

**Elizângela Guedes**

**ESTUDO DE POPULAÇÕES DE *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) E PESQUISA DE *Rickettsia* spp. NESTAS ESPÉCIES EM CORONEL PACHECO, MINAS GERAIS**

**Tese apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal.**

**Área: Medicina Veterinária Preventiva**

**Orientador: Romário Cerqueira Leite**

**Belo Horizonte  
Escola de Veterinária – UFMG  
2009**

G924e Guedes, Elizângela, 1979-

Estudo de populações de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) e pesquisa de *Rickettsia* spp. nestas espécies em Coronel Pacheco, Minas Gerais / Elizângela Guedes. -2009.

69 p. : il.

Orientador: Romário Cerqueira Leite

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária

Inclui bibliografia

1. *Amblyomma cajennense* – Teses. 2. Carrapato como transmissor de doenças – Teses. 3. Rickettsioses – Teses. 4. Febre maculosa das montanhas rochosas – Teses. I. Leite, Romário Cerqueira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. III. Título.

CDD – 636.089 696 8





---

---

### DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Expedito e Maria Aparecida, 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.*

Dedico este trabalho.

---

---



---

*Posso ter defeitos, viver ansioso e ficar irritado algumas vezes,  
mas não esqueço de que minha vida é a maior empresa do mundo.  
E que posso evitar que ela vá à falência.  
Ser feliz é reconhecer que vale a pena viver  
apesar de todos os desafios, incompreensões e períodos de crise.  
Ser feliz é deixar de ser vítima dos problemas e  
se tornar um autor da própria história.  
É atravessar desertos fora de si, mas ser capaz de encontrar  
um oásis no recôndito da sua alma.  
É agradecer a Deus a cada manhã pelo milagre da vida.  
Ser feliz é não ter medo dos próprios sentimentos.  
É saber falar de si mesmo.  
É ter coragem para ouvir um 'não'.  
É ter segurança para receber uma crítica, mesmo que injusta.*

*Pedras no caminho?*

*Guardo todas, um dia vou construir um castelo...*

Fernando Pessoa

---





## **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 amizade, pela orientação e pelo desprendimento com que doou seus nobres conhecimentos a mim.

Ao Professor Paulo Roberto de Oliveira pelas nobres dicas que engrandeceram este trabalho.

À família “Parasitologista” da Escola de Veterinária da UFMG: Eduardo, Ana, Ari, Luísa, Carolina e Ricardo por compartilharem comigo de minhas aflições e alegrias.

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: Caio, Aline, Helder, Ana Elisa, Daniele, 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 grandes amigos que fiz no Laboratório “Carrapatos” do VPS da USP pelo agradável período que passamos juntos: Richard, Maurício, Jonas, Maria, Fernanda, Thiago, Guilherme, e em especial, Iara.

Aos amigos de república de BH: Carla, Sílvia, Leandro, Theonys, Jankerle, Aliny e Hayala, pela companhia durante essa caminhada.

À chefia da Embrapa Gado de Leite 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.

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 e Débora, pela contribuição ao longo da execução deste projeto.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro para execução deste trabalho (Processo CAG 1115/05)

À CAPES pela concessão de bolsa de estudo durante o curso.



---

## SUMÁRIO

---

	<b>RESUMO</b> .....	<b>19</b>
	<b>ABSTRACT</b> .....	<b>21</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....	<b>25</b>
2.1	Epidemiologia de <i>A. cajennense</i> .....	25
2.2	Epidemiologia de <i>A. dubitatum</i> .....	28
2.3	Epidemiologia de <i>R. rickettsii</i> .....	29
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
3.1	Local e duração do experimento .....	31
3.2	Animais do experimento .....	32
3.3	Coleta de estádios em vida livre .....	32
3.4	Coleta de estádios em vida parasitária .....	33
3.5	Identificação dos carrapatos .....	34
3.6	Teste de hemolinfa .....	34
3.7	Extração de DNA e análise pela PCR .....	36
3.8	Clonagem .....	37
3.9	Sequenciamento de DNA .....	38
3.10	Dados meteorológicos .....	39
3.11	Análise estatística .....	39
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>39</b>
4.1	Dados meteorológicos .....	39
4.2	Flutuação da população de larvas, ninfas e adultos de vida livre de <i>A. cajennense</i> e <i>A. dubitatum</i> .....	40
4.3	Flutuação da população de larvas, ninfas e adultos de vida parasitária de <i>A. cajennense</i> .....	45
4.4	Eficiência de armadilhas de CO <sub>2</sub> na coleta de estádios de vida livre de <i>A. cajennense</i> e <i>A. dubitatum</i> .....	49
4.5	Teste de hemolinfa .....	50
4.6	Análise pela PCR .....	50
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>53</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>54</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>60</b>

---



---

**LISTA DE TABELAS**

---

Tabela 1	Pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos genes de <i>Rickettsia</i> spp.....	37
Tabela 2	Total de larvas, ninfas e adultos de <i>A. cajennense</i> e <i>A. dubitatum</i> coletados por diferentes técnicas em Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008. ....	40
Tabela 3	Coleta de ninfas e adultos de vida livre de <i>A. cajennense</i> e <i>A. dubitatum</i> por técnicas de amostragem utilizando CO <sub>2</sub> , no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008 .....	50

---



---

**LISTA DE FIGURAS**

---

Figura 1	Localização do município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, área endêmica para FMB e local de coleta de carrapatos.....	32
Figura 2	Armadilhas de CO <sub>2</sub> .....	33
Figura 3	Fêmea e macho de <i>A. cajennense</i> .....	35
Figura 4	Fêmea e macho de <i>A. dubitatum</i> .....	35
Figura 5	Temperaturas máximas, médias e mínimas observadas no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	39
Figura 6	Umidade relativa do ar e índices pluviométricos no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	40
Figura 7	Flutuação da população de larvas e ninfas de vida livre de <i>Amblyomma</i> sp. coletadas no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	41
Figura 8	Flutuação da população de adultos de vida livre de <i>A. cajennense</i> e <i>A. dubitatum</i> coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	42
Figura 9	Flutuação da população de machos e fêmeas de <i>A. cajennense</i> em vida livre coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	43
Figura 10	Flutuação da população de machos e fêmeas de <i>A. dubitatum</i> em vida livre coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	43
Figura 11	Flutuação da população de larvas e ninfas de vida parasitária de <i>A. cajennense</i> coletadas no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	46
Figura 12	Flutuação da população de adultos de vida parasitária de <i>A. cajennense</i> coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	47
Figura 13	Flutuação da população de machos e fêmeas de <i>A. cajennense</i> em vida parasitária coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.....	47

---





---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>GFM</b>	grupo da febre maculosa
<b><i>et al.</i></b>	e colaboradores
<b>FMB</b>	febre maculosa brasileira
<b>FMMR</b>	febre maculosa das montanhas rochosas
<b>Embrapa</b>	Empresa de Pesquisa Agropecuária
<b>CECP</b>	Campo Experimental de Coronel Pacheco
<b>FMVZ</b>	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
<b>S</b>	south
<b>W</b>	west
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>%</b>	por cento
<b>°C</b>	graus Celsius
<b>cm</b>	centímetro
<b>m</b>	metro
<b>m<sup>2</sup></b>	metro quadrado
<b>g</b>	gramas
<b>DNA</b>	ácido desoxirribonucléico
<b>PCR</b>	reação em cadeia de polimerase
<b>TE</b>	tampão Tris-HCl-EDTA
<b>Tris</b>	tris (hidroximetil) amino metano
<b>HCl</b>	cloreto de hidrogênio
<b>EDTA</b>	ácido etileno diamino tetracético
<b>pH</b>	potencial hidrogeniônico
<b>GT</b>	isotiocianato de guanidina
<b>µl</b>	microlitro
<b>ml</b>	mililitro

<b>M</b>	molar
<b>mM</b>	milimolar
<b>pmoles</b>	picomoles
<b>ng</b>	nanogramas
<b>g</b>	gravidade terrestre
<b>rpm</b>	rotações por minuto
<b>primers</b>	oligonucleotídeos iniciadores
<b>pb</b>	pares de base
<b>gltA</b>	gene citrato sintase
<b>OmpA</b>	outer membrane protein A
<b>OmpB</b>	outer membrane protein B
<b>dNTP</b>	dexoxinucleotídeo trifosfatado
<b>Taq</b>	<i>Termophilus aquaticus</i>
<b>NaCl</b>	cloreto de sódio
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloreto de magnésio
<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactosídeo
<b>IPTG</b>	isopropil-tio-β-D-galactosídeo
<b>BLAST</b>	basic local alignment search tool

## RESUMO

Devido à importância dos ixodídeos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* na epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira (FMB), o presente estudo avaliou a flutuação de populações de vida livre e de vida parasitária destas duas espécies de carrapatos, bem como a frequência de infecção de carrapatos por *Rickettsia* spp. em Coronel Pacheco, área de risco para ocorrência de FMB no Estado de Minas Gerais. Larvas de *Amblyomma* sp. foram capturadas da pastagem por arraste de flanela durante o período de maio a outubro de 2006, de fevereiro a novembro de 2007 e a partir de março de 2008. Apresentaram picos populacionais bem definidos sendo os maiores em maio de 2006, abril-maio de 2007, abril de 2008 e outubro-novembro de 2007. Larvas de *A. cajennense* foram capturadas em vida parasitária no período de maio a setembro de 2006, de março a setembro de 2007 e a partir de abril de 2008. Apresentaram picos populacionais bem definidos sendo os maiores em maio de 2006, abril-maio de 2007 e abril de 2008. Ninfas de *Amblyomma* sp. foram capturadas da pastagem por armadilhas de CO<sub>2</sub> durante todos os meses do ano e apresentaram picos populacionais entre os meses de junho a novembro e densidade populacional máxima em julho e outubro-novembro de 2006 e de 2007. Ninfas de *A. cajennense* foram capturadas em vida parasitária por raspagem dos equinos durante todos os meses do ano e apresentaram picos populacionais entre os meses de junho a novembro e densidade populacional máxima em julho de 2006 e de 2007. Adultos também foram coletados da pastagem com armadilhas de CO<sub>2</sub> e estes ocorreram durante todos os meses do ano com aumento populacional de outubro até março e de agosto até abril para *A. cajennense* e para *A. dubitatum*, respectivamente, nos dois anos de duração do experimento. Adultos de *A. cajennense* em vida parasitária ocorreram durante todos os meses do ano com aumento populacional de setembro até abril. Dos carrapatos coletados, 1213 exemplares tiveram sua hemolinfa testada e todos se apresentaram negativos para a presença de microrganismos semelhantes à riquetsia. Através da análise pela reação em cadeia de polimerase (PCR) usando um fragmento do gene riquetsial citrato sintase (*gltA*), somente dois carrapatos adultos de vida livre da espécie *A. cajennense* (um macho e uma fêmea) e quatro *pools* de 5 ninfas de vida livre de *Amblyomma* sp. mostraram produtos de tamanho esperado. O sequenciamento de DNA do fragmento amplificado dos genes *gltA*, *OmpA* e *OmpB* dos dois carrapatos adultos mostrou 100% de similaridade com as sequências correspondentes de *R. rickettsii* no Gen Bank. O sequenciamento de DNA do fragmento amplificado do gene *gltA* das ninfas mostrou 99,7% de similaridade com as sequências correspondentes de *Rickettsia tamurae* no Gen Bank. Estes resultados apresentam, mais uma vez, evidências moleculares da presença de *R. rickettsii* em populações de *A. cajennense* em Coronel Pacheco e sugerem a identificação de *R. tamurae* nas populações de *A. cajennense* e *A. dubitatum*.

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



## ABSTRACT

Owing to the importance of *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the epidemiology of Brazilian Spotted Fever (BSF), this study evaluated the fluctuation of populations of the free-living and parasitic these two species of the ticks, as well the frequency of ticks infection by *Rickettsia* spp. in Coronel Pacheco, risk area for occurrence of BSF in Minas Gerais State. Larvae of *Amblyomma* sp. were collected from pasture using the technique of drag sampling with flannelette during May to October 2006, from February to November 2007 and from March 2008. Well-defined peaks of populations occurred in May 2006, April-May 2007, April 2008 and October-November 2007. Larvae of *A. cajennense* were collected from animals during May to September 2006, from March to September 2007 and from April 2008. Well-defined peaks of populations occurred in May 2006, April-May 2007 and April 2008. Nymphs of *Amblyomma* sp. were captured from pasture throughout the year by the use of traps with carbon dioxide and peaks populations were observed between June and November, with an increase in population density in July and October-November 2006 and 2007. Nymphs of *A. cajennense* were captured throughout the year on equines and peaks populations were observed between June and November, with an increase in population density in July 2006 and 2007. Adults were captured from pasture throughout the year by the use of traps with carbon dioxide with an increase in population density from October to March and from August to April for *A. cajennense* and *A. dubitatum*, respectively, during the two years of experiment. Adults of *A. cajennense* occurred on animals throughout the year with an increase in population density from September to April. A total of 1213 ticks were individually processed by the hemolymph test with Gimenez staining and being all sample negative. By polymerase chain reaction (PCR) targeting a fragment of the rickettsial gene *gltA* only two adults *A. cajennense* ticks (one male and one female) and four pools of 5 nymphs showed the expected products. The DNA sequencing of two adults *A. cajennense* ticks showed 100% identity to the corresponding sequences of the *R. rickettsii* genes fragments *gltA*, *OmpA* and *OmpB* available in Gen Bank. The DNA sequencing of four pools of nymphs showed 99, 7% identity to the corresponding sequences of the *Rickettsia tamurae* genes fragments *gltA* available in Gen Bank. This results showed one more time molecular evidence for the presence of *R. rickettsii* in populations of *A. cajennense* in Coronel Pacheco and suggest the identification of *R. tamurae* in populations of *A. cajennense* and *A. dubitatum*.

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



## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias intracelulares obrigatórias que causam várias doenças zoonóticas em todos os continentes habitados por humanos no mundo e são classicamente transmitidas aos humanos por vetores artrópodes que incluem pulgas, piolhos, carrapatos e ácaros. As espécies de *Rickettsia* são divididas em três grupos, baseando-se em padrões antigênicos, moleculares e ecológicos: (1) o grupo ancestral (GA), composto por *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* associadas a carrapatos; (2) o grupo do tifo (GT), composto por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi* associadas com piolhos e pulgas, respectivamente; (3) e o grupo da febre maculosa (GFM) que inclui mais de 20 espécies, a maioria associada a carrapatos, com exceção de *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari* associadas a pulgas e ácaros, respectivamente (Labruna, 2006).

No GFM há pelo menos 12 espécies de *Rickettsia* que, comprovadamente, causam infecções no homem (*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia aeschlimannii*, *R. akari* e *R. felis*) (Raoult *et al.*, 2002). Nas Américas, as espécies causadoras de febre maculosa são *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*. Recentemente, outras espécies de *Rickettsia* do GFM têm sido descritas em carrapatos nas Américas, com possível associação a casos de febre maculosa em humanos ou animais (Billeter *et al.*, 2007; Apperson *et al.*, 2008; Saito *et al.*, 2008).

A febre maculosa causada pela espécie *R. rickettsii*, foi primeiramente descrita nos Estados Unidos (EUA), onde a doença recebeu o nome de Rocky Mountain Spotted Fever ou Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) em 1909 por Howard T. Ricketts. Além dos EUA, *R. rickettsii* ocorre endemicamente no México, Costa Rica e Panamá (Febre Manchada) e Colômbia

(Febre de Tobia). No Brasil, a doença é denominada de Febre Maculosa Brasileira (FMB) e *R. rickettsii* tem sido incriminada como principal agente etiológico. Casos confirmados de infecção por *R. rickettsii* tem sido relatados nos Estados do Espírito Santo (Sexton *et al.*, 1993), Rio de Janeiro (Rozental *et al.*, 2002), São Paulo (Lemos *et al.*, 2001) e Minas Gerais (Galvão, 1988; Galvão, 1996; Galvão *et al.*, 2003). Há também um caso confirmado na Bahia na década de 1970 (Plank *et al.*, 1979) e, mais recentemente, de 2002 a 2006, foram diagnosticados os primeiros casos de febre maculosa nos Estados de Santa Catarina, na região de Blumenau (Madeira e Weisbrich, 2004), Paraná (São José dos Pinhais) e Rio Grande do Sul (região de Serro Grande)<sup>1</sup>.

Os carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* são incriminados como o principal vetor da FMB. Tal fato é reforçado pelos isolamentos de *R. rickettsii* nesta espécie de carrapato em Minas Gerais (Moreira e Magalhães, 1935; Dias *et al.*, 1937) e São Paulo (Valejo-Freire, 1946) além de várias associações de ocorrência de FMB em locais com altas infestações de *A. cajennense* (Horta *et al.*, 2004; Sangioni *et al.*, 2005). Menos prevalente, mas não menos importante, tem-se ainda no Brasil a espécie *Amblyomma dubitatum* que também parece ter um papel importante no ciclo enzoótico de *R. rickettsii*. Observações da ecologia da febre maculosa em áreas endêmicas do Estado de São Paulo sugerem o potencial papel das capivaras como reservatórios naturais de *R. rickettsii* na natureza (Labruna *et al.*, 2004a). Nestas áreas, a maioria dos casos de FMB está quase sempre relacionada ao aumento populacional de capivaras que são um dos principais hospedeiros primários do estágio adulto do carrapato *A. cajennense* e hospedeiro quase que exclusivo de *A. dubitatum*. Além disso, embora não haja comprovação do papel do carrapato *A. dubitatum* na transmissão de FMB, a detecção de riquetsias do GFM nessa espécie de carrapato tem levado a suspeitar

<sup>1</sup> Comunicação pessoal fornecida por Martins, E. C. em 17 de março de 2004.

de um possível papel na epidemiologia da febre maculosa em áreas endêmicas.

A febre maculosa pode ser considerada uma zoonose reemergente no Brasil, com uma elevada taxa de letalidade para humanos, principalmente quando não diagnosticada precocemente, e as informações sobre o ciclo da doença na natureza ainda possuem muitas lacunas. Dessa forma, torna-se importante o conhecimento da epidemiologia de regiões com potencial biótico para o desenvolvimento da doença bem como a determinação das condições socioeconômicas da população, da distribuição e densidade dos vetores já incriminados como transmissores, das condições ecológicas das localidades e das espécies silvestres relacionadas como hospedeiros. A influência dos fatores climáticos e ambientais regula em grande parte, a dinâmica populacional desses vetores, possibilitando um momento definido de intervenção, visando à quebra do ciclo parasitário quando já instalado. Deve-se salientar que aspectos importantes ligados ao ambiente socioeconômico são mais evidentes quando se analisa a coevolução da população brasileira e o crescimento dos plantéis de equinos e bovinos. Esse fato permite inferir que o crescimento das populações potencialmente parasitáveis têm proporcionado a *A. cajennense* uma crescente fonte de recursos alimentares que resulta no aumento de sua população.

Em Minas Gerais, a febre maculosa passou novamente a ser descrita a partir da década de 80 sob a forma epidêmica e em "clusters", ou seja, ocorrendo vários casos em uma mesma residência, além de casos isolados. Do ponto de vista epidemiológico levantaram-se várias hipóteses como determinantes do ressurgimento da doença, entre elas, a invasão de focos naturais e a disseminação da doença a partir da ação do homem nesses focos (Silva e Galvão, 2004). A década de 80 e início da década de 90 caracterizaram-se pelo aparecimento de casos em áreas periurbanas do Vale do Rio Doce, como foi o caso de Caratinga em 1992, o que pareceu indicar uma expansão

da doença devido a um novo reordenamento ecológico, sendo ainda decorrência do modo de vida dessas populações marginalizadas no contexto socioeconômico (Galvão, 1996). Ainda 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 entre os meses de maio e outubro, com uma letalidade de 10%. De 1995 a 2003, no entanto, 106 casos foram confirmados com uma letalidade de 18%. Atualmente, as áreas do Estado com maior incidência de casos são a da Região Metropolitana de Belo Horizonte, Zona da Mata, Central e Vales do Mucuri, do Aço e do Rio Doce.

A cidade de Juiz de Fora, considerada a maior da Zona da Mata Mineira, teve seu primeiro caso notificado em 1995 e no ano de 2006 já era a cidade com maior número de casos notificados no Estado, com seis ocorrências e dois óbitos. No ano de 2007 foram quatro notificações com dois óbitos e em 2008 um caso com óbito (Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais). É importante ressaltar que todos os casos ocorreram em bairros da periferia da cidade, normalmente dentro da mesma família e associados a trabalhadores rurais, apontando para o aspecto socioeconômico da doença. Outra área relevante é Coronel Pacheco, município localizado dentro da microrregião de Juiz de Fora, que além de um caso humano de FMB confirmado laboratorialmente em um residente no ano de 2000 (Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais), traz em seu histórico coabitação de animais domésticos, como equinos, bovinos e caninos, e silvestres, como capivaras, e a identificação e caracterização molecular de *R. rickettsii* em carrapatos *A. cajennense* de origem local, pela primeira vez no Brasil e na América Latina (Guedes *et al.*, 2005). Na época, o trabalho acima citado foi realizado na região num período limitado de tempo (outubro de 2003 a abril de 2004) onde foram coletados apenas exemplares adultos de vida livre de carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A.*



*dubitatum* já que se tratava do período de verão e, larvas e ninfas encontram-se em número muito reduzido ou ausentes nessa estação. Neste contexto, visando ampliar o conhecimento epidemiológico no que diz respeito à FMB, seus agentes e vetores na área, o presente estudo teve como objetivo geral:

- Estudar a distribuição de riquetsias no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, através do conhecimento da dinâmica populacional de carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. dubitatum* nas fases de vida livre e parasitária e da utilização de técnicas moleculares para identificação e caracterização dos agentes riquetsiais presentes nesta área, durante um período de dois anos.

Como objetivos específicos o trabalho visou:

- Estudar a dinâmica populacional de larvas, ninfas e adultos de carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. dubitatum*, coletados nas fases de vida livre e de vida parasitária.
- Testar a eficiência de duas armadilhas utilizando fontes alternativas de dióxido de carbono para a coleta de estádios de vida livre de carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. dubitatum*.
- Estudar a frequência de riquetsias em carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. dubitatum*.
- Caracterizar molecularmente as riquetsias encontradas a partir de carrapatos infectados.

## 2 LITERATURA CONSULTADA

### 2.1 Epidemiologia de *A. cajennense*

A espécie *A. cajennense* é uma das mais prevalentes e apresenta ampla distribuição pelo continente americano. Ocorre ao sul dos EUA 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 e não apresenta comportamento sexual partenogenético fazendo com que o macho tenha um papel fundamental na perpetuação da espécie (Oliveira, 2004). É encontrado com maior frequência parasitando equídeos, 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 (Oliveira, 1998). Essa maior importância dos equinos pode ser avaliada pela grande capacidade de albergar altas infestações. Em condições naturais, um único equino pode se apresentar parasitado por mais de 50 mil larvas, ou mais de 12 mil ninfas ou mais de dois mil adultos de *A. cajennense* (Labruna, 2000). Embora *A. cajennense* tenha uma baixa especificidade parasitária, para que uma população esteja estabelecida numa área, há dois pontos críticos a serem considerados: (1) a presença de hospedeiros primários e (2) condições ambientais favoráveis às fases de vida livre do carrapato. Para *A. cajennense*, os hospedeiros primários são os equinos, as antas e as capivaras (Labruna *et al.*, 2001). Numa área onde uma população de *A. cajennense* está estabelecida, pelo menos uma destas três espécies de hospedeiros vertebrados deverá estar presente. Uma vez que a população de carrapatos cresce, ela passa a parasitar outros hospedeiros. Na literatura há diversos relatos do parasitismo de *A. cajennense* em dezenas de espécies de mamíferos e aves. Como regra geral, quanto maior a população de *A. cajennense* numa determinada área, maior a chance de encontrá-lo parasitando outras espécies de hospedeiros, inclusive humanos (Labruna *et al.*, 2001). Na região de Campinas, São Paulo, num estudo para levantamento das espécies de carrapatos, *A. dubitatum*

apareceu em frequência similar a *A. cajennense*. Nessas áreas não havia a presença de equinos sendo as capivaras os hospedeiros primários predominantes para *A. cajennense* (Souza *et al.*, 2006). Em algumas áreas, mesmo na abundância de hospedeiros primários para *A. cajennense*, esse pode não se estabelecer em função de condições ambientais que não propiciem um microclima adequado para as fases de vida livre do carrapato. Populações de *A. cajennense* podem sobreviver em áreas onde não existam equídeos, parasitando várias espécies de animais silvestres, principalmente, em áreas de pastagens “sujas” ou de cobertura vegetal mais densa, as quais esses hospedeiros silvestres frequentam com mais assiduidade. Por outro lado, áreas de pastos limpos limitam o estabelecimento deste carrapato, mesmo na abundância de hospedeiros primários (Labruna *et al.*, 2001).

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. Subsídios sobre os prejuízos induzidos por *A. cajennense* foram relatados por Cunha (1979) sobre o poder toxicóforo deste carrapato para coelhos. 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, 2004; Cunha, 2006).

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 *R. rickettsii*, agente etiológico da FMB, a qual é transmitida transovarianamente à sua progênie, o que o torna simultaneamente vetor e reservatório da doença (Lemos *et al.*, 1997). A

transmissão do patógeno também pode ocorrer a partir das larvas para ninfas e destas para os adultos caracterizando a transmissão transestadial (Pereira e Labruna, 1998). Carrapatos *A. cajennense* infectados com *R. rickettsii* já foram comprovadamente identificados no México (Bustamante e Varela, 1947), no Panamá (Rodaniche, 1953), na Colômbia (Patino-Camargo, 1941) e no Brasil (Guedes *et al.*, 2005).

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.

Assim, Smith (1975) em um 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.

Estudos realizados na Região Sudeste do Brasil têm demonstrado que esta espécie tem um ciclo anual, isto é, o desenvolvimento de apenas uma geração por ano, com picos populacionais bem definidos ao longo do ano para cada estágio de desenvolvimento.

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 frequentes 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 de adultos no período 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.

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; ninfas foram observadas de julho a novembro, nos dois anos do experimento e 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, por 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 e setembro com pico populacional no mês de agosto.

Oliveira *et al.* (2000 e 2003) analisando, em um extenso estudo de dois anos de duração, a ecologia de *A. cajennense*, tanto em vida livre quanto em vida parasitária no Estado de Minas Gerais, concluíram que as larvas deste carrapato apresentam sua maior população entre os meses de abril e agosto, com pico populacional em maio, sendo que no restante do ano, ocorrem em número muito reduzido ou mesmo completamente ausentes na vegetação. Ninfas foram coletadas de junho a outubro, com pico populacional em julho, tanto nas pastagens quanto na sua forma parasitária, nos dois anos de duração do experimento. O estágio adulto foi encontrado durante todo o ano nas pastagens e parasitando os animais, no entanto, no período compreendido entre setembro e março, foram observadas as maiores densidades populacionais da fase adulta de *A. cajennense*.

No Estado de São Paulo, Labruna *et al.* (2002) realizaram um estudo sobre a dinâmica sazonal de *A. cajennense* avaliando as infestações naturais de equinos mantidos a pasto. Os autores observaram que este carrapato apresenta picos distintos de atividade para cada um de seus estádios parasitários e um padrão definido de uma geração por ano. Larvas de *A. cajennense* predominaram de abril a julho e ninfas de junho a outubro. A fase adulta ocorreu predominantemente de outubro a março.

Este padrão cíclico anual do carrapato na Região Sudeste do Brasil parece estar controlado primariamente pela realização de diapausa comportamental pelas larvas não alimentadas existentes nas pastagens durante os meses de verão (Labruna *et al.*, 2003; Cabreira, 2008), fato este comprovado pela ausência ou ocorrência

em número muito reduzido de larvas no ambiente na primavera e verão. Os autores observaram em seu estudo que o fotoperíodo e as variáveis climáticas como a temperatura e a umidade relativa do ar, apresentam uma correlação estatisticamente significativa com as infestações do carrapato.

Segundo Belezzerov (1982), as atividades dos ixodídeos são marcadas por ritmos sazonais que alternam períodos de picos de atividades como a busca pelo hospedeiro, ingurgitamento, postura de ovos, etc., com períodos de dormência em sincronia com as estações do ano para regulação do seu ciclo de vida. O autor relata que as espécies de carrapatos que apresentam uma única geração por ano, tendem a apresentar diapausa nas suas fases ainda não alimentadas.

Um outro dado importante com relação à epidemiologia de *A. cajennense* é a marcante presença de machos não alimentados que pode ser observada mais cedo parasitando os animais, antes mesmo do aparecimento das fêmeas (Oliveira, 2004). Observa-se uma elevação nas contagens de machos sobre o número de fêmeas no início do período de aparecimento de adultos, já no final da estação de inverno e começo da primavera. Nos meses subsequentes o que se observa é uma redução gradativa do número de machos em relação ao número de fêmeas, com tendência ao equilíbrio na relação entre os sexos desta espécie de carrapato. O autor afirma ainda que a presença de machos precedendo o aparecimento de fêmeas está, possivelmente, relacionada à necessidade dos machos de encontrarem seus hospedeiros mais cedo para realizar o repasto sanguíneo e, assim, produzir feromônios que vão possibilitar a atração das fêmeas para os animais.

## 2.2 Epidemiologia de *A. 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.

Esta espécie de carrapato está presente do norte ao sul da América do Sul e no Brasil é relatado nos estados das Regiões Sudeste, Sul e Centro-Oeste (Camargo-Neves, 2004). Não há qualquer comprovação do papel do carrapato *A. dubitatum* na transmissão de qualquer espécie de riquetsia para humanos e a sua possível participação na epidemiologia da FMB. Entretanto, Lemos *et al.* (1996) relataram o primeiro isolamento de uma riquetsia do GFM, a partir de um exemplar dessa espécie de carrapato coletado de capivara, no município de Pedreira, São Paulo, contudo não houve descrição da espécie de riquetsia encontrada.

Embora as capivaras, abundantes em muitas áreas endêmicas para FMB, sejam consideradas hospedeiros primários para todos os estádios parasitários (larva, ninfa e adulto) do carrapato *A. dubitatum*, os estádios de larva e ninfa apresentam menor especificidade parasitária, podendo se alimentar em diversas espécies de hospedeiros em laboratório e em condições naturais (Labruna *et al.*, 2004b), inclusive com relatos de parasitismo em seres humanos (Famadas *et al.*, 1997; Labruna *et al.*, 2007). Desta forma, é lógico indagar se esta espécie de carrapato pode se infectar por alguma riquetsia patogênica ao homem, ou se seria possível sua participação na transmissão desse agente aos seres humanos. No entanto, não se sabe a frequência com que esse parasitismo possa ocorrer, uma vez que não existe literatura adequada para uma precisa identificação taxonômica de larvas e ninfas das espécies do gênero *Amblyomma* no Brasil, o que dificulta o relato de parasitismo humano por

essas fases de vida do carrapato (Labruna *et al.*, 2004c).

Labruna *et al.* (2004a), com objetivo de verificar o papel de *A. dubitatum* no ciclo enzoótico de *R. rickettsii*, avaliaram a infecção por *Rickettsia* spp. em 40 carrapatos coletados no município de Pedreira, São Paulo, tendo encontrado DNA de *R. bellii* em 16 carrapatos (40%), e outros três carrapatos (7,5%) positivos para uma riquetsia do GFM, denominada amostra COOPERI (= *R. parkeri*). Apesar de esses autores obterem o isolamento da amostra COOPERI em células Vero, o isolado foi perdido após a terceira passagem. Apesar disso, o fato das análises moleculares iniciais mostrarem que a amostra COOPERI é filogeneticamente próxima de *R. africae*, *R. parkeri* e *R. sibirica* e, como todas essas três espécies causam doenças do tipo febre maculosa em humanos em diferentes países, é possível suspeitar que a amostra COOPERI possa também estar causando este tipo de doença no Brasil.

Estrada *et al.* (2006), objetivando a detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados no município de Campinas, considerado uma região endêmica para FMB no Estado de São Paulo, processaram 1.078 exemplares de carrapatos, dos quais 131 eram *A. dubitatum*, tendo observado através da PCR e sequenciamento somente infecção por *R. bellii* na população de carrapatos estudados.

Pacheco (2007) com o objetivo de obter isolados de *Rickettsia* spp. para confirmar as evidências sobre o papel do *A. dubitatum* na transmissão de riquetsias do GFM no Brasil, realizou a avaliação da presença de riquetsia em carrapatos da espécie *A. dubitatum* no município de Pedreira, São Paulo. Foi coletado um total de 841 (367 machos e 474 fêmeas) carrapatos adultos da espécie *A. dubitatum* os quais foram submetidos ao teste de hemolinfa, à extração de DNA e à técnica da PCR para o gene *gltA*, presente em todas as espécies de riquetsias. Dos 841 *A. dubitatum*, um total de 378 (44,94%) amostras foram positivas para o gene *gltA* e, posteriormente,

foram testadas para o gene *ompA*, presente somente em riquetsias do GFM, sendo que nenhuma das amostras foi positiva. Dos 378 *A. dubitatum* positivos na PCR, o produto amplificado de 93 foi sequenciado, sendo todos identificados como *R. bellii* de acordo com sequências disponíveis no Gen Bank.

Com relação à distribuição sazonal de *A. dubitatum*, Souza *et al.* (2006) avaliando o comportamento de carrapatos de vida livre na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, observaram uma alta infestação de larvas do gênero *Amblyomma* na maioria dos meses de estudo, atribuindo ao *A. dubitatum* os picos ocorridos de novembro a março. Ninfas do gênero *Amblyomma* ocorreram durante todos os meses do ano, sendo mais abundantes de julho a dezembro, atribuindo os picos ocorridos no primeiro semestre do ano à espécie *A. dubitatum*. Já os adultos apresentaram os maiores picos a partir de agosto com declínio a partir de março.

### 2.3 Epidemiologia de *R. rickettsii*

*R. rickettsii* é o agente etiológico da mais grave riquetsiose das Américas, chamada no Brasil de FMB ou febre do carrapato. 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. Nos vertebrados, incluindo humanos, *R. rickettsii* se multiplica em células endoteliais; nos carrapatos, vetores da doença, a bactéria causa infecção disseminada, multiplicando-se em células dos intestinos, ovários, glândulas salivares, túbulos de Malpighi e hemolinfa (Yu e Walker, 2003).

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 riquetsias é extremamente importante para a manutenção dos microrganismos na natureza.

Os carrapatos vetores de *R. rickettsii* para humanos conhecidos até o momento são: *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus* nos EUA (Demma *et al.* 2005); *R. sanguineus* e *A. cajennense* no México (Bustamante e Varela, 1947); *A. cajennense* no Panamá (Rodaniche, 1953); *A. cajennense* na Colômbia (Patino-Camargo, 1941); *A. cajennense* e *Amblyomma aureolatum* no Brasil (Guedes *et al.*, 2005; Pinter e Labruna, 2006).

Segundo Philip e Burgdorfer (1961), após um carrapato infectar-se com uma riquetsia 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 riquetsemia.

Considerando-se que um grande número de carrapatos suscetíveis a *R. rickettsii* venha eventualmente parasitar mamíferos hospedeiros com suficiente riquetsemia 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 riquetsias 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 riquetsia. Pode ocorrer ainda, mesmo com a infecção completa de riquetsia 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 Burgdorfer (1988), embora a bactéria também seja transmitida hereditariamente entre gerações sucessivas de uma população de carrapatos, apenas este mecanismo não seria suficiente para mantê-la ativa ao longo do tempo, uma vez que há evidências laboratoriais de que *R. rickettsii* é patogênica para o carrapato vetor.

Niebylski *et al.* (1999) utilizando algumas cepas virulentas de *R. rickettsii* em carrapatos *D. 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.

A ecologia de *R. rickettsii* torna-se mais complexa ainda com a existência de outras riquetsias do GFM, de patogenicidade desconhecida que foram isoladas de carrapatos e que podem atuar como fator limitante da infecção de *R. rickettsii* nestes vetores. Acreditava-se que um carrapato previamente infectado por uma espécie de riquetsia tornava-se incapaz de manter e transmitir uma segunda espécie de riquetsia (Macaluso *et al.*, 2002). No entanto, Carmichael e Fuerst (2006) mostraram a superinfecção de um carrapato *D. variabilis* coletado no ambiente em Ohio, EUA, por *R. bellii*, *R. montanensis* e *R. rickettsii*.

Dessa forma, o efeito amplificador que alguns animais silvestres desempenham deve existir para garantir a manutenção da bactéria na natureza. Nesse caso, o hospedeiro amplificador mantém a bactéria

em níveis altos em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, garantindo que novos carrapatos se infectem amplificando a infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (Burgdorfer, 1988).

Segundo Labruna (2006), para que uma espécie de vertebrado seja considerada um bom hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* na natureza ela: (1) deve ser abundante na área endêmica para a febre maculosa; (2) deve ser um bom hospedeiro do carrapato vetor em condições naturais; (3) deve ser suscetível à infecção por *R. rickettsii*; (4) deve manter *R. rickettsii* circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar carrapatos que se alimentem nela e (5) deve ter uma alta taxa de renovação populacional.

Em relação à transmissão da febre maculosa nos EUA, considera-se que *R. rickettsii* mantém seu ciclo vital na natureza, entre o carrapato vetor (*D. andersoni* e *D. variabilis*) e algumas espécies de pequenos roedores (*Microtus pensilvanicus*, *Pitymys pinetorum*, *Peromyscus leucopus* e *Sigmodon hispidus*) que são considerados os principais hospedeiros amplificadores naquele país (McDade e Newhouse, 1986; Burgdorfer, 1988).

Embora diferentes trabalhos realizados desde a década de 1930 tenham levado a suspeitas das capivaras, gambás e coelhos silvestres como possíveis hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para *A. cajennense* no Brasil, apenas, recentemente, foi comprovada a importância destes dois primeiros no ciclo silvestre da FMB (Souza *et al.*, 2009; Horta *et al.*, 2009). Ainda sim, a incidência da FMB causada por *R. rickettsii* parece ser esporádica apesar da sua aparente ampla distribuição em reservatórios animais e carrapatos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

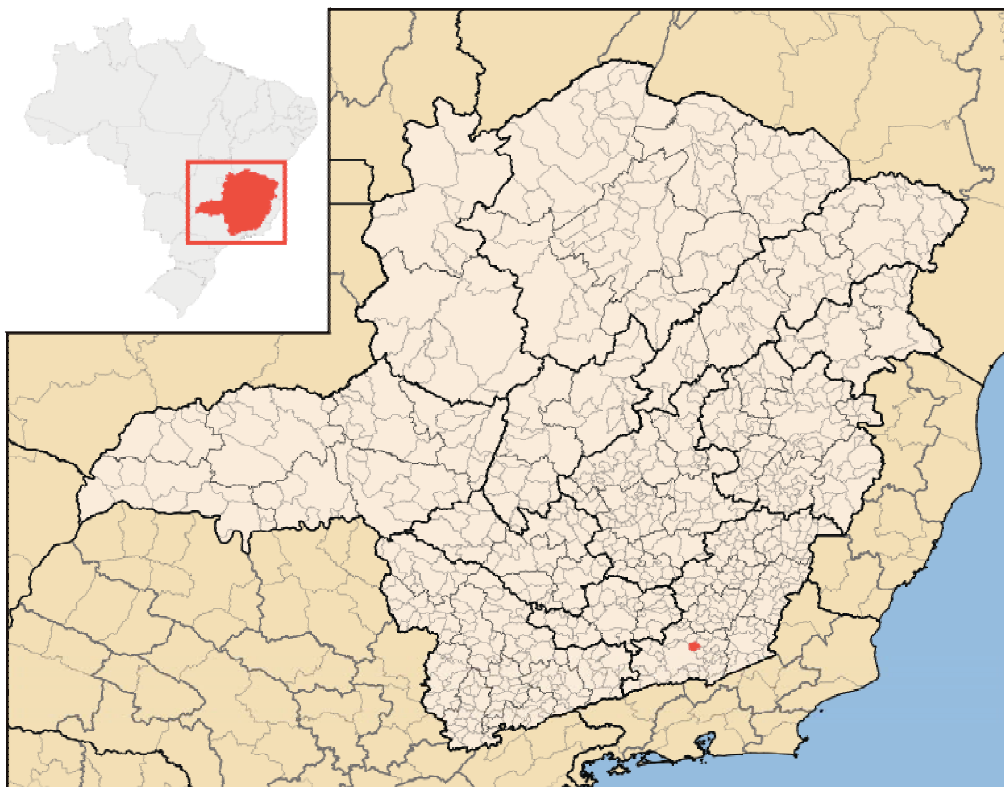
#### 3.1 Local e duração do experimento

O presente trabalho foi realizado em uma área de pastagem da fazenda da Embrapa

Gado de Leite no Campo Experimental de Coronel Pacheco (CECP) (21°35' S, 43°15' W), Minas Gerais, Brasil, a 435m de altitude (Figura 1), de maio de 2006 a abril de 2008.

A região apresenta uma estação seca de maio a outubro e uma estação chuvosa de novembro a abril, 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 pequeno rio, no qual quase sempre é possível se observar trilhas e grupos de capivaras atraídas pela disponibilidade de alimento oriunda das plantações de milho e cana-de-açúcar do campo experimental. Nos campos gramados há a presença de bovinos de leite e em alguns pontos, bovinos mestiços, bem como cavalos que são utilizados 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, equinos, caninos e capivaras convivendo na mesma região, pela confirmação laboratorial de um caso de febre maculosa ocorrido em um humano residente (Secretaria de Estado da Saúde de Minas Gerais) e pela identificação e caracterização molecular de *R. rickettsii* em carrapatos adultos de vida livre da espécie *A. cajennense* coletados nesta área de pastagem em estudo anterior (Guedes *et al.*, 2005).

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 (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Na Embrapa foram realizados os testes de hemolinfa nos carrapatos, concomitantemente, com as coletas destes, ou seja, no período de maio de 2006 a abril de 2008. Já na USP foram realizados os testes biomoleculares no período de agosto de 2007 a janeiro de 2009.



Fonte: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Coronel\\_Pacheco](http://pt.wikipedia.org/wiki/Coronel_Pacheco)

Figura 1 - Localização do município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, área endêmica para FMB e local de coleta de carrapatos.

### 3.2 Animais do experimento

Foram utilizados para a observação da flutuação populacional da fase de vida parasitária de *A. cajennense*, 22 cavalos pertencentes à tropa de trabalho do CECP, sem raça definida, de idades e pelagens variadas. Estes animais foram mantidos em regime de pasto sob exposição natural a *A. cajennense* e recebendo banhos à base de piretróide (cipermetrina 15%)<sup>2</sup> sempre que necessário.

Para avaliação da flutuação populacional da fase de vida parasitária de *A. dubitatum*, seriam capturadas capivaras de vida livre presentes no CECP, mas mesmo com a autorização do Instituto do Meio Ambiente

(IBAMA) em mãos, não foi possível a realização dessa parte do experimento em virtude de problemas burocráticos que independiam da nossa vontade.

### 3.3 Coleta de estádios em vida livre

Os estádios de vida livre dos carrapatos *A. cajennense* e *A. dubitatum* foram coletados da pastagem a cada 14 dias de intervalo sempre pela manhã, utilizando-se a técnica de arraste de flanela para captura de larvas (Oliveira *et al.*, 2000) e armadilhas de CO<sub>2</sub>, duas de gelo seco (Oliveira *et al.*, 2000) e duas químicas (Cançado *et al.*, 2008), para captura de ninfas e de adultos.

A captura por arraste de flanela consistiu na utilização de uma flanela branca com

<sup>2</sup> Colosso® (Laboratório Ouro Fino)



dimensões de 1,50 m de comprimento por 0,90 m de largura, com duas barras de ferro de 1,0 m de comprimento, transpassadas em presilhas feitas em cada extremidade da mesma com o objetivo de manter a flanela aberta e o mais próximo possível da pastagem.

Na captura com armadilhas de CO<sub>2</sub> utilizou-se 500 g de gelo seco em pequenos pedaços como fonte de CO<sub>2</sub>, colocados no interior de uma caixa de isopor de dois litros e com 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 m<sup>2</sup> de área) estendida na pastagem nos dias de coleta. A cada 10 minutos, aproximadamente, o gelo seco era soprado no intuito de aumentar a área de expansão do CO<sub>2</sub> e, conseqüentemente, atrair mais carrapatos para o local. Nas bordas da flanela foi colocada fita dupla face para que os carrapatos ali atraídos não pudessem escapar (Figura 2).

Com relação às armadilhas químicas (Cançado *et al.*, 2008), a partir de uma reação química simples foi possível estabelecer uma fonte segura e contínua de CO<sub>2</sub> utilizando ácido láctico a 20% (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) e carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>). Em cada armadilha foi necessária uma proporção de 400 ml de ácido para cada 250 g de carbonato. A fabricação das armadilhas consistiu no uso de dois vasilhames plásticos de 500 ml de volume de uso doméstico, colocados um sobre o outro. Fez-se uma perfuração que atravessou o fundo do vasilhame superior e a tampa do vasilhame inferior, permitindo o gotejamento do ácido láctico do vasilhame superior para o inferior. No vasilhame inferior foram feitas perfurações laterais de 0,5 cm de diâmetro de modo a permitir a liberação do CO<sub>2</sub> produzido na reação química. Estes vasilhames foram expostos durante, aproximadamente, uma hora sobre uma flanela branca medindo 100 cm de largura por 100 cm de comprimento (1,0 m<sup>2</sup> de área) estendida na pastagem nos dias de coleta (Figura 2).

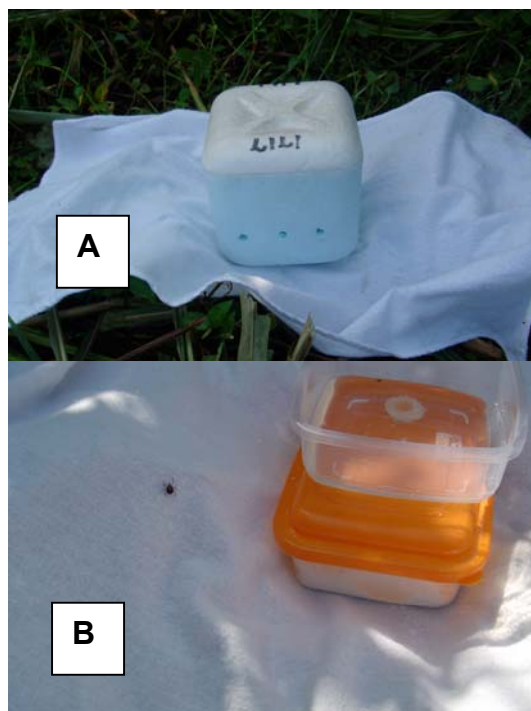


Figura 2 - Armadilhas de CO<sub>2</sub>. Gelo seco (A) e química (B).

Uma flanela branca sem qualquer atrativo químico foi colocada na pastagem nos dias de coleta e serviu como instrumento de controle da eficácia das armadilhas anteriormente descritas.

### 3.4 Coleta de estádios em vida parasitária

Para avaliação da flutuação dos estádios de vida parasitária de *A. cajennense* foram empregadas as técnicas de raspagem dos animais para captura de larvas e ninfas e de contagem de estádios parasitários adultos (Oliveira *et al.*, 2003) a cada 14 dias de intervalo.

A execução da técnica de raspagem consistiu na escovação de toda superfície do lado esquerdo dos animais utilizando-se raspadeira de dentes finos e flexíveis, própria para uso em equinos, com o objetivo de remoção de larvas e ninfas ingurgitadas em fase de desprendimento do hospedeiro. Empregou-se um saco plástico, para dentro

do qual eram escovados os carrapatos que se desprendiam do equino.

A avaliação de estádios adultos, machos e fêmeas, foi realizada por meio de contagens sucessivas de toda superfície do lado esquerdo do corpo dos equinos, com a remoção de apenas uma parte dos carrapatos. Essa pequena parte, cerca de aproximadamente 10% dos carrapatos contados, foi removida para posterior análise biomolecular pela PCR, na busca por espécimes infectados com riquetsias. Os animais foram contidos em tronco para facilitar o processo de contagem. Todos adultos de *A. cajennense* encontrados foram contados e separados por sexo para determinar a curva de flutuação populacional e a relação macho: fêmea durante os dois anos de observação do experimento.

Como citado no item 3.2, as capivaras não puderam ser capturadas, logo não foi possível a coleta de carrapatos da espécie *A. dubitatum* em vida parasitária.

### 3.5 Identificação dos carrapatos

Os carrapatos foram recolhidos e acondicionados em sacos plásticos para posterior identificação dos exemplares no Laboratório de Parasitologia da Embrapa Gado de Leite. A identificação foi feita com o auxílio de um microscópio estereoscópio utilizando-se as chaves de identificação de Clifford e Anastos (1960) para larvas e de Aragão e Fonseca (1961) para ninfas e adultos (Figuras 3 e 4), após lavagem dos exemplares em água corrente e secagem em papel toalha. Larvas e ninfas foram identificadas somente ao nível de gênero, devido à inexistência de chaves taxonômicas para identificação de espécies.

### 3.6 Teste de hemolinfa

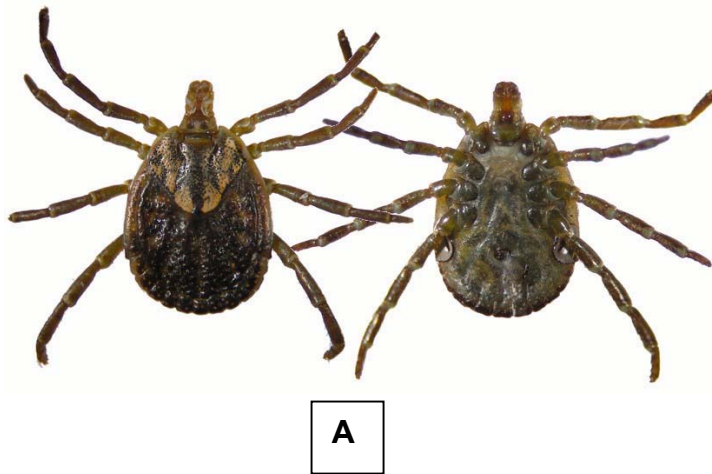
Os testes de hemolinfa também foram realizados no Laboratório de Parasitologia da sede da Embrapa Gado de Leite. Antes da realização do teste de hemolinfa, no entanto, os carrapatos adultos, de vida livre e parasitária, foram colocados em uma estufa a 35°C e umidade relativa  $\geq 80\%$  por três a quatro dias, para incrementar a multiplicação de riquetsias (Labruna *et al.*, 2004a). 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 riquetsias 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, todos os carrapatos foram congelados a -80°C até processamento para análise pela PCR.



Fotos: Ogrzewalska, M.

Figura 3 - Fêmea (A) e macho (B) de *A. cajennense*.



A



B

Fotos: Ogrzewalska, M.

Figura 4 - Fêmea (A) e macho (B) de *A. dubitatum*.

### 3.7 Extração de DNA e análise pela PCR

Os carrapatos foram processados de acordo com a técnica descrita por Labruna *et al.* (2004a) para análise pela PCR no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ da USP em São Paulo. Para o procedimento de extração de DNA, os exemplares foram assim divididos: (1) amostras individuais de estádios adultos de vida livre; (2) 100 *pools* de 10 larvas de vida livre; (3) 200 *pools* de 5 ninfas de vida livre; (4) amostras individuais de estádios adultos de vida parasitária; (5) 100 *pools* de 10 larvas de vida parasitária e (6) 200 *pools* de 5 ninfas de vida parasitária.

Utilizou-se o protocolo de isotiocianato de guanidina (GT) na extração: aos tubos devidamente identificados contendo os exemplares de carrapatos seccionados e, posteriormente macerados, com auxílio de micropistilos, foram adicionados 150 µL de TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8,0), submetidos ao vórtex por 10 segundos. Foram adicionados 450 µL de GT e os tubos foram levados para incubação por 10 minutos à temperatura ambiente, com agitação a cada dois minutos e meio. Após, foram adicionados 100 µL de clorofórmio a cada tubo e estes foram centrifugados por 5 minutos a 14000 rpm (12000 x g). Cerca de 400 µL do sobrenadante foram recuperados de cada tubo aos quais foram acrescentados 600 µL de propanol. Os tubos foram levados ao freezer “over night” e só então foram centrifugados por 15 minutos a 4°C a 14000 rpm (12000 x g). O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados a cada tubo 800 µL de etanol a 70%, sendo novamente levados à centrifugação por 5 minutos a 4°C a 14000 rpm (12000 x g). O sobrenadante foi desprezado e, após secagem do pellet em cada tubo à temperatura ambiente, o mesmo foi ressuspensionado com 40 µL de TE.

As amostras de DNA extraídas foram processadas pela PCR utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores (“*primers*”) denominados de CS2-78 senso (“forward”) e CS2-323 anti-senso

(“reverse”) que amplifica um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*) (Tabela 1) detectado em todas as espécies de *Rickettsia*. Amostras positivas com esses primeiros *primers* foram testadas em novas baterias de PCRs utilizando os outros *primers* mostrados na Tabela 1 que amplificam fragmentos dos genes *gltA* (Labruna *et al.*, 2004a), *OmpA* (Regnery *et al.*, 1991) e *OmpB* (Roux e Raoult, 2000).

Todas as reações da PCR (50 µL de volume final) foram realizadas adicionando 5 µL da amostra de DNA a 25,2 µL de água ultra pura e 19,8 µL de mix (dNTPs, tampão e *Taq* DNA polimerase + MgCl<sub>2</sub>). As amostras foram levadas ao termociclador nas seguintes condições: para *primers* CS2-78 e CS2-323 foi 1 ciclo a 95°C por 3 min, 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 50°C, 30 s a 72°C, seguidos por 1 ciclo a 72°C por 7 min. Para cada reação, três controles negativos (5 µL da mesma água usada no mix) e um controle positivo [300 ng de DNA de *A. cajennense* infectado com *R. parkeri* (Sangioni *et al.*, 2005)] foram incluídos. 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.

Como as ninfas de *Amblyomma* sp. foram identificadas somente ao nível de gênero, devido à inexistência de chaves taxonômicas para identificação de espécies por caracteres morfológicos, foi feita uma nova PCR dos *pools* de ninfas positivas para o gene *gltA* utilizando-se a metodologia de amplificação e sequenciamento do fragmento do gene ribossômico mitocondrial 16S (16S rDNA) como descrito por Mangold *et al.* (1998) para identificação das espécies.

Tabela 1- Pares de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na amplificação dos genes de *Rickettsia* sp.

Gene	Par de oligonucleotídeos iniciadores	Sequência dos oligonucleotídeos (5' - 3')	Referência	Tamanho do produto amplificado (pb)
<b>gltA</b>	CS2-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	Labruna <i>et al.</i> (2004a)	401
	CS2-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	Labruna <i>et al.</i> , (2004a)	
	CS4-239	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	Labruna <i>et al.</i> , (2004a)	834
	CS4-1069	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	Labruna <i>et al.</i> , (2004a)	
<b>ompA</b>	Rr-190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	Regnery <i>et al.</i> (1991)	512
	Rr-190.602n	AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	Regnery <i>et al.</i> (1991)	
<b>ompB</b>	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	Roux e Raoult (2000)	862
	120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA	Roux e Raoult (2000)	
<b>16S</b>	+1	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG	Mangold <i>et al.</i> (1998)	460
	-1	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	Mangold <i>et al.</i> (1998)	

### 3.8 Clonagem

O produto amplificado do gene *OmpB* de uma amostra proveniente de um *pool* de ninfas do gênero *Amblyomma* foi clonado no vetor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO do kit *TOPO TA cloning*<sup>®</sup> da Invitrogen segundo a técnica descrita por Cardoso (2004) em virtude do grande número de reações inespecíficas observadas após a eletroforese. O vetor pCR<sup>®</sup> 2.1-TOPO fornecido nesse kit é um plasmídeo de fita dupla linearizado, que contém genes que conferem resistência à ampicilina e à kanamicina e o sistema operon *Lac Z* de *Escherichia coli*, dentro do qual se encontra o sítio de clonagem. O sítio de clonagem é caracterizado pela presença de uma timina despareada na extremidade 3' e uma topoisomerase covalentemente ligada, sendo o princípio de clonagem baseado na presença de um resíduo de desoxiadenosina na

extremidade 3' do fragmento da PCR que é adicionado pela atividade terminal transferase independente de molde da enzima *Taq* DNA polimerase. As reações foram realizadas de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

A ligação foi feita à temperatura ambiente durante 5 minutos. Foram utilizados 3 µl do produto da PCR, 1 µl do plasmídeo vetor, 1 µl de solução salina (1,2 M NaCl; 0,06 M MgCl<sub>2</sub>) e 1 µl de água do kit, resultando em um volume final de 6 µl.

Para cada transformação foram adicionados 2 µl do produto de ligação (cerca de 10 ng do plasmídeo recombinante) a 50 µl de célula competente. A mistura foi mantida em gelo por 20 minutos e então submetida a um choque térmico a 42°C por 30 segundos, após o qual, foi novamente transferida para o gelo. Em seguida, foram adicionados 250

µl de meio SOC e as células foram incubadas, sob agitação, a 37°C durante 60 minutos. Após esse período, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar contendo 35 µl de X-gal e 40 µl de IPTG e levadas para incubação a 37°C por, aproximadamente, 18 horas para crescimento das colônias.

A seleção das colônias recombinantes foi feita visualmente. Cada uma das colônias de coloração branca (recombinantes) que surgiram após a transformação foram transferidas das placas, com auxílio de um palito estéril, para crescimento em tubos contendo meio LB líquido e ampicilina (1 µl / ml). Estes tubos foram incubados a 37°C por, aproximadamente, 18 horas.

A seleção de crescimento bacteriano também foi feita visualmente através da turbidez do meio nos tubos. O conteúdo dos tubos com crescimento bacteriano foi transferido para tubos de 2 ml, os quais foram centrifugados por 10 minutos a 14000 rpm (12000 x g). O sobrenadante foi descartado e o pellet reservado.

Para confirmação do tamanho do inserto das colônias recombinantes foi feita uma PCR utilizando-se um par de *primers* denominados de 120.M59 senso (“forward”) e 120.807 anti-senso (“reverse”) que amplificam um fragmento de 862 pb dos genes que codificam proteínas externas de membranas de *Rickettsia* (*OmpB*) (Tabela 1). Com uma ponteira estéril, uma pequena parte do pellet foi adicionada ao mix da PCR. 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.

Para extração do DNA plasmidial foi utilizado o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* da Promega. O pellet correspondente a cada tubo foi ressuspenso em 250 µl de solução contendo 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5 e 100 µg/ml RNase H. Após a ressuspenção das células foram adicionados 250 µl de solução de lise celular e, em seguida, as amostras foram homogeneizadas por inversão dos tubos e

incubadas à temperatura ambiente por, aproximadamente, 5 minutos, até clareamento da suspensão celular. Em seguida, foram adicionados 10 µl de solução de proteinase alcalina misturando-se as amostras por inversão, as quais foram incubadas durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após incubação, foram adicionados 350 µl de solução de neutralização com o objetivo de precipitar os restos celulares, sendo as amostras, imediatamente, homogeneizadas por inversão. O lisado celular resultante foi então centrifugado por 10 minutos a 14000 rpm (12000 x g). O sobrenadante foi transferido para uma coluna contendo resina de decantação. Essa coluna foi centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm (12000 x g), lavada com 750 µl de solução de lavagem e novamente centrifugada nas mesmas condições anteriores. O processo de lavagem da coluna foi repetido utilizando-se 250 µl de solução de lavagem e centrifugada por 1 minuto a 14000 rpm (12000 x g). O DNA plasmidial foi então eluído com 100 µl de TE, incubado por 1 minuto à temperatura ambiente, centrifugado por 2 minutos a 14000 rpm (12000 x g) e congelado.

### 3.9 Sequenciamento de DNA

Após a confirmação da positividade da amostra pela PCR pelo gel de agarose corado com brometo de etídeo, o material amplificado foi purificado utilizando-se o produto *ExoSAP-IT®* (USB® Corporation) conforme instruções do fabricante (7,5 µl da amostra amplificada e 3 µl de *ExoSAP*). Após a purificação, as amostras foram submetidas ao sequenciamento utilizando o “*Kit Big Dye 3.1*”, de acordo com as instruções do fabricante (4 µl de DNA purificado – concentração máxima de 100 ng, 1 µl de água de mili Q, 0,75 µl de “*Big Dye*”, 1 µl de oligonucleotídeos iniciadores específicos senso e anti-senso (5 pmoles/µl) e 3,25 de “*Save Money*”. Foi utilizado o sequenciador de DNA modelo *ABI “Prism 3100 Genetic Analyser”* (Applied Biosystems/Perkin Elmer®), segundo o manual de instruções (“*Automated DNA*

sequencing”, 1998). As sequências obtidas foram submetidas ao programa “BLAST analysis” (Altschul *et al.*, 1990) para determinar similaridades com outras espécies de riquétsia.

### 3.10 Dados meteorológicos

Dados climáticos referentes à temperatura do ar (mínimas, médias e máximas), índices pluviométricos e umidade relativa do ar foram fornecidos pela Estação Agroclimatológica de Coronel Pacheco, Minas Gerais, nº 83037, do 5º Distrito de Meteorologia (DISME), durante o período de maio de 2006 a abril de 2008.

### 3.11 Análise estatística

A comparação da eficiência das duas armadilhas de CO<sub>2</sub> testadas foi analisada empregando-se o teste de t Student.

## 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 5 e 6, 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 a classificação de Köppen (Antunes, 1986).

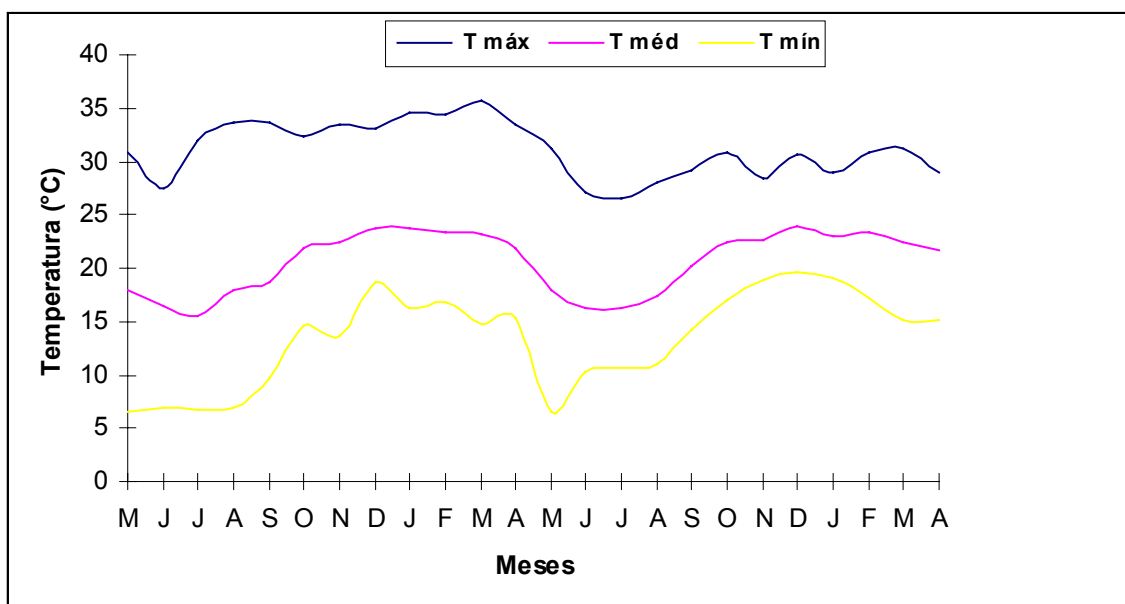


Figura 5 - Temperaturas máximas, médias e mínimas observadas no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

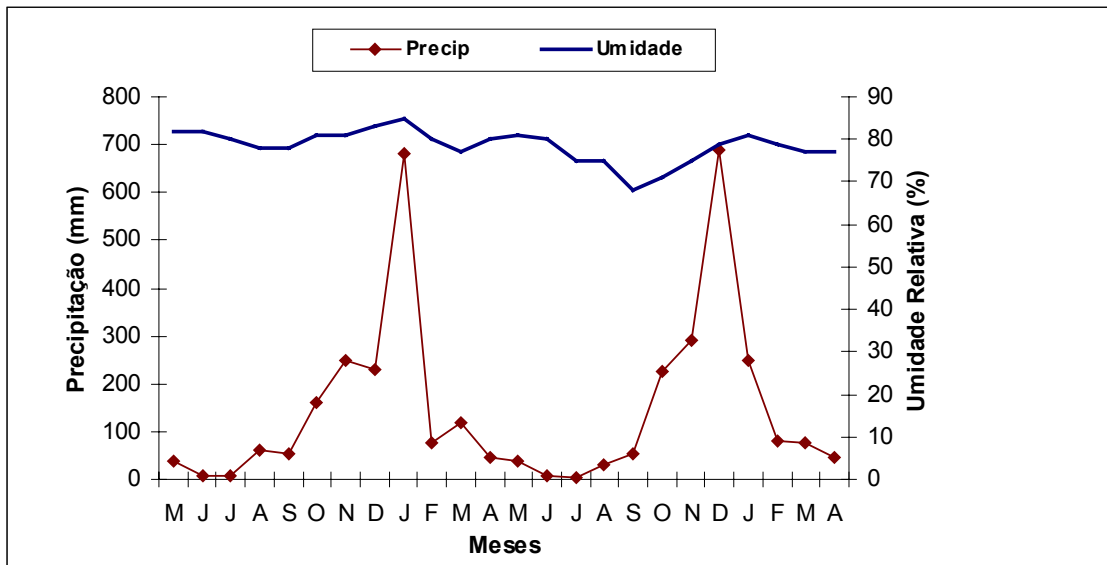


Figura 6 - Umidade relativa do ar e índices pluviométricos no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

**4.2 Flutuação da população de larvas, ninfas e adultos de vida livre de *A. cajennense* e *A. dubitatum***

gênero *Amblyomma* através das técnicas de arraste de flanela e armadilha de CO<sub>2</sub>, respectivamente (Tabela 2).

Durante os dois anos do experimento foram coletadas 4751 larvas e 2840 ninfas do

Tabela 2 - Total de larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense* e *A. dubitatum* coletados por diferentes técnicas em Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

	Vida Livre			Vida Parasitária	
	Arraste	CO <sub>2</sub>	Flanela Controle	Raspagem	Contagem
Larvas	4688		63	8800	
Ninfas	707	2103	30	1452	
<i>A. cajennense</i>		321	7		7022
<i>A. dubitatum</i>		284	8		



As larvas de *Amblyomma* sp. foram capturadas durante o período de maio a outubro de 2006, de fevereiro a novembro de 2007 e a partir de março de 2008. Apresentaram picos populacionais bem definidos sendo os maiores em maio de 2006 representando 58% das larvas capturadas neste ano, abril-maio de 2007 com 37%, abril de 2008 com 92% e outubro-novembro de 2007 com 35% (Figura 7).

Ninfas de *Amblyomma* sp. foram capturadas durante todos os meses do ano e apresentaram picos populacionais entre os meses de junho a novembro e densidade populacional máxima em julho e outubro-novembro de 2006 com 56% e 31% das ninfas capturadas neste ano, respectivamente, e julho e outubro-novembro de 2007 com 16% e 63%, respectivamente (Figura 7). Os picos populacionais dos estádios imaturos ocorreram, principalmente, durante o outono e o inverno quando as temperaturas e umidades relativas do ar estavam mais baixas (Figuras 5 e 6).

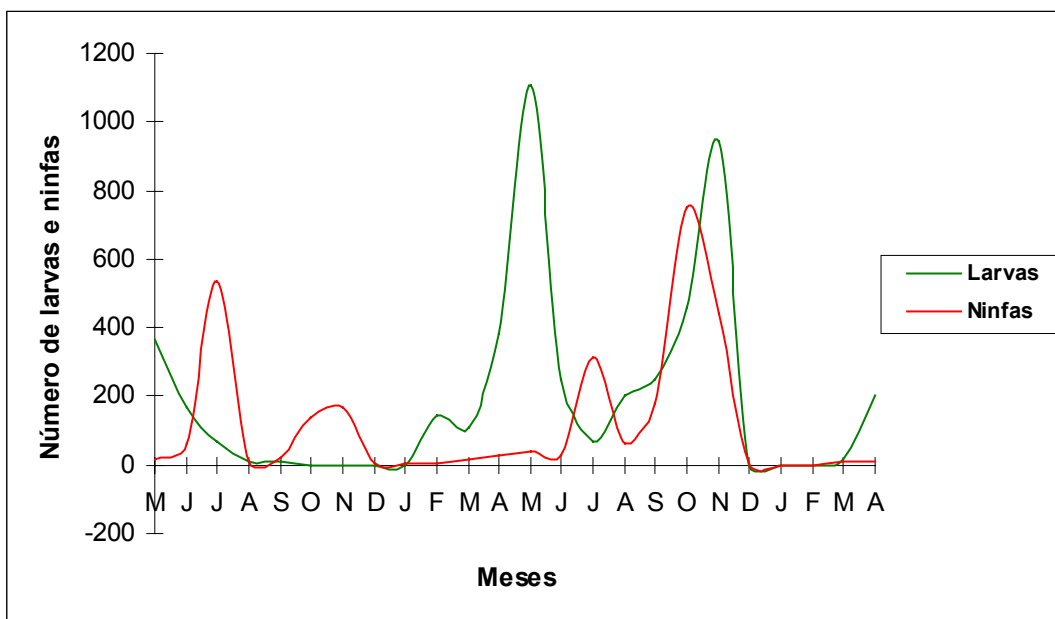


Figura 7 - Flutuação da população de larvas e ninfas de vida livre de *Amblyomma* sp. coletadas no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

Foram coletados 620 carrapatos adultos com auxílio de armadilhas de CO<sub>2</sub>, sendo 328 identificados como *A. cajennense* e 292 como *A. dubitatum* (Tabela 2). Observou-se que este estágio ocorreu durante todos os meses do ano com aumento populacional de outubro até março e de agosto até abril para *A. cajennense* e para *A. dubitatum*, respectivamente, nos dois anos de duração do experimento. Foram identificados picos na população de carrapatos sendo outubro-novembro de 2006 (91%) e 2007 (60%), janeiro-fevereiro de 2007 (33%) e 2008

(90%) os meses de maior captura de exemplares de *A. cajennense* e outubro-novembro de 2006 (91%) e 2007 (58%), fevereiro-abril de 2007 (30%) e 2008 (90%) os meses de maior captura de espécimes de *A. dubitatum* (Figura 8). Ao contrário do que ocorreu com os estádios imaturos, os picos populacionais dos estádios adultos ocorreram durante a primavera e o verão quando as temperaturas e umidades relativas do ar estavam mais altas (Figuras 5 e 6).

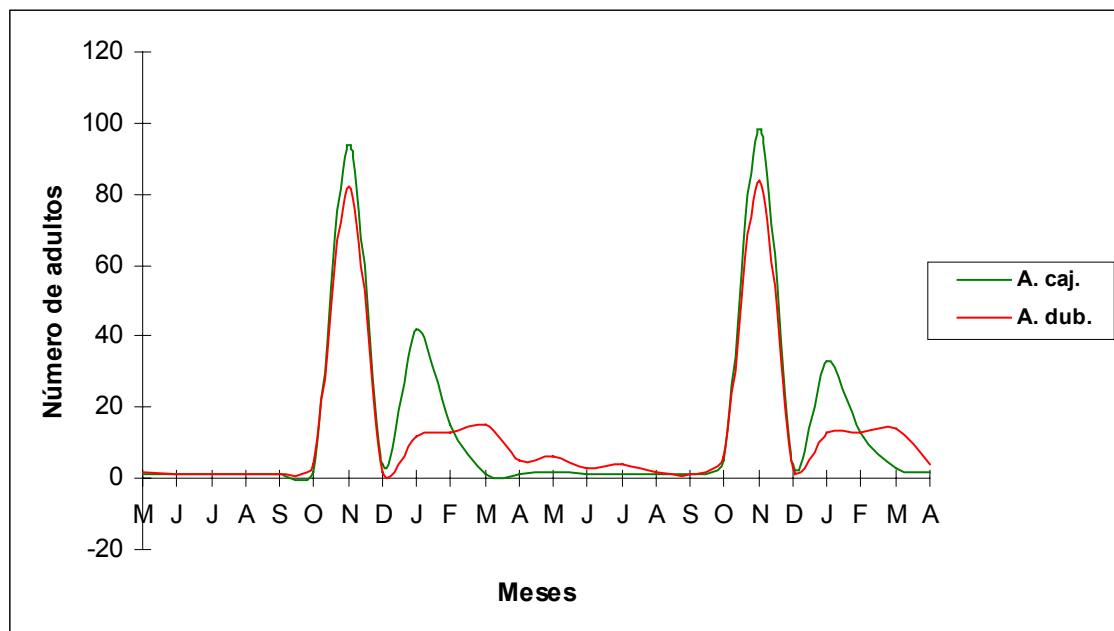


Figura 8 - Flutuação da população de adultos de vida livre de *A. cajennense* e *A. dubitatum* coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

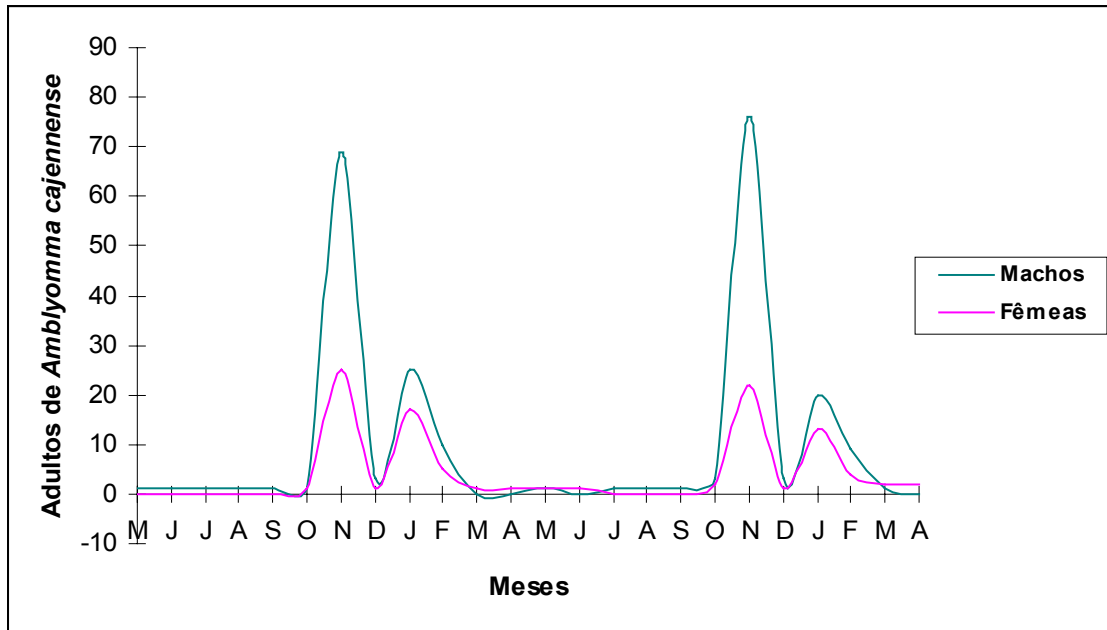


Figura 9 - Flutuação da população de machos e fêmeas de *A. cajennense* em vida livre coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

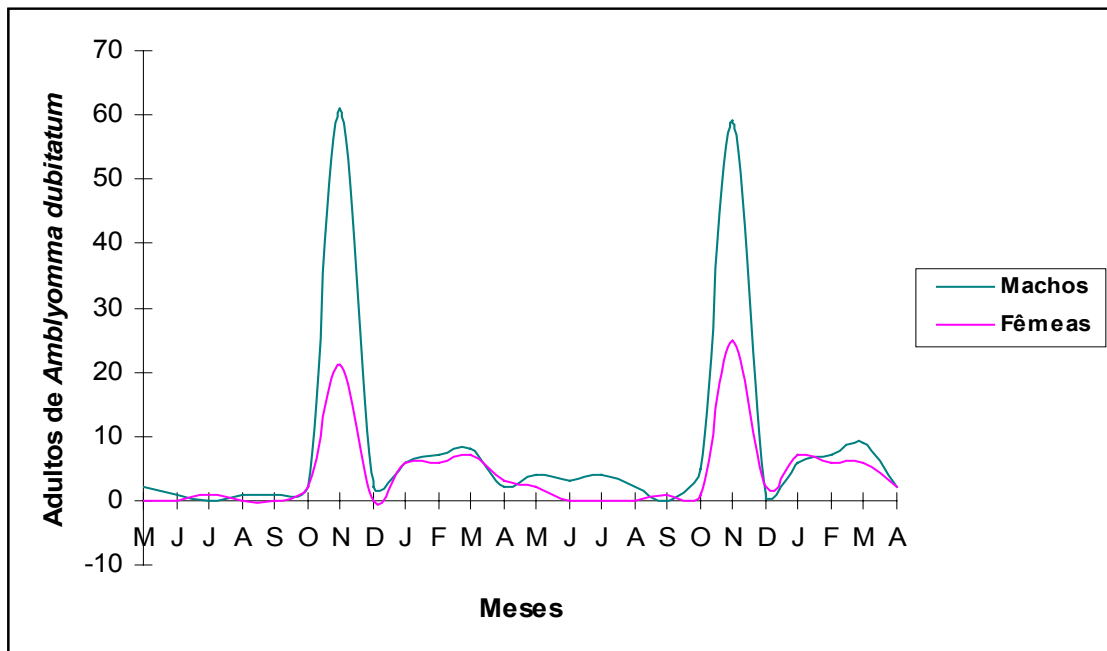


Figura 10 - Flutuação da população de machos e fêmeas de *A. dubitatum* em vida livre coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

Considerando a presença de larvas e ninfas nas pastagens, a análise dos resultados do presente estudo em conjunto com registros da literatura permite inferir que a maioria das larvas e ninfas encontradas em maio e julho, respectivamente, são, principalmente, da espécie *A. cajennense*, em semelhança com os resultados relatados por Smith (1975) em Trinidad e Tobago, Guglielmo e Hadani (1982) na Argentina, e no Brasil, Souza e Serra-Freire (1994 a, b) no Rio de Janeiro, Oliveira *et al.* (2000) em Minas Gerais, que também encontraram picos populacionais de estádios imaturos de *A. cajennense* nas pastagens durante as estações secas e frias do ano. Em contrapartida, a maioria das larvas e ninfas ativas encontradas no bimestre outubro-novembro, sugere pertencer à espécie *A. dubitatum* corroborando os resultados encontrados por Souza *et al.* (2006) em São Paulo que também coletaram duas espécies do gênero *Amblyomma* (*A. cajennense* e *A. dubitatum*) e atribuíram picos de larvas e ninfas encontrados no período de novembro a março à espécie *A. dubitatum*. Isto porque neste período, larvas e ninfas de *A. cajennense* já encontram-se em diapausa comportamental (Labruna *et al.*, 2003; Cabreira, 2008), o que determina um padrão sazonal diferenciado em relação à população de *A. cajennense* na área estudada.

Os dois picos de larvas ocorridos em abril-maio de 2007 e abril de 2008 nada mais são do que o reflexo da explosão da população de fêmeas de *A. cajennense* que ocorreram anteriormente em outubro-novembro de 2006 e 2007 e janeiro-fevereiro de 2007 e 2008 (Figura 9). Esse período corresponde ao tempo necessário à fêmea na busca pelo hospedeiro, fixação na pele, ingurgitamento, desprendimento da teleógina, período de pré-postura, postura, incubação dos ovos e eclosão das larvas. As fêmeas dos maiores picos ocorridos em outubro-novembro e janeiro-fevereiro se relacionam com a produção dos maiores picos de larvas em abril e maio. Nesta época do ano ocorre maior atividade dos adultos na pastagem na busca pelo hospedeiro e maior eficiência reprodutiva das teleóginas, correspondendo à época de maiores temperaturas médias e

umidade relativa na região. O pico de larvas ocorrido em outubro-novembro de 2007, por sua vez, parece ser decorrente da explosão da população de fêmeas de *A. dubitatum* que ocorreu não só em outubro-novembro de 2006 e 2007, mas significativamente também, em janeiro-abril de 2007 e 2008 (Figura 10). Fêmeas deste carrapato foram capturadas até o mês de maio nos dois anos de duração do experimento, ao passo que fêmeas de *A. cajennense* praticamente já não eram encontradas no mês de fevereiro. Este fato nos leva a crer que a população de adultos de *A. dubitatum*, pelo menos na região em questão parece resistir melhor à pressão ambiental suportando maiores temperaturas médias e umidade relativa do ar quando comparada à população de adultos de *A. cajennense*. As condições climáticas apresentadas em Coronel Pacheco devem ter sido um fator importante favorecendo a sobrevivência, por mais tempo, também de larvas deste carrapato nas pastagens, daí a observação do referido pico. A percepção destas diferenças é de fundamental importância para a realização de estudos epidemiológicos regionalizados de ixodídeos, em função de condições locais diversas como clima, vegetação, relevo, altitude e a disponibilidade de hospedeiros apresentadas entre as diferentes regiões zoogeográficas de distribuição destes carrapatos.

Os picos da população de ninfas em julho e outubro-novembro de 2006 e 2007 ocorreram logo em seguida aos maiores picos de larvas observados nos mesmos períodos, correspondendo ao intervalo necessário para a captura dos hospedeiros pela larva, fixação à pele, ingurgitamento, desprendimento da larva ingurgitada e ecdise para o estágio de ninfa no ambiente.

O aumento da curva populacional de estádios adultos de *A. cajennense* de outubro até março está de acordo com o padrão sazonal conhecido para esta espécie de carrapato na Região Sudeste do Brasil. Souza e Serra-Freire (1994a) relataram outubro-maio como o período de maior população de adultos no Rio de Janeiro. Oliveira *et al.* (2000) descreveram a

maior infestação das pastagens por estádios adultos de agosto a maio em Minas Gerais. Souza *et al.* (2006) encontraram aumento na população de adultos de *A. cajennense* numa área de mata ciliar em São Paulo de outubro a abril. O aumento populacional de estádios adultos de *A. dubitatum* de agosto até abril encontrado no presente estudo também está de acordo com o padrão sazonal observado por Souza *et al.* (2006) em São Paulo cujo aumento se deu a partir de julho até abril.

Pela análise das curvas de flutuação da população de machos e fêmeas de *A. cajennense* (Figura 9) e *A. dubitatum* (Figura 10) observou-se que durante o período de maior atividade de adultos (outubro-abril) a proporção de machos foi maior na primeira metade (outubro-dezembro) que na segunda (janeiro-abril), nos dois anos de experimento. Esta proporção foi de, aproximadamente, três machos para cada fêmea (3:1) em outubro-dezembro de 2006 e 2007 caindo para 1,5:1 em janeiro-abril de 2007 e 2008 para *A. cajennense* e de três machos para cada fêmea (3:1) caindo para 1:1 para *A. dubitatum* no mesmo período. Estes resultados são coerentes aos encontrados por Oliveira (1998) que observou um aumento populacional nas pastagens, primeiro de machos, a partir de setembro, mantendo elevada a relação de machos para cada fêmea até o mês de novembro e, posteriormente, de fêmeas, a partir de outubro, nos dois anos de observação. Entre agosto e outubro a razão observada foi de 4,17 machos para cada fêmea e de 1,67 machos para cada fêmea, nos outros meses do ano.

Larvas não foram encontradas nas pastagens de outubro de 2006 a janeiro de 2007 e de dezembro de 2007 a fevereiro de 2008, ninfas apresentaram contagens muito baixas de dezembro a abril e adultos ocorreram durante todo o ano, porém, com presença reduzida de maio a julho. Essa redução ou ausência total de um determinado estágio na pastagem aliada aos dados já existentes na literatura, sugerem que, embora haja um padrão sazonal diferenciado com prolongamento da

disponibilidade de estádios de *A. dubitatum* em relação à população de *A. cajennense* há ocorrência de diapausa comportamental nas larvas não alimentadas durante a primavera e verão para estas duas espécies de carrapatos na área de estudo em questão.

#### **4.3 Flutuação da população de larvas, ninfas e adultos de vida parasitária de *A. cajennense***

Foram capturadas 8800 larvas e 1452 ninfas ingurgitadas pela técnica da raspagem de um dos lados dos equinos nos dois anos do experimento (Tabela 2). As larvas de *A. cajennense* foram capturadas durante o período de maio a setembro de 2006, de março a setembro de 2007 e a partir de abril de 2008. Apresentaram picos populacionais bem definidos sendo os maiores em maio de 2006 representando 73% das larvas capturadas neste ano, abril-maio de 2007 com 74% e abril de 2008 com 99% (Figura 11). Estes picos refletem o potencial reprodutivo das fêmeas de *A. cajennense* observadas sobre os animais entre os meses de novembro e fevereiro, à semelhança do que ocorreu em vida livre (Figura 13).

Ninfas de *A. cajennense* foram capturadas durante todos os meses do ano e apresentaram picos populacionais entre os meses de junho a novembro e densidade populacional máxima em julho de 2006 com 41% das ninfas capturadas neste ano e julho de 2007 com 47% (Figura 11). Os picos populacionais dos estádios imaturos ocorreram durante o outono e o inverno quando as temperaturas e umidades relativas do ar estavam mais baixas (Figuras 5 e 6). A ausência de picos de larvas e ninfas de *A. cajennense* no bimestre outubro-novembro de 2006 e 2007 em vida parasitária reforça a hipótese de que os picos ocorridos no mesmo período em vida livre (Figura 7) sejam realmente de larvas e ninfas pertencentes à espécie *A. dubitatum*.

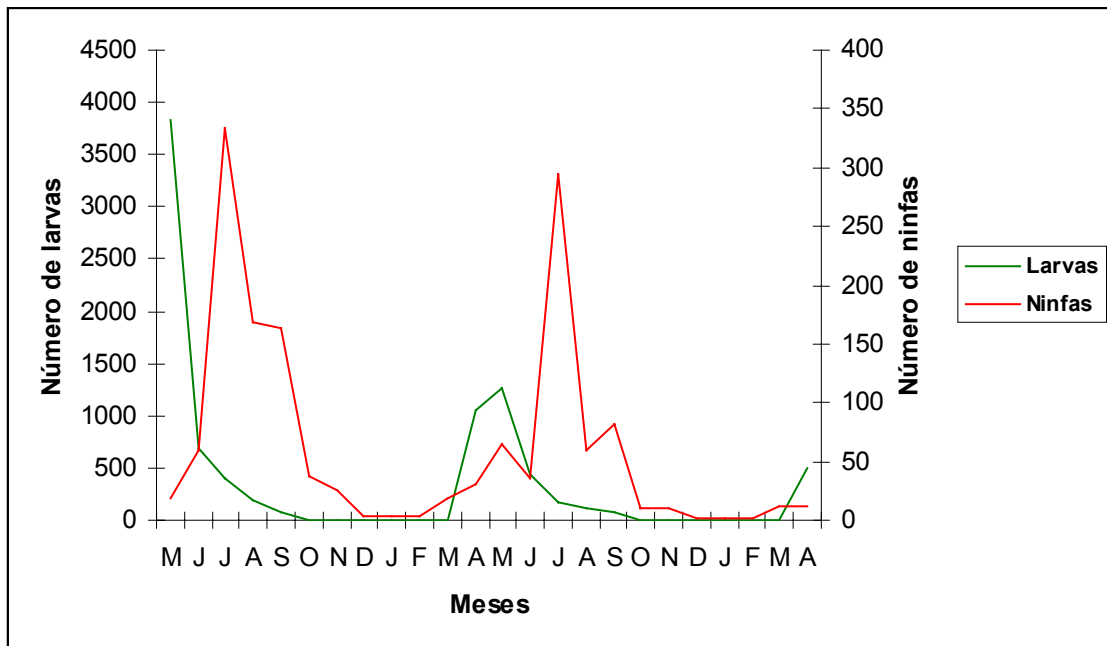


Figura 11 - Flutuação da população de larvas e ninfas de vida parasitária de *A. cajennense* coletadas no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

Dos 7022 carrapatos adultos contados nos equinos durante os dois anos de experimento (Tabela 2), observou-se que este estágio ocorreu durante todos os meses do ano com aumento populacional de setembro até abril. Foram identificados picos na população de carrapatos sendo novembro-dezembro de 2006 (72%) e 2007 (28%), janeiro-fevereiro de 2007 (53%) e 2008 (87%) os meses de maior captura de exemplares de *A. cajennense* (Figura 12). Ao contrário do que ocorreu com os estádios imaturos, os picos populacionais dos estádios adultos ocorreram durante a primavera e o verão quando as temperaturas e umidades relativas do ar estavam mais altas (Figuras 5 e 6).

Moreno (1984) em estudo da flutuação populacional de *A. cajennense* em bovinos leiteiros em propriedades rurais da região Metalúrgica de Minas Gerais observou maior presença de larvas sobre os animais entre os meses de abril a junho. Este resultado coincide parcialmente com os dados do presente trabalho, quando foram

coletadas larvas deste carrapato até o mês de setembro, nos dois anos de observação. Estas diferenças na flutuação populacional podem ser atribuídas às diferenças nas técnicas empregadas na amostragem, intervalo entre as coletas, infestações dos hospedeiros e aos diferentes micro climas nos locais onde foram realizados os experimentos. No entanto, corroboram os resultados encontrados por Oliveira *et al.* (2003) no município de Pedro Leopoldo, Minas Gerais, que encontraram larvas deste carrapato entre os meses de abril e agosto, com pico populacional em maio, ocorrendo em número muito reduzido ou mesmo completamente ausentes na vegetação, no restante do ano.

O pico da população de ninfas ingurgitadas teve início um mês após o maior pico de larvas que ocorreu nos meses de abril-maio durante os dois anos do experimento. Este intervalo corresponde ao tempo necessário para o ingurgitamento das larvas, desprendimento do hospedeiro, pré-ecdise, ecdise para ninfas, encontro de novo

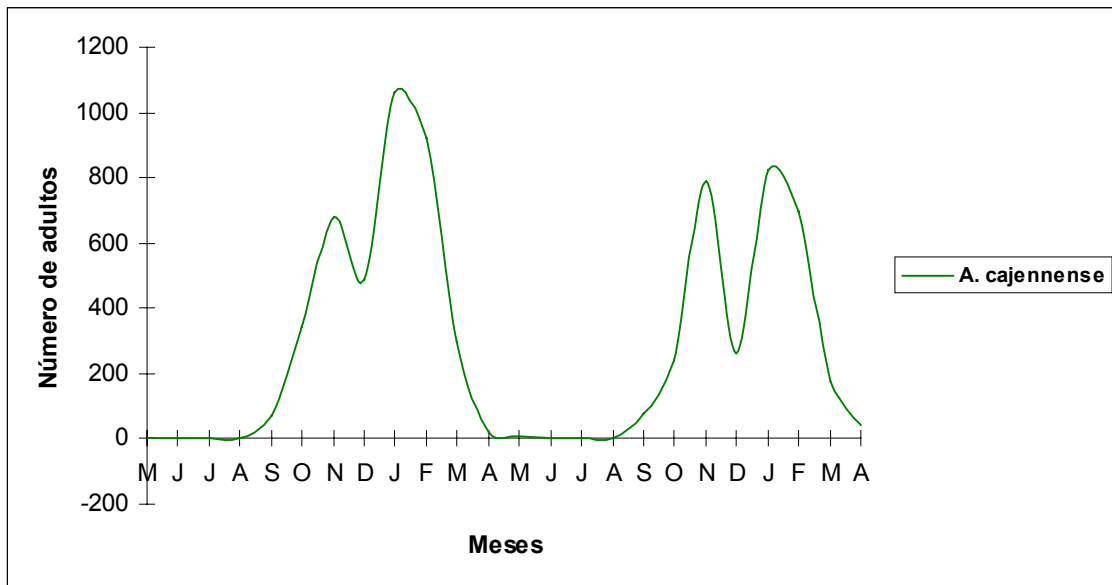


Figura 12 - Flutuação da população de adultos de vida parasitária de *A. cajennense* coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

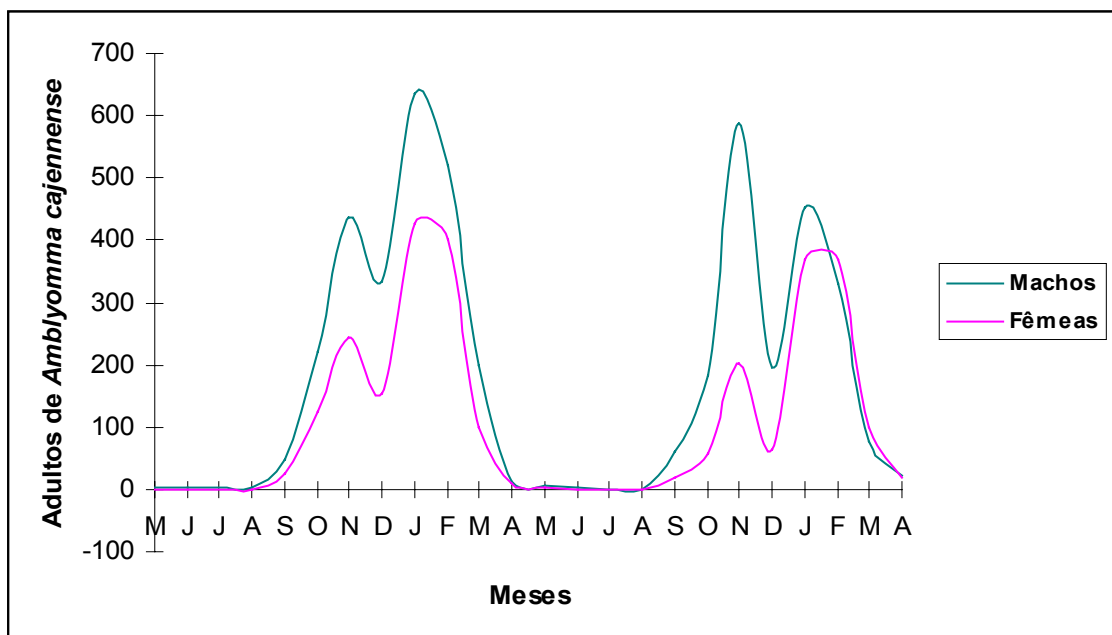


Figura 13 - Flutuação da população de machos e fêmeas de *A. cajennense* em vida parasitária coletados no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

hospedeiro e ingurgitamento ninfal, uma vez que as ninfas coletadas pela técnica de raspagem já estavam totalmente ingurgitadas e foram facilmente removidas da pele do animal. Confrontando os dados deste trabalho com os resultados encontrados por Moreno (1984) e Oliveira *et al.* (2003) em Minas Gerais, Cunha (1986) no Rio de Janeiro, Lemos *et al.* (1997) e Labruna *et al.* (2002) em São Paulo, observa-se uma grande concordância entre os resultados destes autores, quando o período de ocorrência de ninfas sobre os animais se dá no final do inverno e início da primavera.

Com relação aos carrapatos adultos, os dados levantados por Moreno (1984), Lemos *et al.* (1997), Labruna *et al.* (2002) e Oliveira *et al.* (2003) concordam com o período de ocorrência do estágio adulto de *A. cajennense* durante todos os meses do ano, com aumento populacional na primavera e verão. No entanto, Cunha (1986) e Souza e Serra-Freire (1992) observaram períodos mais curtos na ocorrência do carrapato adulto, provavelmente, influenciado pelas diferentes condições climáticas nos locais do experimento, bem como as espécies de hospedeiros utilizados como modelo experimental.

Pela análise das curvas de flutuação da população de machos e fêmeas de *A. cajennense* (Figura 13) observou-se que durante o período de maior atividade de adultos (setembro-abril) a proporção de machos foi maior na primeira metade (setembro-dezembro) que na segunda (janeiro-abril), nos dois anos de experimento. Esta proporção foi de, aproximadamente, 2,8 machos para cada fêmea (2,8: 1) em setembro-dezembro de 2006 caindo para 1,4: 1 em janeiro-abril de 2007 e de 3 machos para cada fêmea (3:1) em setembro-dezembro de 2007 caindo para 1:1 em janeiro-abril de 2008. Estes resultados são coerentes com os encontrados por Labruna *et al.* (2002) que encontraram uma proporção de quatro machos para cada fêmea em outubro-dezembro de 1997 (4:1) caindo para 2:1 em janeiro-março de 1998. Similarmente, no

segundo ano do experimento a proporção foi de 2,5 machos para cada fêmea em outubro-dezembro de 1998 caindo para 1,4: 1 em janeiro-março de 1999. Esse maior número de machos em relação ao número de fêmeas pode ser explicado pelo maior tempo de permanência sobre os animais. Assim, o mesmo macho pode ser contado em mais de uma observação. Além disso, o parasitismo prolongado de machos de *A. cajennense* parece ter implicações importantes fazendo com que o hospedeiro se torne mais atrativo para as fêmeas e outros estádios não alimentados do carrapato. Segundo Oliveira (2004), a presença de machos precedendo o aparecimento de fêmeas está, possivelmente, relacionada à necessidade dos machos de encontrarem seus hospedeiros mais cedo para realizar o repasto sanguíneo e, assim, produzir feromônios que vão possibilitar a atração das fêmeas para os animais. Dessa forma, com o aumento da produção de feromônios pelos machos alimentados, a procura do hospedeiro pela fêmea deste carrapato aumenta, diminuindo a proporção dos machos em relação às fêmeas sobre os cavalos na segunda metade da estação.

Confrontando os dados das curvas de flutuação populacional destes carrapatos em vida livre e parasitária nota-se uma semelhança muito grande entre o que acontece a campo e sobre o animal. Observa-se uma estreita relação, tanto no período de ocorrência dos diferentes estádios durante o ano, quanto no perfil dos picos de carrapatos. Este fato já havia sido mostrado em estudos anteriores como o de Oliveira (1998) e revela-se um subsídio importante para a realização de futuros trabalhos de pesquisa em epidemiologia e dinâmica populacional agregando vantagens operacionais e de tempo aos estudos. Outro aspecto importante, diz respeito aos tratamentos com produtos carrapaticidas que poderão ser aplicados sobre o hospedeiro em determinado estágio do ciclo evolutivo de vida parasitária predominantes em épocas específicas do ano atingindo também a população correspondente em vida livre, proporcionando a desinfestação das



pastagens dentro de esquemas estratégicos de controle deste carrapato. As formas imaturas deste parasito (larvas e ninfas) são mais sensíveis quando submetidas aos efeitos dos tratamentos com as bases químicas existentes no mercado. A ocorrência de períodos do ano em que há o predomínio destas formas do carrapato na natureza proporciona grandes possibilidades no seu combate, uma vez que uma redução drástica nestas populações levará também à ocorrência de uma população muito menor de adultos nas pastagens e parasitando os animais nas estações seguintes de primavera e verão. Vislumbra-se também, uma redução do número de casos de febre maculosa, uma vez que se acredita que a doença seja transmitida por esses estádios do carrapato dada sua ocorrência, principalmente, no período compreendido entre os meses de maio e outubro.

#### **4.4 Eficiência de armadilhas de CO<sub>2</sub> na coleta de estádios de vida livre de *A. cajennense* e *A. dubitatum***

Armadilhas utilizando CO<sub>2</sub> como atrativo químico são sabidamente efetivas para a captura de ninfas e adultos em vida livre de algumas espécies de carrapatos tais como *A. cajennense* e *Amblyomma parvum* (Cançado *et al.*, 2008). Ainda que a principal fonte de CO<sub>2</sub> seja proveniente do gelo seco, a armadilha química utilizando ácido láctico a 20% (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>) e carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) vem sendo testada como fonte alternativa de CO<sub>2</sub> em circunstâncias onde é difícil a obtenção do gelo seco (Cançado *et al.*, 2008).

O número total de carrapatos em cada fase do ciclo (ninfas e adultos) coletados pelas duas técnicas de amostragem, armadilhas de CO<sub>2</sub> com gelo seco e com ácido láctico a 20% e carbonato de cálcio, durante os dois anos de observação foi comparado, estatisticamente, pelo teste de t Student (Tabela 3).

Larvas não foram coletadas por estas técnicas, pois segundo Oliveira (1998) a

baixa eficiência das armadilhas de CO<sub>2</sub> para a captura de larvas está associada, principalmente, à sua pequena capacidade de deslocamento horizontal ou lateral e pela inibição da atividade larval devido às baixas temperaturas e elevada concentração de CO<sub>2</sub> que ocorrem nas proximidades da fonte, sendo indicado, portanto, para sua amostragem o arraste de flanela.

De acordo com os resultados apresentados, ambas as armadilhas proporcionaram capturas de números semelhantes de carrapatos ( $p > 0,05$ ), confirmando a eficiência desta armadilha química e viabilizando seu uso em lugares de difícil acesso ou distantes de um fornecedor de gelo seco como é o caso da área de estudo em questão. Outro ponto positivo foi a coleta de adultos de *A. dubitatum* pela primeira vez com este tipo de armadilha mostrando a eficiência da reação do ácido láctico com o carbonato de cálcio também para a captura dessa espécie de carrapato a campo. Cançado *et al.* (2008) já haviam comprovado a eficiência desta armadilha no Pantanal matogrossense para a coleta de carrapatos do gênero *Amblyomma* (*A. cajennense* e *A. parvum*), mas não para *A. dubitatum*. É uma armadilha de baixo custo, principalmente quando comparada ao gelo seco e fácil de ser confeccionada.

Um ponto negativo, no entanto, é o curto período que o carrapato permanece na armadilha; nas armadilhas utilizando o gelo seco, os carrapatos parecem permanecer atraídos por mais tempo pela fonte de CO<sub>2</sub>, ao passo que nas armadilhas químicas esse tempo é menor. Dessa forma, quando se têm áreas muito extensas, em que precisam se colocar um número maior de armadilhas, ainda são indicadas as armadilhas de gelo seco como atrativo para os carrapatos.

Tabela 3 - Coleta de ninfas e adultos de vida livre de *A. cajennense* e *A. dubitatum* por técnicas de amostragem utilizando CO<sub>2</sub>, no município de Coronel Pacheco, MG, no período de maio de 2006 a abril de 2008.

Carrapatos de vida livre	Gelo seco	Ácido lático a 20% + carbonato de cálcio	Flanela controle
	média ± desvio padrão n° total de carrapatos (%)	média ± desvio padrão n° total de carrapatos (%)	média ± desvio padrão n° total de carrapatos (%)
<b>Ninfas</b>	45,29 <sup>a</sup> ± 71,76 1087 (51%)	42,33 <sup>a</sup> ± 73,37 1016 (47,6%)	1,25 <sup>b</sup> ± 3,11 30 (1,4%)
<b><i>A. cajennense</i></b>	7,83 <sup>a</sup> ± 15,43 188 (57,3%)	5,54 <sup>a</sup> ± 11,88 133 (40,5%)	0,29 <sup>b</sup> ± 0,69 7 (2,1%)
<b><i>A. dubitatum</i></b>	6,29 <sup>a</sup> ± 11,35 151 (51,8%)	5,54 <sup>a</sup> ± 10,81 133 (45,5%)	0,33 <sup>b</sup> ± 0,63 8 (2,7%)

Médias seguidas de letras iguais na mesma linha são estatisticamente semelhantes (Teste t de Student 5%).

#### 4.5 Teste de hemolinfa

Dos 620 carrapatos adultos de vida livre (328 *A. cajennense* e 292 *A. dubitatum*) e dos 717 adultos de vida parasitária (717 *A. cajennense*) coletados, 1213 exemplares (90% dos carrapatos coletados) foram testados. Dos testes realizados 100% foram negativos para a presença de microrganismos semelhantes à riquetsia. Os 10% restantes formado somente por exemplares de adultos de vida parasitária (124 carrapatos) não foram processados em virtude de problemas técnicos que causaram a morte destes espécimes devido a uma falha de controle da temperatura da estufa em que eram mantidos os carrapatos antes da realização do teste.

Labruna *et al.* (2004a) encontraram em 12 carrapatos da espécie *A. dubitatum* microrganismos semelhantes à riquetsia dentro de hemócitos. No entanto, outros 20 carrapatos foram negativos e oito apresentaram resultados inconclusivos porque as células da hemolinfa foram completamente perdidas durante os procedimentos de lavagem da técnica.

Pinter e Labruna (2006) submeteram 669 exemplares de *A. aureolatum* ao teste de hemolinfa para pesquisa de riquetsias e tiveram perdas (264 carrapatos) superiores a deste experimento, em virtude de falhas técnicas no momento da execução do teste. Pacheco (2007) coletou um total de 841 (367 machos e 474 fêmeas) carrapatos adultos da espécie *A. dubitatum*, os quais foram submetidos ao teste de hemolinfa. Dos 841 *A. dubitatum* coletados, em 153 (18,18%) amostras de hemolinfa foram observados organismos morfológicamente compatíveis com riquetsias, 452 foram negativas (53,74%) e 236 (28,06%) amostras de carrapatos foram inconclusivas.

#### 4.6 Análise pela PCR

Pela PCR, foram testados, individualmente, 400 carrapatos adultos de vida livre (200 *A. cajennense* e 200 *A. dubitatum*) e 200 carrapatos adultos de vida parasitária. Os carrapatos testados na PCR incluíram aqueles que não tiveram sua hemolinfa testada, em virtude da morte durante incubação na estufa. Foram testadas ainda

1000 larvas de vida livre (100 *pools* de 10 larvas cada), 1000 ninfas de vida livre (200 *pools* de 5 ninfas cada), 1000 larvas de vida parasitária (100 *pools* de 10 larvas cada) e 1000 ninfas de vida parasitária (200 *pools* de 5 ninfas cada).

Dois carrapatos adultos de vida livre da espécie *A. cajennense* (um macho e uma fêmea) ambos coletados em março de 2007 e quatro *pools* de ninfas de vida livre coletadas em novembro de 2006 e maio, outubro e novembro de 2007 apresentaram produtos de tamanhos esperados para os *primers* CS2-78 e CS2-323. Quando estes carrapatos positivos foram testados para outros *primers* descritos na Tabela 1, os dois carrapatos adultos produziram produtos de tamanhos esperados para todas as reações (*OmpA* e *OmpB*) ao passo que, os quatro *pools* de ninfas produziram produtos de tamanhos esperados somente na reação com os *primers* *OmpB*. Ainda com relação às ninfas, as reações produziram bandas fracas, quando visualizadas à luz ultravioleta, em virtude, da baixa quantidade de DNA concentrada durante o processo de extração. Dessa forma, as amostras de ninfas tiveram seu DNA clonado, conforme a técnica descrita anteriormente, na tentativa de se obter fragmentos ideais para o sequenciamento.

O sequenciamento de DNA do fragmento amplificado das duas amostras de carrapatos adultos de *A. cajennense* mostrou 100% de similaridade com a sequência correspondente de *R. rickettsii* no Gen Bank tanto para o gene *gltA* como para o *OmpA* e *OmpB* (Anexos 1, 2, 3, 4, 5 e 6). O sequenciamento do gene *gltA* mostrou ser 100% similar à sequência correspondente (CP000766) de *R. rickettsii* amostra Sheila Smith e 100% similar à sequência (U59729) da cepa Bitterroot de *R. rickettsii* isolada de carrapatos *D. andersoni* nos EUA. Os fragmentos do gene *OmpA* foram 100% similares à sequência correspondente (CP000766) de *R. rickettsii* amostra Sheila Smith e 100% similares à sequência (DQ16483) de um isolado de *R. rickettsii* do Panamá. Os fragmentos do gene *OmpB* foram 100% similares à sequência

correspondente (CP000766) de *R. rickettsii* amostra Sheila Smith.

Quando o fragmento amplificado das quatro amostras de ninfas foi sequenciado (Anexo 7), este mostrou 99,7% de similaridade com a sequência correspondente (AF394896) de *Rickettsia tamurae* amostra AT-1 no Gen Bank para o gene *gltA*. Similaridades de 99,1% também foram observadas com as sequências correspondentes (DQ100163) de *Rickettsia monacensis* amostra IrR/Munich e com as sequências correspondentes (AB297812) de *Rickettsia asiatica*. O sequenciamento de DNA do fragmento amplificado das amostras clonadas (*OmpB*) ainda não foi realizado com sucesso.

O fragmento amplificado de uma amostra de ninfa coletada em maio de 2006 para o gene 16S rDNA e seu posterior sequenciamento, mostrou ser 99,7% similar à sequência correspondente (FJ424404) de *A. cajennense* disponível no Gen Bank ao passo que o sequenciamento de outra amostra coletada em novembro de 2007 foi 100% similar à sequência correspondente (DQ858955) de *A. dubitatum* (Anexos 8 e 9).

O presente estudo, mais uma vez, forneceu evidências moleculares da presença de *R. rickettsii* em pelo menos dois carrapatos *A. cajennense* coletados nas pastagens de uma área endêmica para FMB em Coronel Pacheco. Embora *R. rickettsii* tenha sido relatada infectando carrapatos da espécie *A. cajennense* no Brasil e em outros países da América Latina (Moreira e Magalhães, 1935; Dias *et al.*, 1937; Patino-Camargo, 1941; Bustamante e Varela, 1947; Valejo-Freire, 1946; Rodaniche, 1953) a primeira identificação com caracterização molecular de *R. rickettsii* em carrapatos desta espécie só foi confirmada neste mesmo local em estudo anterior (Guedes *et al.*, 2005). As sequências de DNA dos genes *gltA*, *OmpA* e *OmpB* geradas no presente estudo são similares às sequências obtidas de carrapatos *A. cajennense* infectados encontrados nessa mesma área nos anos de 2003 e 2004 bem como às sequências correspondentes de *R. rickettsii* amostra Sheila Smith dos EUA. A cepa Sheila Smith

é considerada altamente virulenta (Eremeeva *et al.*, 2003) e o genótipo de *R. rickettsii* detectado em carrapatos *A. cajennense* no presente estudo, possivelmente, corresponde ao do caso de FMB confirmado em um homem na área endêmica de Coronel Pacheco no ano de 2000.

Foram testados, no total, 600 carrapatos adultos (400 *A. cajennense* e 200 *A. dubitatum*); somente dois carrapatos *A. cajennense* continham DNA riquetsial, determinando, dessa forma, uma taxa mínima de infecção de *R. rickettsii* em *A. cajennense* de 0,5%. Este valor se encontra abaixo do valor encontrado no estudo anterior, no qual a taxa foi de 1,28% de carrapatos infectados (Guedes *et al.*, 2005), mas se compara a outros registros da literatura no Brasil e nos EUA. No Estado de São Paulo, Sangioni *et al.* (2005) testaram pela PCR 810 espécimes de *A. cajennense* de três áreas endêmicas para FMB, mas nenhum carrapato infectado foi encontrado. Numa outra área endêmica, ainda em São Paulo, Pinter e Labruna (2006) detectaram *R. rickettsii* em seis (0,89%) de 669 carrapatos *A. aureolatum* testados. Nos EUA, a taxa de infecção de *R. rickettsii* relatada nas populações do carrapato *D. variabilis* de áreas endêmicas para a FMMR varia de 0,05 a 1,3% (Burgdorfer, 1988). Essa baixa taxa de infecção ressalta o efeito letal dessa bactéria para seu carrapato vetor (Niebylski *et al.* 1999).

Em estudo anterior, realizado por Guedes *et al.* (2005) foram testados apenas 78 carrapatos adultos da espécie *A. cajennense* (26 *pools* de três carrapatos cada) coletados em um período curto de tempo (outubro de 2003 a maio de 2004), ou seja, uma pequena amostra que não representava suficientemente o cenário real a campo. No trabalho atual, por sua vez, foram testados, individualmente, 400 adultos de *A. cajennense* coletados ao longo de dois anos de estudos sobre a dinâmica populacional deste carrapato bem como de *A. dubitatum*. Estes dados ajudam a ampliar a visão sobre o panorama da distribuição da doença em relação à

distribuição da população do vetor nessa área endêmica.

Já *R. tamurae*, encontrada em quatro *pools* de ninfas de vida livre de *Amblyomma* sp., é uma riquetsia de patogenicidade desconhecida para humanos até o que se sabe no momento e que tem sido relatada em carrapatos da espécie *Amblyomma testudinarium* no Japão e Tailândia (Fournier *et al.*, 2006). Neste trabalho os autores ressaltam a marcada diferença do genótipo dessa riquetsia em relação aos outros membros do GFM, principalmente, no que se refere ao gene *OmpB* (Anexo 10). Este, provavelmente, é o motivo pelo qual, os produtos amplificados pela PCR com outros genes tenham resultado em um grande número de reações inespecíficas e pela dificuldade encontrada no sequenciamento do gene *OmpB*, mesmo nas amostras clonadas.

No presente estudo, *R. tamurae* foi detectada em ninfas de *A. cajennense* e de *A. dubitatum*, identificadas pelo sequenciamento do gene 16S rDNA. Em estudo anterior, realizado na mesma área de Coronel Pacheco, Guedes *et al.* (2005) não encontraram DNA riquetsial em nenhum carrapato *A. dubitatum*. Apesar de não terem sido coletados carrapatos *A. dubitatum* diretamente das capivaras que são consideradas hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* na natureza (Souza *et al.*, 2009), os dados deste trabalho anterior aliados aos atuais, nos levam a acreditar que, pelo menos nessa área, a população de *A. cajennense* seja mais suscetível que a população de *A. dubitatum* às infecções por *R. rickettsii*.

Trabalhos realizados, principalmente, em áreas endêmicas do Estado de São Paulo, normalmente, relatam carrapatos da espécie *A. dubitatum* infectados por *Rickettsia bellii* (Labruna *et al.*, 2004a; Estrada *et al.*, 2006; Pacheco, 2007) e menos comumente, por uma cepa de *Rickettsia*, filogeneticamente próxima à *Rickettsia parkeri* (Labruna *et al.*, 2004a).

Como ainda não foi possível o sequenciamento do fragmento amplificado

do gene *OmpB* pouco se tem a discutir a respeito, mas esse novo achado gera especulações a respeito da ecologia de *R. rickettsii* que pode ter sua transmissão minimizada dentro das populações destas duas espécies de carrapatos na área endêmica em virtude da presença dessa riquetsia de patogenicidade desconhecida. Saindo do campo das hipóteses, é necessário dar continuidade a esses estudos na tentativa de fornecer informações importantes que ajudem na compreensão do padrão irregular de ocorrência da FMB em áreas endêmicas.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como não foi possível avaliar a dinâmica populacional de *A. dubitatum* em vida parasitária por motivos já citados anteriormente, futuros estudos deverão ser direcionados no sentido de conhecer o perfil de larvas, ninfas e adultos sobre o corpo dos animais e comparar com o perfil já conhecido e aqui explicitado, deste carrapato em vida livre. *A. cajennense* apresenta estreita relação entre o perfil das curvas populacionais de larvas, ninfas e adultos, em vida livre e em vida parasitária. Será que o mesmo é observado para as populações de *A. dubitatum* nessa e em outras regiões do país?

Outro ponto a ser esclarecido é a validade de *R. tamurae*, identificada em ninfas de *A. cajennense* e *A. dubitatum*. Até o momento, conseguiu-se realizar somente o sequenciamento do gene *gltA* dessa riquetsia. Uma caracterização mais ampla, com o sequenciamento do gene *OmpB*, que teve várias tentativas frustradas mesmo após clonagem das amostras, bem como do gene *OmpA*, seria ideal para nos fornecer maiores informações.

Por fim, considerando que *R. rickettsii* continua circulando na população de *A. cajennense* que é um carrapato que ocorre durante todo o ano na região e que apresenta baixa especificidade parasitária, com possibilidade de parasitar humanos, inclusive, a região de Coronel Pacheco

mostra-se um local de risco para ocorrência de FMB na população, especialmente, para os funcionários diretamente ligados ao CECP, local onde foi realizada a parte experimental do trabalho. Dessa forma, torna-se necessária uma vigilância epidemiológica constante no intuito de conscientizar, alertar e prevenir a população quanto aos riscos da doença. Métodos de controle estratégico dos carrapatos vetores e a educação sanitária para conhecimento da doença e das medidas de biossegurança de caráter preventivo serão ótimos aliados no decorrer desse processo.

## 6 CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos por meio deste estudo, conduzido no município de Coronel Pacheco, Minas Gerais, no período de maio de 2006 a abril de 2008, concluiu-se que:

- Larvas de *Amblyomma* sp. não são encontradas durante todo o ano na pastagem e apresentam picos populacionais bem definidos ocorrendo, principalmente, no mês de maio para *A. cajennense* e nos meses de maio e outubro-novembro para *A. dubitatum*.
- Ninfas de *Amblyomma* sp. são encontradas durante todo o ano na pastagem, mesmo que em quantidades reduzidas em alguns meses das estações quentes e chuvosas e apresentam picos populacionais bem definidos ocorrendo, principalmente, no mês de julho para *A. cajennense* e nos meses de julho e outubro-novembro para *A. dubitatum*.
- Carrapatos adultos são encontrados durante todos os meses do ano na pastagem com aumento populacional de outubro até março e de agosto até abril para *A. cajennense* e para *A. dubitatum*, respectivamente.
- Larvas de *A. cajennense* não são encontradas durante todo o ano

sobre os equinos e apresentam picos populacionais bem definidos ocorrendo, principalmente, no bimestre abril-maio.

- Ninfas de *A. cajennense* são encontradas durante todos os meses do ano sobre os equinos, mesmo que em quantidades reduzidas em alguns meses das estações quentes e chuvosas e apresentam picos populacionais bem definidos ocorrendo, principalmente, no mês de julho.
- Adultos de *A. cajennense* são encontrados nos equinos durante todos os meses do ano com aumento populacional de setembro até abril.
- Há uma estreita relação entre o perfil das curvas populacionais de larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense*, em vida livre e em vida parasitária.
- Embora haja um padrão sazonal diferenciado com prolongamento da disponibilidade de estádios de *A. dubitatum* em relação à população de *A. cajennense* sugere-se a ocorrência de diapausa comportamental nas larvas não alimentadas durante a primavera e verão para estas duas espécies de carrapatos na área de estudo em questão.
- Há um aumento populacional nas pastagens, primeiro de machos mantendo elevada a relação de machos para cada fêmea no período de outubro a dezembro e, posteriormente, de fêmeas com tendência ao equilíbrio no período de janeiro a abril, nos dois anos de experimento, tanto para *A. cajennense* como para *A. dubitatum*.
- Armadilhas químicas utilizando ácido láctico a 20% e carbonato de

cálcio como fonte de CO<sub>2</sub> são eficientes na coleta de estádios de vida livre, tanto de *A. cajennense* como de *A. dubitatum*.

- Há comprovação biomolecular da circulação de *R. rickettsii* nas populações de carrapatos *A. cajennense* da área em questão, não se confirmando o mesmo para *A. dubitatum*.
- Os resultados apontam para a identificação de *R. tamurae* em ninfas tanto de *A. cajennense* como de *A. dubitatum*.

## 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.
- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W. *et al.* Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ANTUNES, F.Z. Caracterização climática do Estado de Minas Gerais. *Inf. Agropec.*, v.12, n.138, p.9-13, 1986.
- APPERSON, C.S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W.L. *et al.* Tick-borne diseases in North Carolina: is "*Rickettsia amblyommii*" a possible cause of Rickettsiosis reported as Rocky Mountain Spotted Fever? *Vector-Borne Zoo. Dis.*, v.8, n.5, p.597-606, 2008.
- 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.
- BELOZEROV, V. N. Diapause and biological rhythms in ticks. *In: OBENCHAIN, F.D. and GALUN, R. (Eds.), Physiology of ticks.* Pergamon: Oxford, 1982. p. 469-500.

- BILLETER, S.A.; BLANTON, H.L.; LITTLE, S.E. *et al.* Detection of "*Rickettsia amblyommii*" in association with a tick bite rash. *Vector-Borne Zoo. Dis.*, v.7, n.4, p.607-610, 2007.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D.H. (Ed.) *Biology of rickettsial diseases*. CRC: Boca Raton, 1998. p. 33-50.
- BURGDORFER, W. The hemolinf test. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.19, n.6, p. 1010-1014, 1970.
- BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias em Mexico. *Rev. Inst. Salub. Enf. Trops.*, v. 8, p. 3-14, 1947.
- CABREIRA, R. R. *Influência do fotoperíodo e da temperatura na diapausa comportamental em larvas não-alimentadas de Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) provenientes de Pirassununga, São Paulo, Brasil*. 2008. 78f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- CAMARGO-NEVES, V.L.F. (coord.). *Manual de vigilância acarológica*. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde/Superintendência de Controle de Endemias, 2004. 62p.
- CANÇADO, P.H.D.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H. *et al.* Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO<sub>2</sub> tick trap. *Parasitol. Res.*, v.103, p.1-7, 2008.
- CARDOSO, L.D. *Detecção e caracterização de Rickettsia spp. circulante em foco inativo peri-urbano do município de Caratinga, MG*. 2004. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto.
- CARMICHAEL, J.R.; FUERST, P.A. A rickettsial mixed infection in a *Dermacentor variabilis* tick from Ohio. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1078, p.334-337, 2006.
- CLIFFORD, C.M.; ANASTOS, G. The use of chaetotaxy in the identificaton of larval ticks (acarina: Ixodidae). *J. Parasitol.*, v.46, p.567-578, 1960.
- CUNHA, A.P. *Controle estratégico de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) e Anocentor nitens (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em equinos, Minas Gerais, Brasil*. 2006. 62f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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, Seropédica.
- 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, Seropédica.
- DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L. *et al.* Rock Mountain Spotted Fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N. Engl. J. Med*, v. 353, n. 6, p. 587-594, 2005.
- DIAS, E.; MARTINS, A.; RIBEIRO, D.J. Thypho exanthematico no Oeste de Minas Gerais. *Brasil-Medico*, v.51, p.651-655, 1937.
- 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. *et al.* Genetic analysis of isolates of *Rickettsia rickettsii* that differ in virulence. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v. 990, p. 717-722, 2003.

- ESTRADA, D. A.; SCHUMAKER, T. T. S.; SOUZA, C. E. *et al.* Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, n. 1, p. 68-71, 2006.
- FAMADAS, K.; LEMOS, E. R. S.; COURA, J. R. *et al.* *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) parasitando humano em área de foco de febre maculosa, São Paulo – Brasil. *Acta Parasitol. Portuguesa*, v. 4, p. 154, 1997.
- FOURNIER, P.E.; TAKADA, N.; FUJITA, H. *et al.* *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 56, p.1673–1675, 2006.
- GALVÃO, M.A.M. *A febre maculosa brasileira em Minas Gerais e seus determinantes*. 1988. 163f. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) – Fundação do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- GALVÃO, M.A.M. *Febre maculosa em Minas Gerais: um estudo sobre a distribuição da doença no Estado e seu comportamento em área de foco peri-urbano*. 1996. 106f. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GALVÃO, M.A.M.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B. *et al.* Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, p. 479-481, 2003.
- GIMÉNEZ, D.F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Stain Techn.*, v.39, p.135-140, 1964.
- 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.
- GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A. *et al.* Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever–endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, n.8, p.841-845, 2005.
- HORTA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SANGIONI, L.A. *et al.* 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: serological evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.71, p.93-97, 2004.
- HORTA, M.C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R.A. *et al.* Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector-Borne Zoo. Dis.*, v. 9, p. 109-118, 2009.
- LABRUNA, M.B. *Aspectos da biologia e epidemiologia dos carrapatos de equinos no Estado de São Paulo*. 2000. 76f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo.
- LABRUNA, M.B. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACARALOGIA, 1, 2006, Viçosa, MG. *Anais...* Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2006. p. 63-78.
- LABRUNA, M.B.; AMAKU, M.; METZNER, J.A. *et al.* Larval behavioral diapause regulates the life cycle of *Amblyomma cajennense* in Southeastern Brazil. *J. Med. Entomol.*, v.40, p.170-178, 2003.
- LABRUNA, M.B.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W. *et al.* Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *J. Med. Entomol.*, v. 41, p. 533-537, 2004c.
- LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F. *et al.* 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.; KERBER, C.E.; FERREIRA, F. *et al.* Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brasil. *Vet. Parasitol.*, v.97, n.1, p.1-14, 2001.
- LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C. *et al.* Human parasitism by the capybara tick, *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). *Entomol. News*, v.18, n.1, p. 77-80, 2007.
- LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; TEIXEIRA, R.H.F. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. *Experim. Appl. Acarology*, v.32, p.79-88, 2004b.
- LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C. *et al.* *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.
- 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 Saúde Pública) - Fundação do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- LEMOS, E.R.S.; ALVARENGA, F. B.; CINTRA, M. L. *et al.* Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65, n. 4, p. 329-334, 2001.
- LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; COURA, J.R. *et al.* 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.
- LEMOS, E.R.S.; MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S. *et al.* Primary isolation of spotted fever group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.91, n.3, p.273-275, 1996.
- MACALUSO, K.R.; SONESHINE, D.E.; CERAUL, S.M. *et al.* Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second rickettsia. *J. Med. Entomol.*, v.39, 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).
- MANGOLD, A.J.; BARGUES, M.D.; MASCOMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of Rhipicephalus and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.*, v.84, n.6, p.478-484, 1998.
- 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, Seropédica.
- McDADE, J.E.; NEWHOUSE, V.F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Ann. Rev. Microbiol.*, v.40, p.287-309, 1986.
- MOREIRA, J.A.; MAGALHÃES, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. *Brasil – Medico*, v.44, p.465-470, 1935.
- 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 Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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 Universidade Federal de Minas Gerais, 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.; LEITE, R.C. *et al.* Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. *Med. and Vet. Entomol.*, v.17, n.4, p.412-416, 2003.

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, p. 295-301, 2000.

PACHECO, R.C. *Pesquisa de Rickettsia spp. em carrapatos Amblyomma dubitatum Neumann 1899 e Amblyomma triste Koch 1844, provenientes do Brasil e Uruguai, respectivamente.* 2007. 51f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada à Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da universidade de São Paulo, São Paulo.

PATINO-CAMARGO, L. Nuevas observaciones sobre um tecer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisferio americano. *Bol. Ofic. Sanit. Panamericana*, v.20, p.1112-1124, 1941.

PEREIRA, M.C.; LABRUNA, M.B. Febre Maculosa: aspectos clínico-epidemiológicos. *Rev. Clin. 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.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PLANK, S. J.; TEIXEIRA, R. S.; MILANESI, M. L. Febre Maculosa em Salvador: descrição de um caso. *Rev. Med. Bahia*, v. 25, p. 330-334, 1979.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; ABOUD, P. *et al.* First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 8, n. 7, p. 748-749, 2002.

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

ROBINSON, L.E. *The genus Amblyomma. Ticks, a monograph of the Ixodoidea.* Local: Cambridge University, v.2, parte VI, 1926. 302p.

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.

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

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M.C.; AMORIM, M. *et al.* 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.

SAITO, T.B.; CUNHA-FILHO, N.A.; PACHECO, R.C. *et al.* Canine infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in southern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 79, p. 102-108, 2008.

SANGIONI, L.A.; HORTA, M.C.; VIANNA, M.C.B. *et al.* Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg. Infect. Dis.*, v.11, p.265-270, 2005.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R. *et al.* Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of

- infection in a new endemic region. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993.
- 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.
- 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.
- 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, C.E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M. *et al.* Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet. Parasitol.*, v. 161, p. 116-121, 2009.
- SOUZA, S.S.A.L.; SOUZA, C.E.; NETO, E.J.R. *et al.* Dinâmica Sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. *Ciência Rural*, v.36, n.3, p.887-891, 2006.
- 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.
- 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.
- VALLEJO-FREIRE. A. Spotted fever in Mexico. *Mem. Inst. Butantan*, v.19, p.159-180, 1946.
- YU, X. J.; WALKER, D. H. The Order Rickettsiales. In: DWORKIN, M. (Ed.) *The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community*. 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2003. Disponível em: <http://link.springer.ny.com/link/service/books/10125>. Acesso em: 17/10/08.

## 8 ANEXOS

### ANEXO 1

Sequências obtidas do carrapato *A. cajennense* (amostra 190)

#### Gene citrato sintase (*gltA*)

Sequência (321 nucleotídeos):

5'-

```
ATTGCTTTACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAGTCTACTATCACCTATA  
TAGACGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAA  
AAGTGATTTTTAGAAAGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGT  
ATAATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTAT  
TTCAGACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTCGGTTCTCTT  
GCGGCATTTT - 3'
```

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

- 1 - *Rickettsia rickettsii* amostra Iowa (CP000766): 100% (321/321)
- 2 - *Rickettsia rickettsii* amostra Sheila Smith (CP000848): 100% (321/321)
- 3 - *Rickettsia rickettsii* amostra Bitterroot (U59729): 100% (321/321)

## ANEXO 2

Sequências obtidas do carrapato *A. cajennense* (amostra 190)

### Gene outer membrane protein A (*OmpA*)

Seqüência (471 nucleotídeos):

5'-

```
CGCTTTATTCACCCACCTCAACCGCAGCGATAATGCTGAGTAGTAGCGGGGCACTCGGTGT  
TGCTACAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTTAGTAATAATGTTGGCAATAATAA  
TTGGAATGAGATAACGGCTGCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGCGGTCTCAAAA  
CAATTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACTGTCAGATGCAGCCGATCGTATT  
ATTAAGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGTCTAAATATTACTCAAATACTGT  
CGTTGGTTCGATTATAACGAAAGGTAACCTTGTTCCTGTTACTCTTAATGCCGGCAAAGCT  
TAACTTTAAATGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATGCGCCTGCCGATAAT  
TATACAGGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGGAGCGAAGCT - 3'
```

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

- 1 - *Rickettsia rickettsii* amostra Sheila Smith (CP000848): 100% (471/471)
- 2 - *Rickettsia rickettsii* isolado Panamá 2004 (DQ164838): 100% (471/471)
- 3 - *Rickettsia rickettsii* amostra 1995HO2 (DQ150693): 100% (471/471)

### ANEXO 3

Sequências obtidas do carrapato *A. cajennense* (amostra 190)

#### Gene outer membrane protein B (*OmpB*)

Seqüência (760 nucleotídeos):

5'-

```
AGCTATGGGTGCTGCTATACAGCAGAATAGAACAACAACGGCGCTGCTACAACCTGTTGAT
GGTGCGGGATTTGACCAAACCTGCCGCTCCTGCAAATGTTGGAGTTGCTCTAAATGCAGTTA
TTACTGCTAATGCTAATAATGGTATTAATTTCAATACTCCAGCCGGTAGTTTTAACGGTTTGT
TGTTAAATACTGCAAACAATTTAGCAGTGACAGTGAGTGAAGATACTACCTTAGGGTTCATC
ACTAATGTTGTTTCATAACGCTCACTCCTTTAACCTTACGCTTAAtGCCGGTAAAACCTTACT
ATAACAGGTCAAGGTGTTACTAATGCACAAGCTGCTGCTACAAAAAATGCTCAAAATGTTGT
TGTACAATTTAATAATGGTGCTGCTATTGACAATAATGATCTTAAAGGTGTAGGAAGAATAG
ACTTCGGTGCTCCGGCTTCTACATTAGTATTTAATTTAGCAAATCCTACAACCTCAAAAAGCT
CCTCTTATACTTGGAGATAATGCTGTAATAGCTAATGGTGTTAACGGTACATTAATGTTAC
TAATGGATTTATTCAAGTTTCAAATAAAAAGTTTTGCTACTGTTAAGGCAATTAATATCGCTGA
CGGTCAAGGTATCATATTCAATACTGATGCTAATAATGCTAATACTTTAAATTTACAAGCAG
GTGGTACTACTATTAATTTTACTGGAACAGACGGTACGGGTAGATTAGTATTATTAAGTAAG
CATGCTGCTGCTACC - 3'
```

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

- 1 - *Rickettsia rickettsii* amostra Sheila Smith (CP000848): 100% (760/760)
- 2 - *Rickettsia rickettsii* (X16353): 100% (760/760)
- 3 - *Rickettsia rickettsii* amostra Iowa (CP000766): 99, 7% (759/760)

## ANEXO 4

Sequências obtidas do carrapato *A. cajennense* (amostra 247)

### Gene citrato sintase (*gltA*)

Sequência (321 nucleotídeos):

5'-

```
ATTGCTTTACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAGTCTACTATCACCTATA  
TAGACGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATATGATATTAAGACTTAGCTGAGAA  
AAGTGATTTTTTAGAAGTAGCATATTTACTGATTTATGGGGAACCTACCAAGTGGCGAGCAGT  
ATAATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTAT  
TTCAGACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGC GGCTGTCGGTTCTCTT  
GCGGCATTTT - 3'
```

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

- 1 - *Rickettsia rickettsii* amostra Iowa (CP000766): 100% (321/321)
- 2 - *Rickettsia rickettsii* amostra Sheila Smith (CP000848): 100% (321/321)
- 3 - *Rickettsia rickettsii* amostra Bitterroot (U59729): 100% (321/321)

## ANEXO 5

Sequências obtidas do carrapato *A. cajennense* (amostra 247)

### Gene outer membrane protein A (*OmpA*)

Seqüência (490 nucleotídeos):

5'-

```
GGTCTTAAAGCCGCTTTATTCACCACCTCAACCGCAGCGATAATGCTGAGTAGTAGCGGG
GCACTCGGTGTTGCTACAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTAATAATGT
TGGCAATAATAATTGGAATGAGATAACGGCTGCAGGGGTAGCTAATGGTACTCCTGCTGGC
GGTCCTCAAACAATTGGGCATTTACTTACGGTGGTATTATACTGTCAGTGCAGATGCAG
CCGATCGTATTATTAAGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGTCTAAATATTACT
CAAATACTGTCGTTGGTTTCGATTATAACGAAAGGTAACCTTGTTCCTGTTACTCTTAATGC
CGGCAAAAGCTTAACTTTAAATGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATGCGC
CTGCCGATAATATACAGGTTTAGGAAATATAGCTTTAGGGGGAGCGAATGCTGCACTAA -
3'
```

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

- 1 - *Rickettsia rickettsii* amostra Sheila Smith (CP000848): 100% (490/490)
- 2 - *Rickettsia rickettsii* isolado Panamá 2004 (DQ164838): 100% (490/490)
- 3 - *Rickettsia rickettsii* amostra 1995HO2 (DQ150693): 100% (490/490)



## ANEXO 6

Sequências obtidas do carrapato *A. cajennense* (amostra 247)

### Gene outer membrane protein B (*OmpB*)

Seqüência (760 nucleotídeos):

5'-

```
AGCTATGGGTGCTGCTATACAGCAGAATAGAACAACAAACGGCGCTGCTACAACCTGTTGAT
GGTGCGGGATTTGACCAAACCTGCCGCTCCTGCAAATGTTGGAGTTGCTCTAAATGCAGTTA
TTACTGCTAATGCTAATAATGGTATTAATTTCAATACTCCAGCCGGTAGTTTTAACGGTTTGT
TGTTAAATACTGCAAACAATTTAGCAGTGACAGTGAGTGAAGATACTACCTTAGGGTTCATC
ACTAATGTTGTTTCATAACGCTCACTCCTTTAACCTTACGCTTAAtGCCGGTAAAACCTTACT
ATAACAGGTCAAGGTGTTACTAATGCACAAGCTGCTGCTACAAAAAATGCTCAAAATGTTGT
TGTACAATTTAATAATGGTGCTGCTATTGACAATAATGATCTTAAAGGTGTAGGAAGAATAG
ACTTCGGTGCTCCGGCTTCTACATTAGTATTTAATTTAGCAAATCCTACAACCTCAAAAAGCT
CCTCTTATACTTGGAGATAATGCTGTAATAGCTAATGGTGTTAACGGTACATTAATGTTAC
TAATGGATTTATTCAAGTTTCAAATAAAAAGTTTTGCTACTGTTAAGGCAATTAATATCGCTGA
CGGTCAAGGTATCATATTCAATACTGATGCTAATAATGCTAATACTTTAAATTTACAAGCAG
GTGGTACTACTATTAATTTTACTGGAACAGACGGTACGGGTAGATTAGTATTATTAAGTAAG
CATGCTGCTGCTACC - 3'
```

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

- 1 - *Rickettsia rickettsii* amostra Sheila Smith (CP000848): 100% (760/760)
- 2 - *Rickettsia rickettsii* (X16353): 100% (760/760)
- 3 - *Rickettsia rickettsii* amostra Iowa (CP000766): 99, 7% (759/760)

## ANEXO 7

Sequências obtidas de ninfas de *Amblyomma* sp. (amostras 10-78-70-91)

### Gene citrato sintase (*gltA*)

Seqüência (350 nucleotídeos):

5'-

```
CGATATAAGTAGGGTATCTGCAGAAGCCGATTGCTTTACTTACGACCCGGGCTTTATGTCT
ACTGCTTCTTGTCAGTCTACTATCACCTATATAGACGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCG
AGGATATGATATTAAGATTTAGCTGAGAAAAGTGATTTTTTAGAAGTAGCATATTTACTGAT
TTATGGGGAACTACCAAGTAGCGAGCAGTATAATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATT
CATTAGTGAATGAAAGATTACATTATTTATTTCAAACCTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGG
CTATTATGCTTGCGGCTGTTGGTTCTCTTTCGGCATTTT - 3'
```

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

- 1 - *Rickettsia tamurae* amostra AT-1 (AF394896): 99,7% (349/350)
- 2 - *Rickettsia monacensis* amostra IrR/Munich (DQ100163): 99,1% (347/350)
- 3 - *Rickettsia asiatica* (AB297812): 99,1% (347/350)

## ANEXO 8

Sequências obtidas de ninfas de *Amblyomma* sp. (amostra 10)

### Gene 16 S

Seqüência (391 nucleotídeos):

5'-

TAACTTCTTCGCCAAAAAACATCCTAATCCAACATCGAGGTCGCAAACATTTTTGTCAATA  
TGAACATCTAAAATTATTACGCTGTTATCCCTAGAGTATTTTTACAATTTACCGCTATTAAA  
CGGTTCAATTTTTGCAAAAAAGTTCAAAATATTAATTAATCGCCCAATTAAAGAAATATAT  
ATTTCTTTAAATGAAATATATTTTCAGAAAAATTCATAGGGTCTTCTTGTCTTAATTTTAATTA  
TTGTTTCTTCACAAATAAAAAAATACTTTAATTATTAATTTAAAAAAGCTTTTTTCTGTAATTCC  
ATTCTTTAGCACTCAATTAAAGTCTTATTTCAATACCTTTGTGTAGCCAAAATACCACAGCA  
ATTTAAAAAAC - 3'

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

*Amblyomma cajennense* (FJ424404): 99,7% (358/359)

## ANEXO 9

Sequências obtidas de ninfas de *Amblyomma* sp. (amostra 78)

### Gene 16S

Seqüência (399 nucleotídeos):

5'-

```
TTGCTGTGGTATTTTGACTATACAAAGGTATTGAAATAAGACTTTAATTGAGTGCTAAGAGA  
ATGGAAATACAGAAAAATTCTTTCTTAAATTCAAAAATTAAGTTATTTTTACTTGTGAAGAAA  
CAGTAATATTAATTAAGGACAAGAAGACCCTAAGAATTTTCTGAAAAATCAATTTTTTGATTG  
AAAATTTCTTTAATTGGGGCGATTAATAAAAATTTAAAACTTTATTTAAATAACAAAAAATGA  
ACCAATATTATTGGTCATATGAAAAAATACTCTAGGGATAACAGCGTAATAATTTTTGATAG  
TTCTTATAGACAAAATAGTTTGCGACCTCGATGTTGGATTAGGATACTTTTTTAATGAAGAA  
GTAAAAAAGAAGTTTGTTTC - 3'
```

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

*Amblyomma dubitatum* (DQ858955): 100% (399/399)

## ANEXO 10

Dendograma mostrando a posição filogenética de *Rickettsia tamurae* (cepa AT – 1) entre as espécies de *Rickettsia* válidas publicadas comparando as sequências do gene *OmpB*.