATTGGAATGAGATAACGGCTGCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCGGTCCTCAA
ACAATTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACTGTCACTGCAGATGCAGCCGATCGTAT
TATTAAGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGTCTAAATATTACTCAAATACTG
TCGTTGGTTTCGATTATAACGAAAGGTAACCTGTTGCCTGTTACTCTTAATGCCGGCAAAGC
TTAACTTTAAATGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATGCGCCTGCCGATAA
TTATACAGGTTTAGGAAATATAGCTTT-3'

Máxima % de similaridades com as seqüências disponíveis do Gen Bank:

- 1- *Rickettsia rickettsii* (U43804): 100% (457/457)
- 2- *Rickettsia rickettsii* (M31227): 100% (457/457)
- 3- *Rickettsia rickettsii* amostra Hlp (AY319293): 99,6% (455/457)
- 4- *Rickettsia rickettsii* (U55822): 99,6% (455/457)
- 5- *Rickettsia slovaca* (U43808): 97,1% (444/457)
- 6- *Rickettsia africae* (U83436): 96,5% (441/457)