



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)

ALUNO: Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes

ORIENTADOR: Leucio Camara Alves

SUPERVISORES: Nicole Oliveira de Moura Martiniano

Leucio Camara Alves

LOCAL DE REALIZAÇÃO: Laboratório de Referência Nacional em Vetores das
Riquetsioses, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

Laboratório de Doenças Parasitárias, Hospital
Veterinário - UFRPE

Recife, 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

RELATÓRIO DA DISCIPLINA MVE 01N.040.15 – ESO

ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO (ESO)

ÁREA: DOENÇAS PARASITÁRIAS DOS ANIMAIS DOMÉSTICOS

Detecção Molecular de *Rickettsia* sp. e Aspectos Epidemiológicos
da Febre Maculosa em Potenciais Vetores Provenientes de
Municípios do Estado do Ceará

ALUNO: Caio Felipe Cavalcanti de Andrade Gomes

ORIENTADOR: Leucio Camara Alves

SUPERVISORES: Nicole Oliveira de Moura Martiniano

Leucio Camara Alves

LOCAIS DE REALIZAÇÃO: Laboratório de Referência Nacional em Vetores
das Riquetsioses e Laboratório de Doenças Parasitárias.

Recife, 2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

G633d Gomes, Caio Felipe Cavalcanti de Andrade
Detecção molecular de Rickettsia sp. e aspectos
epidemiológicos da febre maculosa em potenciais vetores
provenientes de municípios do Estado do Ceará / Caio Felipe
Cavalcanti de Andrade Gomes. – 2019.
62 f. : il.

Orientador: Leucio Câmara Alves.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) – Universidade
Federal Rural de Pernambuco, Departamento de Medicina
Veterinária, Recife, BR-PE, 2019.
Inclui referências.

1. Doenças parasitárias 2. Parasitologia 3. Zoonoses
4. Carrapato 5. Rickettsia I. Alves, Leucio Câmara, orient. II. Título

CDD 636.089

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA

Detecção Molecular de *Rickettsia* sp. e Aspectos Epidemiológicos
da Febre Maculosa em Potenciais Vetores Provenientes de
Municípios do Estado do Ceará

Relatório elaborado por
CAIO FELIPE CAVALCANTI DE ANDRADE GOMES

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Dr. Leucio Camara Alves
Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE

Dra. Jaqueline Bianque de Oliveira
Departamento de Biologia da UFRPE

Msc. Laís Kelly Amâncio Ribeiro Berenguer
Programa de pós-graduação em Biociência Animal

Ficha de avaliação – Laboratório de Referência Nacional em Vetores nas Riquetsioses, Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ



MINISTERIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
COORDENAÇÃO DO CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATORIO (08525)



FICHA DE AVALIAÇÃO DO SUPERVISOR

I) IDENTIFICAÇÃO DA CONCEDENTE (INSTITUIÇÃO OU EMPRESA DE REALIZAÇÃO DO ESO)
NOME: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ - FIOCRUZ FONE: (51) 2562-1340
ENDEREÇO: AV. BRASIL, 4365 | PAI. LAURO TRAVASSOS, ANEXO PESTERIOR, FAZDAS 1010 - MANGUINHOS
E-MAIL: GSGAZETA@ioc.fiocruz.br SITE: WWW.FIOCRUZ.BR/IOC
RESPONSÁVEL: DR. GILBERTO SALLES GAZETA
CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADOR TITULAR

II) IDENTIFICAÇÃO DO ALUNO
NOME: Caio Felipe Cavalcante de A. Gomes CPF: 107.810.094 - 21
ÁREA DO ESO: Doenças Parasitárias

III) IDENTIFICAÇÃO DO SUPERVISOR
NOME: DRª. NICOLE OLIVEIRA DE MOURA MARTINIANO
FONE: (51) 2562-1071 E-MAIL: NICMOURA@ioc.fiocruz.br
CARGO/FUNÇÃO: RESP. PELO SETOR DE BIOLOGIA MOLECULAR DO SERVIÇO DE REFERÊNCIA DO LPRN
Nº REGISTRO PROFISSIONAL: CRBIO - RJ 84762

IV) AVALIAÇÃO DO SUPERVISOR.
ASSIDUIDADE: A GRAU DE APLICAÇÃO: A
HORAS DE ATIVIDADES: A CONCEITO: A
CONCEITOS: A = Excelente B = Bom C = Regular D = Insuficiente

TÍTULO DO TRABALHO DESENVOLVIDO.
.....
.....
.....

Período Realização do ESO: 18.1.09 / 20.08 A 26.1.10 / 20.08

Ficha de avaliação – Laboratório de Doenças Parasitárias – Hospital Veterinário – UFRPE



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
COORDENAÇÃO DO CURSO DE BACHARELADO EM MEDICINA VETERINÁRIA
ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATORIO (08525)



FICHA DE AVALIAÇÃO DO SUPERVISOR

I) IDENTIFICAÇÃO DA CONCEDENTE (INSTITUIÇÃO OU EMPRESA DE REALIZAÇÃO DO ESO)
NOME: Laboratório de Doenças Parasitárias/UFRPE FONE: (81) 3320-6422
ENDEREÇO: R. Manoel de Medeiros, s/n - 2 in mãos - Recife - PE
E-MAIL: LEUCIO ALVES@GMAIL.COM SITE:
RESPONSÁVEL: Leucio Camara Alves
CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor em Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos

II) IDENTIFICAÇÃO DO ALUNO
NOME: Caio Felipe Cavalcanti de A. Gomes CPF: 107.810.094-21
ÁREA DO ESO: Doenças Parasitárias / Área Preventiva

III) IDENTIFICAÇÃO DO SUPERVISOR
NOME: Leucio Camara Alves
FONE: (81) 9 9644-6060 E-MAIL: LEUCIO.ALVES@GMAIL.COM
CARGO/FUNÇÃO: Professor Doutor em Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos
Nº REGISTRO PROFISSIONAL: CRMV - 1290

IV) AVALIAÇÃO DO SUPERVISOR.
ASSIDUIDADE: A GRAU DE APLICAÇÃO: A
HORAS DE ATIVIDADES: A CONCEITO: A
CONCEITOS: A = Excelente B = Bom C = Regular D = Insuficiente

TÍTULO DO TRABALHO DESENVOLVIDO:
Vincência Para o Estágio Supervisionado Obrigatório no Laboratório de Doenças Parasitárias - UFRPE

Período Realização do ESO: 29 / 10 / 2013. A 04 / 12 / 2013.

Recife, 20 de Dezembro de 2013.

“São as nossas escolhas, mais do que as nossas capacidades, que mostram quem realmente somos.”

Albus Dumbledore.

DEDICATÓRIA

Dedico a conclusão desse curso e a elaboração do relatório a todos os familiares que estiveram sempre comigo, me apoiando em todos os momentos. Importante lembrar que família, no contexto dessa frase, não se refere apenas aos laços sanguíneos, vai além disso, família aqui, deve ser entendido como lugar que eu me sintam bem e querido. Dedico a todos os irmãos (de sangue ou não) que a vida me deu, laços que espero eu, nunca sejam cortados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus/Olorum, aos orixás, meu pai Oxalufan, bem como as demais entidades, espíritos e energias superiores a mim, que me guiaram e me auxiliaram de alguma forma no percurso desses mais de cinco anos. Ter conseguido chegar aqui, me faz crer mais ainda, que um ser superior esteve sempre comigo. O babalorixá Júnior de Ajagunã e a Yalorixá Maria Helena que cuidam do meu sagrado e me guiam no bom caminho espiritual. Muito obrigado, axé!

Agradeço aos meus Pais José Wellington Gomes da Silva e Antônia Fabiana Cavalcanti de Andrade Gomes que me mostraram a garra necessária para chegar onde estou, me servindo sempre como dois exemplos perfeitos de como lutar pelos meus objetivos, além disso, alcança-los. Obrigado pais, sem vocês, não sei onde estaria nesse momento.

A minha irmã Ana Carolina Cavalcanti de Andrade Gomes, uma pessoa que sei que estará comigo em todos os momentos. No último ano, ela tem me mostrado o quanto é uma mulher completa e amorosa, tem me mostrado o que é de fato amor fraternal, amor irmão. Agradeço sempre a você pelas lindas palavras que você sempre me diz quando estou precisando. Fique sempre comigo.

Aos meus avós: Pepê, Manoel, Edite e principalmente a minha avó Carminha (Guerreira), ambos sempre me deram todo o carinho necessário, e me mostraram a importância da família. Entre esses, o agradecimento vai em especial a minha avó Carminha, que hoje, brilha e está comigo na forma não carnal.

Aos demais familiares que sempre buscaram me apoiar em todos os momentos desse curso, em especial aos meus tios Cristina e Amauri que me auxiliaram da forma mais direta me aceitando em sua casa. Às minhas primas Tamires Andrade, Isabela Pimentel e Bárbara Fernanda, e meus tios Zielma e Marcos, Cristiane e André que também estiveram sempre comigo. Aos demais familiares, obrigado também por todo o apoio.

Samantha Rodrigues de Farias, ou simplesmente Sam, foi, e é, um dos melhores presentes que a Universidade me deu. É difícil de explicar a sintonia que temos, e o quanto suas palavras de apoio sempre me ajudaram. Quando pensei que estava demais, e não conseguiria dar conta, quando acreditava que duas graduações seriam impossíveis, ela me ajudava da melhor forma possível. Obrigado minha Sam.

Paula Fernanda Costa de Souza, ou Fernanda como ela prefere que os íntimos a chamem, me mostrou a garra que tem o sertanejo, a garra do povo indígena, mas além disso, me mostrou o quanto uma mulher pode ser bruta e amorosa ao mesmo tempo. Dentro dessa mulher tem uma quantidade enorme de amor, honestidade, carinho e principalmente companheirismo. Obrigado por estar sempre comigo, Fê.

Esdras Lima de Carvalho Gueiros, é uma das melhores pessoas que Deus colocou no meu caminho, alguém que tem me acompanhado nesse último ano e me mostrado sobre o amor mais puro existente. Obrigado por ter me feito reencontrar esse sentimento. Pedro e Dona Rosângela, vocês também têm se tornado essenciais na minha vida, amo vocês, obrigado.

Wedna Galindo, um dos maiores exemplos de mulher que conheci, esteve comigo em tantos momentos da minha história, não poderia ser diferente na conclusão desse curso. Você é um exemplo de mulher, como pessoa, como professora, como política, como cidadã. Você é um exemplo. Obrigado por ser meu exemplo.

A minha turma da Medicina Veterinária que sempre me animou, e me fez rir todos os dias bons e maus da graduação, vocês estarão pra sempre comigo, falo aqui especialmente para: Sam, Fernanda, Amanda Pina, Ana Paula, Ayna Arramis, Júlio César, Michel Guilherme, Taylane Alves, Williane Barbosa e ainda mais especial a Felipe Torres, que apesar de não estar mais entre nós fisicamente, sua energia me dá forças diariamente. Obrigado minha SV3. As gerosas geram na gerência das gerosas.

“Ohana quer dizer família, e família quer dizer nunca esquecer ou abandonar” e assim me sinto com vocês. Irmãos de semelhança, irmãos de amor, lury (meu) Sonho e Angelo Vilar, dois amigos que estiveram comigo sempre, eu amo vocês de uma forma que não sei descrever. Obrigado por tudo, Sonho e Angel.

Joyce sueely, Larissa Brito, Leandro de Lira, Michael Soares, Monalisa Sales e Nadson Lins, vocês me ensinaram uma das melhores coisas da vida: Seja quem você é. Nunca vou esquecer de todo o apoio que sempre me deram, e de tudo que sempre me ensinaram. Estejam sempre comigo, eu imploro.

Meus amigos do Ensino Médio que marcaram, e após tantos anos continuam em meu coração, espero que assim permaneçam, vocês foram de verdade muito importante nessa etapa da minha vida: Hélder Filipe, Lyllyan Belo, Taires Mayara.

Jerlane Tarcilia e Jeanne Tavares foram duas mulheres incríveis que conheci, e que me ajudaram com seus companheirismos nessa fase final do curso, pessoas que tenho em meu coração, e que espero que saibam que podem contar comigo igualmente quando precisarem. Agradeço muito a vocês.

Aos laboratórios que trabalhei e trabalho: LAPAR E LDP, onde pude conhecer pessoas maravilhosas e que sempre buscaram entender da melhor forma possível a jornada da dupla graduação. Agradeço a todos, em especial a Laís Kelly e Winny Gomes, além dos coordenadores desses locais: Jaqueline Bianque de Oliveira (Uma mãe) e Leucio Camara Alves (Um pai), que da melhor forma possível, me orientaram e orientam na vida acadêmica. Agradeço ainda as pessoas que me auxiliaram a dar os primeiros passos na universidade: Amanda Castro, Bárbara Nogueira e Taci Cassia. O pessoal do LIRN – FIOCRUZ que me ajudou principalmente nessa reta final da graduação, em especial a Nicole Moura, Tayra Sato e o Professor Gilberto Salles Gazêta, sem vocês, esse ESO não teria sido possível.

Agradeço ainda aos meus professores da graduação, a todos e todas que de alguma forma contribuíram positivamente para esse momento, que dedicaram dias e mais dias planejando aulas para me fazerem aprender. Em especial aos que me inspiram, espero algum dia despertar aos meus alunos, metade da curiosidade e vontade de aprender que vocês despertavam em mim durante as aulas: Maria Taciana, José Vitor, Jaqueline Bianque, Ellen Cordeiro, Miriam Teixeira, Maria Cristina, Cláudio Coutinho, Leucio Camara, Wilton Júnior, Edna Michelly, Jean Carlos, Andrea Alice, Elizabeth Sampaio e Carolina Akiko e Pierre Castro.

Ao sistema de cotas incluído no País por um governo popular (Lula e Dilma) que me possibilitou entrar na Universidade. Governo popular esse que foi brutalmente arrancado do poder por Michel FORA TEMER e seus aliados. Agradeço ainda, aos demais movimentos sociais: LGBTTTQI+, feminista, negro, MST e quaisquer outros movimentos que de alguma forma me tornaram melhor do que eu era antes de conhece-las melhor. Bolsonaro não me representa!

Agradeço por último também a mim, por não ter desistido e mostrado a garra necessária para chegar nesse momento. É por não ter desistido, que eu posso chegar aqui, e de certa forma, dar um orgulho a todos aqueles que foram citados nesses agradecimentos. Por uma última vez, nesse texto, obrigado a todos e todas.

LISTA DE TABELAS

Página

Tabela 1 – Exames realizados durante o período vigente do estágio, e a respectiva quantidade de amostras por exames, e porcentagem de amostras positivas.....	25
Tabela 2 – Exames realizados durante o período vigente do estágio, separado por espécie, e a respectiva quantidade de amostras por exames, e porcentagem de amostras positivas.....	26
Tabela 3 – Exames realizados durante o período vigente do estágio no ambulatório de leishmaniose canina, e a respectiva quantidade e porcentagem de amostras positivas.....	28
Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para identificação genotípica de espécies de riquetsias.....	48
Tabela 5 - Espécies de vetores de riquetsias coletados, em hospedeiro e município investigados para Febre Maculosa Brasileira, no estado do Ceará, no período de julho de 2014 a julho de 2017.....	49
Tabela 6 – Espécies e estágios de vida das amostras positivas de carrapatos para riquetsioses.....	50
Tabela 7 – Frequência mínima de vetores infectados com riquetsias (%) para cada espécie de artrópode e por municípios do Estado do Ceará no período do estado.....	52

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estagiário realizando maceração de artrópodes potenciais vetores de riquetsioses, após congelamento do espécime em nitrogênio líquido, para extração de DNA genômico.....	21
Figura 2. Artrópode em processo de maceração com uso de nitrogênio líquido para extração de DNA genômico	21
Figura 3. Estagiário realizando técnica de extração de DNA genômico dos artrópodes potenciais vetores de riquetsioses.....	21
Figuras 4 e 5 – Pipetagem das amostras dos artrópodes em gel de agarose para obter os resultados da PCR.....	22
Figura 6 – Estágios de desenvolvimento (larva, ninfa, macho e fêmea) do <i>Amblyomma cajennense</i> . Fonte: Tickencounter. 2016.....	35
Figura 7 – Espécimes de <i>Amblyomma ovale</i> – a) Macho dorsal; b) Macho ventral; c) Fêmea dorsal; d) Fêmea ventral. Fonte: Caroline Gracielle Torres Ferreira et al. 2013.....	36
Figura 8 – Espécime de <i>Amblyomma parvum</i> , no estágio de desenvolvimento adulto, fêmea. Ahid. 2008.....	38
Figura 9 – Espécies do estágio de desenvolvimento adulto (Fêmea a esquerda e macho a direita) de <i>Ctenocephalides felis</i> . Fonte: Alamy Stock Photo. 2006	39
Figura 10 – Estágios de desenvolvimento (Larva, Ninfa, Macho e fêmea) do <i>A. cajennense</i> . Fonte: Tickencounter. 2017.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus celsius
μM	Micromolar
DNA	Desoxyribonucleic Acid - Ácido Desoxirribonucléico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GFM	Grupo Febre Maculosa
h	Hora
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
LACEN/CE	Laboratório Central de Saúde Pública/Ceará
LIRN	Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mM	Milimolar
N ₂	Nitrogênio
POP	Procedimento Operacional Padrão
qsp	Quantidade suficiente para
s	Segundos
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate - Dodecil Sulfato de Sódio
TRIS	Tris (hidroxi) metil amino metano
TE	Tris-EDTA

SUMÁRIO

	Páginas
CAPÍTULO I: VIVÊNCIAS NO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO.....	16
1. LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM VETORES DAS RIQUETSIOSES (LIRN) – INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC) – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ).....	18
1.1 Características do local.....	18
1.2 Atividades realizadas.....	18
2. LABORATÓRIO DE DOENÇAS PARASITÁRIAS – UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO.....	24
2.1 Características do local.....	24
2.2 Atividades desenvolvidas.....	24
2.2.1 Procedimentos laboratoriais.....	24
2.2.2 Ambulatório de Leishmaniose canina.....	27
CAPÍTULO II: Detecção Molecular de <i>Rickettsia</i> sp. e Aspectos Epidemiológicos da Febre Maculosa em Potenciais Vetores Provenientes de Municípios do Estado do Ceará.....	29
1. INTRODUÇÃO.....	31
2. OBJETIVOS.....	33
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	34
3.1 <i>Amblyomma cajennense</i>	34
3.2 <i>Amblyomma nodosum</i>	35
3.3 <i>Amblyomma ovale</i>	36
3.4 <i>Amblyomma parvum</i>	37
3.5 <i>Argas miniatus</i>	38
3.6 <i>Ctenocephalides felis</i>	38
3.7 <i>Ixodes loricatus</i>	40
3.8 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	40
3.9 <i>Rickettsia</i> sp.	41
3.10 <i>Candidatus Rickettsia andeanae</i>	43
3.11 <i>Rickettsia belli</i>	44
3.12 <i>Rickettsia felis</i>	45
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
6. CONCLUSÃO.....	53
7. REFERÊNCIAS	54

CAPÍTULO I: VIVÊNCIAS NO ESTÁGIO SUPERVISIONADO OBRIGATÓRIO

RESUMO

O presente relatório descreve as atividades desenvolvidas para o cumprimento do Estágio Supervisionado Obrigatório (ESO), realizadas em dois laboratórios de pesquisa. A primeira fase do ESO foi desenvolvida no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN), que faz parte do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), no município do Rio de Janeiro – RJ, no período de 14 de setembro a 26 de outubro de 2018, com carga horária de 224 horas. Já a segunda fase do ESO foi desenvolvida no Laboratório de Doenças Parasitárias, da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), no município de Recife – PE, de 26 de outubro a 04 de dezembro de 2018, com carga horária total de 200 horas. As atividades realizadas foram coordenadas pelo orientador Prof. Dr. Leucio Camara Alves (UFRPE) e supervisionadas pela Dra. Nicole Oliveira de Moura Martiniano (FIOCRUZ).

Palavras-chave: doenças parasitárias, parasitologia, riquetsiose, zoonose, diagnóstico molecular.

ABSTRACT

The present report describes the activities developed during the Mandatory Supervised Internship (MSI), carried out in two research laboratories. The first phase of the MSI was developed at the Laboratory of National Reference on Vectors of Rickettsiosis (LIRN), which is part of the Oswaldo Cruz Institute (IOC), of the Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), in the municipality of Rio de Janeiro - RJ, from September 14 to October 26, 2018, with a total workload of 224 hours. The second phase of MSI was developed at the Laboratory of Parasite Diseases, in Federal Rural University of Pernambuco (UFRPE), in the city of Recife - PE, from October 26 to December 4, 2018, with a total workload of 200 hours. The developed activities were coordinated by Dr. Leucio Camara Alves (UFRPE) and supervised by Dr. Nicole Oliveira de Moura Martiniano (FIOCRUZ).

Key-words: parasitic diseases, parasitology, rickettsiosis, zoonosis, molecular diagnosis.

1. LABORATÓRIO DE REFERÊNCIA NACIONAL EM VETORES DAS RIQUETSIOSES (LIRN) – INSTITUTO OSWALDO CRUZ (IOC) – FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ (FIOCRUZ)

1.1 Características gerais do estágio

A primeira fase do Estágio supervisionado obrigatório foi realizado no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN), que faz parte do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), um dos institutos da FIOCRUZ. O LIRN fica localizado no Pavilhão Lauro Travassos, anexo posterior, salas 1 – 10, no campus principal da FIOCRUZ-RJ, localizado na Avenida Brasil, 4365, no bairro de Manguinhos, zona Norte do município do Rio de Janeiro – RJ. O período do estágio foi do dia 14 de setembro de 2018 à 26 de outubro de 2018.

O estágio era realizado no turno da manhã e da tarde, compondo carga horária diária de 8 horas, sendo no turno da manhã de 08:00h às 12:00h e no turno da tarde das 13:00h às 17:00h, sob orientação do Professor Doutor Leucio Camara Alves, professor da disciplina de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), e supervisionado pela Doutora Nicole Oliveira de Moura Martiniano, Bióloga Responsável pelo Setor de Biologia Molecular do Serviço de Referência do LIRN (FIOCRUZ).

1.2 Atividades realizadas

O LIRN (IOC, FIOCRUZ) atua como Referência Nacional do Ministério da Saúde para investigação de foco e vigilância de ambiente, na Rede Nacional de Vigilância de Ambiente de Doenças Transmitidas por Carrapatos, bem como desenvolve atividades de pesquisa, com estudos relacionados à biologia, fisiologia, sistemática, patogenia de vetores ápteros, como carrapatos, pulgas, piolhos e ácaros, além de estudos epidemiológicos sobre as doenças por eles transmitidas.

Dessa forma, a rotina do Serviço de Referência (SR) do LIRN inclui o recebimento de amostras biológicas (tecido, sangue e ectoparasitos)

provenientes de diversos estados brasileiros, enviadas pelos Laboratórios Centrais de Saúde Pública (LACEN) de cada estado, e também análises morfológica, imunológica e molecular das amostras e emissão de laudo das análises laboratoriais. Assim, as atividades do SR e de pesquisa do LIRN objetivam de forma geral identificação de potenciais vetores, busca de anticorpos em sangue de hospedeiros vertebrados e detecção molecular de patógenos transmitidos pelos vetores ápteros.

O estagiário realizou atividades de pesquisa em diferentes setores do laboratório:

1.2.1 Recepção e Registro das amostras

Os LACENs e outros órgãos do país podem solicitar laudo de identificação e detecção de patógenos transmitidos por carrapatos em amostras coletadas, e enviar ao LIRN com o devido protocolo de encaminhamento de amostras. Estas amostras devem estar conservadas em isopropanol PA (ectoparasitos), em etanol 70% (tecido), em tubos com anticoagulantes (sangue total) ou em tubos sem anticoagulantes (coágulo e soro), e devem ser recebidas e conferidas por qualquer funcionário do LIRN. As amostras são repassadas para a Bióloga Nicole Moura-Martiniano, que registra as amostras em uma planilha do Excel (Pacote Office, Microsoft®), a fim de haver controle e rastreabilidade das amostras recebidas e informação sobre qual etapa de análise estão. Este banco de dados das amostras do LIRN é denominado Registro Geral de Amostras (RG). No período do estágio foram registradas 159 amostras.

1.2.2 Identificação taxonômica dos artrópodes

Os ectoparasitos foram identificados seguindo o Procedimento Operacional Padrão para Identificação Taxonômica de Vetores das Riquetsias (POP-LIRN-017) elaborado e implementado pelo LIRN, utilizando chaves dicotômicas apropriadas (Amorim et al. 1999, Linardi e Guimarães 2000,

Barros-Battesti et al. 2006, Martins et al. 2010). No período do estágio foram identificados taxonomicamente 857 artrópodes.

1.2.3 Pesquisa do bioagente

Após a identificação morfológica, os ixodídeos e sifonápteros foram analisados molecularmente de forma individual ou reunidos em grupos (de dois a 10 indivíduos) de acordo com sexo, estágio de desenvolvimento (adulto, larva e ninfa), processo de ingurgitamento e hospedeiro, constituindo as alíquotas das amostras dos vetores. De forma geral pelo menos 50% dos espécimes enviados ao LIRN, provenientes de Investigação de Foco de Febre Maculosa foram encaminhados as análises moleculares. Os ectoparasitos foram submetidos à extração de DNA genômico (DNAg), quantificação de ácidos nucleicos e PCR visando a detecção de riquetsias. Após essa etapa, o RG é preenchido novamente informando como os vetores foram reunidos (composição das alíquotas das amostras submetidas a análise molecular), para depois ser possível identificar quais foram as amostras positivas. No período do estágio foi realizada a análise molecular de 204 amostras.

1.2.3.1 Extração de DNAg

O DNAg de carrapatos e pulgas foi obtido pela técnica de extração por NaCl (ALJANABI; MARTINEZ, 1997) e armazenado a -20°C . Os artrópodes foram triturados em banho de N_2 , e ressuspensos em um volume máximo de 400 μl de solução 1 (NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM pH 8,0). Em seguida foi adicionado SDS 2% e 0,4 mg/ml Proteinase K (Promega, Madison, EUA) e o material incubado em banho-maria à 56 – 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 à 2 h. Após esta incubação, à mistura foi acrescentada de 2,57 mM de NaCl, homogeneizada e centrifugada 10.000 g por 30 min; o sobrenadante foi precipitado em igual volume de isopropanol. O DNAg foi ressuspensado em 30 μl de água livre de DNase e RNase e encaminhados para quantificação.

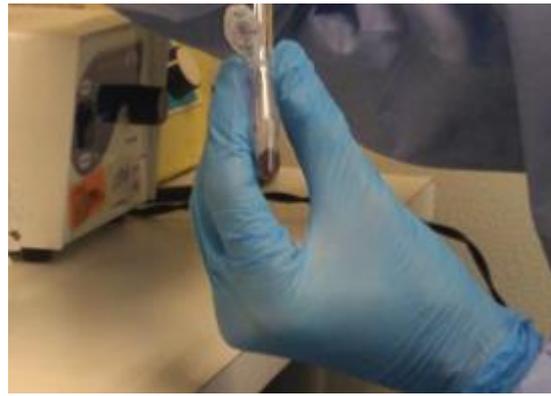


Figura 1 – À esquerda, o estagiário realizando maceração de artrópodes potenciais vetores de riquetsioses, após congelamento do espécime em nitrogênio líquido, para extração de DNA genômico. Figura 2 – À direita, artrópode em processo de maceração com uso de nitrogênio líquido para extração de DNA genômico. Arquivo pessoal. 2018.



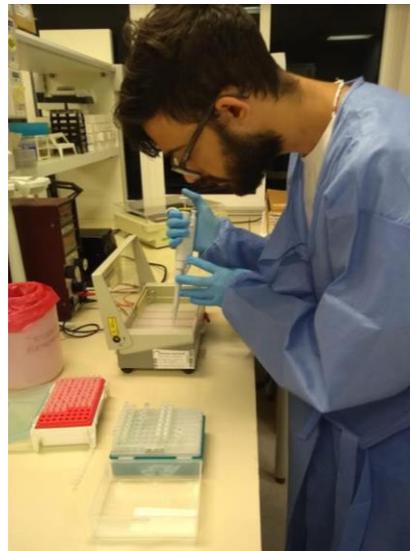
Figura 3 – Estagiário realizando técnica de extração de DNA genômico dos artrópodes potenciais vetores de riquetsioses. Arquivo pessoal. 2018.

1.2.3.2 Quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotômetro

Após a extração de DNAg, pelo menos 10% das amostras eram selecionadas de forma aleatória e encaminhadas à Plataforma de Quantificação da FIOCRUZ, para quantificação dos ácidos nucleicos em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) através da aplicação direta de 1µL de amostra para a leitura, validando a extração de DNAg e confirmando a qualidade da amostra para a amplificação.

1.2.3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Todas as amostras foram processadas utilizando oligonucleotídeos gênero-específicos CS2 (gene *gltA*) para detecção de *Rickettsia* spp. e oligonucleotídeos grupo-específicos, para detecção de riquetsias GFM (gene *ompA*). O preparo das soluções e as condições das corridas de PCR foram adequados para cada tipo de gene pesquisado (LABRUNA et al., 2004b; REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991). Nas reações de PCR foram utilizados 10 pmoles de cada oligonucleotídeo; 200 µM de cada dNTP; 1X de tampão 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM); 1,5 mM MgCl₂; 1,25 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura livre de DNase e RNase (qsp 25 µl). Como controle positivo, foi utilizado DNAg de *R. rickettsii* e como controle negativo a água utilizada na reação da PCR. Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, coradas por brometo de etídeo e observadas em luz de ultravioleta (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).



Figuras 4 e 5 – Pipetação das amostras dos artrópodes em gel de agarose para obter os resultados da PCR. Arquivo pessoal. 2018.

1.2.4 Emissão de laudos

No caso das amostras de rotina, enviados pelos órgãos de saúde, após os resultados serem processados e analisados, é emitido um laudo pelo LIRN. Há um modelo a ser preenchido, onde é informada a quantidade de espécimes dos vetores encontrados, quais eram, quantas amostras foram positivas para *Rickettsia spp.*. O professor Gilberto Salles Gazeta escreve um parecer explicando o significado dos resultados encontrados para dar um norte ao órgão solicitante. Esse laudo é enviado aos órgãos que solicitaram o diagnóstico laboratorial para apoiar ações básicas de saúde dos municípios e a prevenção de casos de riquetsioses, para que possam investir em ações preventivas a partir dos resultados encontrados.

2. LABORATÓRIO DE DOENÇAS PARASITÁRIAS – UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

2.1 Características gerais do estágio

O segundo momento do Estágio Supervisionado Obrigatório foi realizado no Laboratório de Doenças parasitárias (LDP), que faz parte do Hospital Veterinário (HOVET) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), que fica localizado na Rua Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos, Recife – PE. O período vigente do estágio foi do dia 29 de outubro de 2018 à 04 de dezembro de 2018.

O estágio era realizado no turno da manhã de 08:00h às 12:00h e no turno da tarde das 13:00h às 17:00h, sob orientação e supervisão do Professor Doutor Leucio Camara Alves, professor da disciplina de Doenças Parasitárias dos Animais Domésticos no curso de Medicina Veterinária da UFRPE.

2.2 Atividades desenvolvidas

2.2.1 Procedimentos laboratoriais

Durante o ESO, os clínicos do hospital veterinário da UFRPE encaminharam solicitações de exames de animais com suspeita de doenças de origem parasitária para o laboratório. Nas solicitações encaminhadas continham os seguintes dados dos animais atendidos: nome, idade, espécie, sexo endereço e exame laboratorial solicitado. O levantamento das espécies evidenciou que os cães foram os mais prevalentes (84,04%), seguidos, dos caprinos (7,44%), e por último os felinos e ovinos (4,26% cada). O cão foi a espécie com maior frequência na solicitação de exames, isso porque essa espécie é a que mais há solicitação de serviço pela população.

A maior parte dos exames solicitados para a espécie canina era machos, sendo estes 52 (69,33%) e 23 fêmeas (30,66%). Dentre os felinos, foram solicitados exames de 2 machos (50%) e 2 fêmeas (50%). Entre os ruminantes, foram solicitados exames prevalentemente de machos; no grupo de caprinos,

foram 4 machos (57,14%) e 3 fêmeas (42,96%), e para os ovinos foram analisadas amostras de 3 machos (75%) e 1 fêmea (25%).

Quanto aos exames, foram solicitadas 39 pesquisas de hematozoários (41,49%), 26 knott (27,66%), 20 flotac (22,22%), 10 identificação de endoparasito e ectoparasitos (11,11%) e 2 parasitológicos de pele (2,13%).

Na Tabela 1 é possível visualizar os exames realizados, e quais os resultados dessas amostras, e na tabela 2, os exames e seus respectivos resultados estão separados por espécie.

Tabela 1 – Exames realizados durante o período vigente do estágio, e a respectiva quantidade de amostras por exames, e porcentagem de amostras positivas.

Exame Realizado	Número de amostras	Amostras positivas
Pesquisa de hematozoários	36	19,44% <i>Anaplasma sp.</i>
		5,5% <i>Hepatozoon sp.</i>
		2,77 % <i>Ehrlichia sp.</i>
		2,77% <i>Mycoplasma sp.</i>
Knott	26	11,53% com microfilárias
Flotac	20	25% <i>Ancylostoma sp.</i>
		20% Oocistos de coccidios
		10% Ovo tipo <i>Strongylida sp.</i>
		10% <i>Toxocara cati</i>
		10% <i>Trichuris sp</i>
Identificação de endoparasitos e		

ectoparasitos	10	10% <i>Chorioptes sp.</i>
Parasitológico de pele	2	-

A frequência de solicitação de exames para pesquisa de hematozoários foi a maior, provavelmente pelo grande número de casos de infecções por hemoparasitos nos cães, fazendo com que haja uma maior frequência de solicitações ao laboratório de doenças parasitárias.

Tabela 2 – Exames realizados durante o período vigente do estágio, separado por espécie, e a respectiva quantidade de amostras por exames, e porcentagem de amostras positivas,

Espécie	Exames realizados	Número de amostras	Amostras positivas
Canina	Knott	26	11,53% com <i>microfilárias</i> 19,44% <i>Anaplasma sp.</i>
	Pesquisa de hematozoário	36	5,5% <i>Hepatozoon canis</i> 2,77 % <i>Ehrlichia canis</i> 2,77% <i>Mycoplasma sp.</i>
	Parasitológico de pele	1	-
	Flotac	11	45,45% <i>Ancylostoma sp.</i> 18,18% <i>Strongyloides stercoralis</i>
	Identificação de endoparasito e ectoparasito	4	-
Felina	Flotac	4	25% <i>Toxocara cati</i>

Caprina	Identificação de endoparasito e ectoparasito	4	-
	Flotac	5	80% <i>oocisto de coccídios</i>
			60% <i>Strongyloides papillosus</i>
			40% <i>Ovo tipo Strongylida sp.</i>
			20% <i>Trichuris sp</i>
Ovina	Parasitológico de pele	1	-
	Identificação de endoparasito e ectoparasito	2	<i>Chorioptes sp.</i>

2.2.2 Ambulatório de Leishmaniose canina

O Laboratório de Doenças Parasitárias atende às segundas e quintas pela manhã, casos de animais suspeitos e confirmados de Leishmaniose canina. Nas consultas realizadas foram coletados dados de inquérito epidemiológico e realizadas coletas para diagnóstico parasitológico.

Durante o estágio foram coletadas amostras de 63 animais, o levantamento do sexo dos animais evidenciou que os pacientes machos foram os mais prevalentes (60,32%; 38 animais), seguido das fêmeas com (39,88%; 25 animais).

O método diagnóstico mais utilizado foi o DPP® Leishmaniose Canina – Bio-Manguinhos realizado em todos os animais (63 animais), por se tratar de um exame de triagem no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRPE. Em seguida, os exames mais realizados foram, respectivamente: citologia

aspirativa do linfonodo (33,33%; 21 animais), biópsia da medula óssea (30,16%; 19 animais), parasitológico de pele (28,57%; 18 animais) e *swab* conjuntival (14,29%; 9 animais). Na tabela 3, a seguir, é possível visualizar os exames realizados e quantas amostras positivas foram detectadas.

Tabela 3 – Exames realizados durante o período vigente do estágio no ambulatório de leishmaniose canina, e a respectiva quantidade e porcentagem de amostras positivas.

Exames realizados	Amostras positivas (n)	Amostras positivas
DPP	10/63	6,3%
Citologia aspirativa do linfonodo	1/63	1,59%
Biópsia da medula óssea	4/63	6,35%
Parasitológico de pele	1/63	1,59%
Swab conjuntival	-	-

Os animais positivos através do diagnóstico parasitológico direto retornam para novas consultas, são acompanhados e tratados de forma experimental com uso de Dompedirona (1 vez por dia, durante 1 mês) e Alopurinol (2 vezes por dia, por toda a vida), além do tratamento suporte sempre que se notar necessário, como por exemplo, uso de corticoide em animais com sinais clínicos relacionados com a formação de imunocomplexo, ou xampus antibacterianos em casos de infecção secundária na pele. É solicitado também de forma regular, os exames de hemograma e bioquímicos renal e hepático dos animais, para acompanhar a evolução renal e hepática dos pacientes, bem como a resposta medular frente à infecção. Os tutores são orientados devidamente sobre a necessidade do acompanhamento constante, bem como da necessidade do uso da coleira por parte dos animais, para evitar que novos flebótomos (*Lutzomyia longipalpis*) se infectem, e disseminem a enfermidade para outros cães, ou até humanos, por se tratar de uma zoonose.

CAPÍTULO II: Detecção Molecular de *Rickettsia* sp. e Aspectos Epidemiológicos da Febre Maculosa em Potenciais Vetores Provenientes de Municípios do Estado do Ceará

RESUMO

A Febre Maculosa causada por riquetsias do Grupo Febre Maculosa, é uma zoonose transmitidas por carrapatos, com grande importância em Saúde Pública, por apresentar altas taxas de letalidade e ocorrer em todas as regiões do Brasil. Um projeto de pesquisa está em desenvolvimento pelo LIRN (FIOCRUZ) buscando a caracterização das riquetsias presentes em vetores e hospedeiros em diferentes municípios do Estado do Ceará por abrigarem registros recentes de casos de Febre Maculosa, objetivando maior entendimento sobre os bioagentes, vetores e hospedeiros envolvidos no ciclo da doença nessas áreas, o presente estudo está incluído neste projeto. O objetivo deste estudo foi detectar a presença de *Rickettsia* spp. presentes em potenciais vetores em municípios do Estado do Ceará. A pesquisa foi realizada em regiões com casos humanos e animais, suspeitos, compatíveis ou confirmados no estado do Ceará, no período de julho de 2014 a julho de 2017, nos municípios de Fortaleza, Meruoca e Iguatú. As coletas de campo foram realizadas durante vigilância de ambiente para riquetsioses e os ectoparasitos foram coletados em cães, gatos, galinhas, e presentes na localidade de provável infecção humana, bem como em ambiente (galinheiro e matas). Os ectoparasitos foram identificados utilizando chaves dicotômicas apropriadas e encaminhados à pesquisa de genes riquetsiais (*gltA* e *ompA*) através de reação em cadeia pela polimerase. As amostras positivas foram obtidas em *Amblyomma parvum* coletadas em áreas de mata do município Fortaleza, e *Ctenocephalides felis* coletado em cão, no município Meruoca. Os resultados obtidos no presente estudo ampliam o conhecimento sobre a distribuição geográfica de riquetsias na região nordeste do Brasil e contribui para que medidas de controle específicas sejam delineadas.

Palavras-chave: *A. parvum*, *C. felis*, parasitologia, riquetsiose, zoonose.

ABSTRACT

Spotted Fever caused by Spotted Fever Group Rickettsiae is a zoonosis transmitted by ticks, which is of great importance in Public Health because it has high lethality rates and occurs in all regions of Brazil. A research project is under development by the LIRN (FIOCRUZ), aiming the characterization of the Rickettsiae, vectors and hosts present in different municipalities of Ceará State, which harbor recent records of Spotted Fever cases, searching a better understanding of the bioagents, vectors and hosts involved in disease cycle in these areas, the present study is included in this project. The objective of this study was to detect the presence of *Rickettsia* spp. in potential vectors from municipalities of the Ceará State. The research was carried out in regions with suspected, compatible or confirmed human and animal cases in Ceará, from July 2014 to July 2017, in the municipalities of Fortaleza, Meruoca and Iguatú. Field samples were collected during environment surveillance for rickettsial diseases and ectoparasites were collected from dogs, cats, chickens, and present in the locality of probable human infection, as well as in the environment (chicken coop and forest). The ectoparasites were identified using appropriate dichotomous keys and directed to the research of rickettsial genes (*gltA* and *ompA*) through polymerase chain reaction. Positive samples were obtained in *Amblyomma parvum* collected in areas of forest of Fortaleza municipality, and *Ctenocephalides felis* collected from dog, in Meruoca municipality. The results obtained in the present study increased the knowledge about the geographical distribution of Rickettsiae in the northeastern region of Brazil and contributes to the specific control measures being delineated.

Key-words: parasitic diseases, parasitology, rickettsiosis, zoonosis, ticks.

1. INTRODUÇÃO

Organismos do gênero *Rickettsia* são Alphaproteobactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórias, pleomórficas e podem se localizar no citoplasma e/ou núcleo da célula hospedeira. Este grupo inclui espécies causadoras de zoonoses conhecidas como riquetsioses que são transmitidas aos animais e seres humanos através da picada de artrópodes hematófagos com potencial vetor, como pulga, carrapato e piolho (HOOGSTRAAL, 1967; FRIEDHOFF, 1990).

As enfermidades causadas pelas riquetsias são diversos, os principais sinais clínicos ocasionados pelas bactérias do GFM são bastante inespecífico como: cefaleia, febre aguda, mal-estar, sendo, portanto, comuns a diversas enfermidades como gripe, dengue, leptospirose, salmonelose, encefalite, hepatite viral, malária, entre outros, o que muitas vezes pode dificultar o diagnóstico clínico em humanos, se fazendo necessário o diagnóstico laboratorial diferencial (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

No Brasil, há o histórico de doenças riquetsiais desde a década de 20, sendo a Febre Maculosa Brasileira (FMB), causada pela *R. rickettsii*, a forma mais grave registrada, com casos confirmados em todas as regiões do país, sendo a maior parte dos casos registrados para a região sudeste (GALVÃO, 1996). Porém, em 2010, o Estado do Ceará registrou seu primeiro caso confirmado de FMB, no município de Aratuba. Nos anos seguintes, de 2011 a 2014 houve a confirmação de mais oito casos nos municípios de Aratuba, Baturité, Fortaleza, Guaramiranga e Pacoti (SINAN/SVS/MS, 2015). Além disso, um estudo recente detectou e caracterizou diferentes espécies de *Rickettsia* (incluindo espécies reconhecidamente patogênicas) em várias espécies de carrapatos vetores, em municípios da região do maciço do Baturité, no Estado do Ceará (MOERBECK et al. 2015), demonstrando importância ao estudo de outras áreas do estado.

Com o crescente número de casos humanos de Riquetsioses registrados no Brasil nos últimos anos, estudos de vigilância epidemiológica de ambiente têm sido realizados em diversas áreas do país com o intuito de

identificar as espécies de riquetsias circulantes em áreas endêmicas, bem como os vetores e hospedeiros envolvidos no ciclo. Nesse contexto, um projeto de pesquisa realizado pelo LIRN está em desenvolvimento buscando a caracterização das riquetsias presentes em vetores e hospedeiros em diferentes municípios do Estado do Ceará, para melhor entendimento sobre a circulação do agente e, conseqüentemente, para posteriormente medidas de controle específicas serem delineadas. As amostras analisadas no presente estudo fazem parte deste projeto.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar riquetsias em ectoparasitas coletados durante vigilância epidemiológica de ambiente em áreas de casos humanos de Febre Maculosa, suspeitos, compatíveis ou confirmados.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar detecção molecular de riquetsias em potenciais vetores coletados em animais domésticos, bem como livres no ambiente;
- Realizar a análise sobre frequência mínima de ectoparasitas infectados.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Amblyomma cajennense*

A. cajennense é conhecido como “carrapato-estrela”, é um artrópode, ixodídeo, com ampla distribuição principalmente no sul dos Estados Unidos até a região do Norte da Argentina (GUGLIELMONE et al. 2003). Seus hospedeiros são preferencialmente de equinos e capivaras, entretanto, é um parasito inespecífico, principalmente em estágio imaturo, pode parasitar mamíferos domésticos e selvagens, bem como aves e seres humanos (GUIMARÃES et al. 2001; OLIVEIRA et al. 2004; SOUZA et al, 2004; MARTINS et al 2004; LABRUNA et al, 2007). O parasito tem ação de espoliação sanguínea, provocar lesões e transmitir patógenos (LEITE et al, 1998; OLIVEIRA, 2004; PRATA, 2005). É ainda um risco para Saúde Pública, já que é o principal vetor da *R. rickettsii*, o agente etiológico da FMB (LANE & CROSSKEY, 1993; LEMOS ET AL. 1997; LABRUNA, 2009; PAROLA ET AL., 2013; MOURA-MARTINIANO ET AL., 2014; OLIVEIRA ET AL. 2016).

Entretanto, estudos moleculares e morfológicos mostraram que *A. cajennense sensu lato* é um complexo de seis espécies (BEATI ET AL., 2013; NAVA ET AL., 2014) e no Brasil, este táxon é representado somente por duas espécies *A. cajennense sensu stricto* e *A. sculptum* (MARTINS ET AL., 2016). A distribuição geográfica de *A. sculptum* se estende desde as regiões úmidas do norte da Argentina, Bolívia e Paraguai até a região peri-amazônica do Brasil (BEATI ET AL., 2013; NAVA ET AL., 2014) e sabe-se até o momento, que apenas esta espécie do complexo *A. cajennense* ocorre no Rio de Janeiro. Porém, apesar de seu importante papel epidemiológico como principal bioagente da FMB (OLIVEIRA ET AL., 2016; MONTENEGRO ET AL., 2017), o conhecimento sobre os fatores que influenciam sua competência na transmissão de agentes patogênicos é limitado (BITENCOURTH, ET AL., 2016).

Para o controle desse artrópode, o mais usado na atualidade ainda são os carrapaticidas com princípios ativos sintéticos, no entanto, existem diversas desvantagens, e o uso indiscriminado sem orientação técnica

aumenta o impacto negativo no ambiente podendo levar ainda à seleção de carrapatos resistentes às bases químicas comumente utilizadas (RAVINDRAN et al. 2011). Na figura 6 abaixo, é possível visualizar o parasito em seus diferentes estágios de desenvolvimento.



Figura 6 – Estágios de desenvolvimento (Larva, Ninfia, Macho e fêmea) do *A. cajennense*. Fonte: Tickencounter. 2016.

3.2 *Amblyomma nodosum*

A. nodosum (Neumann, 1899) é um carrapato ixodídeo restrito à região Neotropical (GUGLIELMONE et al., 2003; NAVA et al., 2007), cujos hospedeiros são os mamíferos, em especial, o Tamanduá (Linnaeus, 1758), na fase adulta enquanto que em fases imaturas, ele pode parasitar uma variedade de aves (JONES et al., 1972; BECHARA et al., 2002; MARTINS et al., 2004; LABRUNA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2009; LUZ et al., 2012; PASCOAL et al., 2013; TORGA et al., 2013; GARCIA et al., 2013; MARTINS et al., 2014).

Embora não hajam relatos de *A. nodosum* sendo transmitindo o patógeno, já foi isolado *R. parkeri* e *R. bellii* em espécimes do carrapato coletado de aves passeriformes na mata Atlântica e de tamanduás no Patanal Sul do Mato Grosso (OGRZEWALSKA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2013), sendo esse carrapato, portanto, uma espécie importante na epidemiologia das riquetsias estudadas recentemente.

3.3 *Amblyomma ovale*

A. ovale é uma espécie pertencente à família Ixodidae (KOLONIN, 2009), são espécies que possuem ciclo triexeno, e portanto necessitam de três hospedeiros para completar o ciclo (LABRUNA, 2009). As fases adultas desse parasito tem predileção pelos cães domésticos, enquanto que as fases de larva e ninfa tem predileção por pequenos roedores, marsupiais e carnívoros (GUGLIEMONE et al; 2003).

Em áreas rurais do Município de Ibiraju, no Estado do Espírito Santo já foram detectados espécimes do carrapato em questão, e após procedimentos de reação de cadeia polimerase (PCR), foram detectadas riquetsias do GFM, fazendo com que esse carrapato possa ser caracterizado como potencial vetor desse patógeno (ACOSTA, 2018). Na figura 7, abaixo, é possível visualizar o artrópode. A) macho, visão dorsal; B) macho, visão ventral; C) fêmea, versão dorsal; D) fêmea, versão ventral.

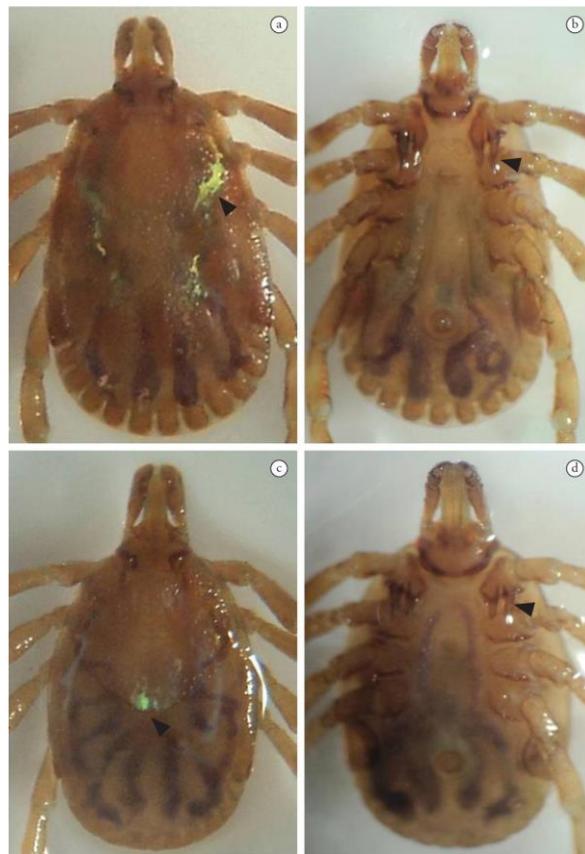


Figura 7 – Espécimes de *A. ovale* – a) Macho dorsal; b) Macho ventral; c) Fêmea dorsal; d) Fêmea ventral. Fonte: Caroline Gracielle Torres Ferreira et al. 2013.

3.4 *Amblyomma parvum*

É uma espécie de carrapato de importância ainda não bem esclarecida, é classificada como parasito heteroxeno, por necessitar de três hospedeiros para concluir seu ciclo. O ixodídeo em questão é encontrado em extensas áreas, desde o sul do México ao Norte da Argentina (GUGLIEMONE et al. 2003; NAVA et al. 2008a; 2008b), tendo um dos principais destaques no Cerrado brasileiro (NAVA et al. 2008a). Tem uma vasta lista de hospedeiros que inclui animais domésticos, selvagens (veado-catingueiro, quatis, tamanduá-bandeira, tamanduá-mirim, cutia, cateto e outros pequenos roedores) e o homem (GUGLIEMONE et al. 1991; NAVA et al. 2006). Dentre os hospedeiros dessa espécie de carrapato, existem poucos relatos em animais domésticos, mas Szabó et al. (2007), registrou esse artrópode parasitando búfalos, cães e equinos nas áreas de cerrado, e apesar de não haver registro de parasitismo em bovinos, essa hipótese não é descartada, já que a infestação por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pode mascarar o primeiro.

Estudos de susceptibilidade entre as diferentes espécies hospedeiras, os estudos realizados no Brasil com esse artrópode, demonstram que ele pode ser considerado tão generalista quanto o *A. cajennense* (OLEGÁRIO et al, 2011). Adicionado a isso, há uma outra grande semelhança entre as duas espécies, ambas são potenciais vetores de patógenos, já foi detectado em *A. parvum* na Argentina bactérias como *Ehrlichia chaffensis*, o agente da Erliquiose Monocítica em humanos (TOMASSONE et al., 2008) e também uma Riquétsia de patogenicidade desconhecida (PACHECO et al, 2007a). Moerbeck et al (2016) detectou *A. parvum* coletado no Estado do Ceará, como vetor também de *R. andeanae*, o que confirma o potencial vetor dessa espécie. Na figura 8, abaixo, é possível visualizar um espécime de *A. parvum*.



Ahid, 2008

Figura 8 – Espécime de *A. parvum*, no estágio de desenvolvimento adulto, fêmea. Ahid. 2008.

3.5 *Argas miniatus*

Argas miniatus é a única espécie desse gênero que tem ocorrência no Brasil, seus hospedeiros são as aves domésticas. Seu habitat são as pequenas criações de galinhas, o que acarreta em prejuízo e perdas econômicas pela queda da produtividade causada, bem como anemia, espoliação e transmissão de diversos patógenos, principalmente a *Borrelia anserina* (MARCHOUX, SALIMBENI; 1903).

É um carrapato considerado heteroxeno, e hematófago em todas as suas fases, encontrado na América do Norte, Central e principalmente na América do Sul, portanto, é considerado de distribuição neotropical. Na fase de larva, permanece no hospedeiro, parasitando-o por dias, e quando chega finalmente à fase de ninfa e adulto, o processo de repasto sanguíneo é feito em poucos minutos. A cópula por sua vez, é feita em seus habitats de vida livre, em abrigos e ninhos dos hospedeiros. (RHOR, 1909).

3.6 *Ctenocephalides felis*

C. felis é uma pulga da família Pulicidae, e já foi encontrada em diversos hospedeiros, tendo, entretanto, preferência por gatos e cães. A

ovoposição é feita no hospedeiro e no ambiente, onde eclodem as larvas, e se alimentam de detritos e fezes de pulgas adultas, logo em seguida formará o pupário, que dará origem a pupa, fase da pulga em que ela não se alimenta, e delas, emergirão os machos e fêmeas adultos que são hematófagos. O artrópode em seus hospedeiros tem ação irritante da saliva e que provoca uma reação alérgica em seus hospedeiros sensíveis, sendo potenciais vetores de diversos patógenos, entre eles *Dipylidium caninum*, *Hymenolepis sp.*, *Dipetalonema reconditum*, *Dirofilaria immitis*, além de *Rickettsia sp.*, outras bactérias e vírus (MONTEIRO, 2014).

Em análises feitas através de PCR em exemplares colhidos em gambás no Texas (EUA), foi encontrado 3,8% das pulgas positivas para *R. felis*, e 0,8% foi positivo para *R. typhi*, o que sugere o gambá como importante mantenedor do ciclo epidemiológico das riquetsias. Não foi ainda encontrado os dois patógenos co-habitando a mesma espécime (SCHRIEFER et al; 1994a, b), entretanto foi encontrado a existência de ambos no *C. felis*. Em outro estudo também dos EUA, foram coletados pulgas de cães, gatos e gambá de várias regiões geográficas entre 1986 e 1996 e foi detectado *R. felis* em mais de 50% das amostras estudadas, chegando à 93% em algumas áreas (HIGGINS et al., 1994). No Brasil, Moreira (2015), conseguiu detectar através também da PCR o artrópode *C. felis* como vetor de *R. felis* nos municípios do Estado do Ceará. Na figura 9, é possível visualizar uma espécime de fêmea à esquerda, e macho à direita.



Figura 9 – Espécies do estágio de desenvolvimento adulto (Fêmea a esquerda e macho a direita) de *Ctenocephalides felis*. Fonte: Alamy Stock Photo. 2006

3.7 *Ixodes loricatus*

I. loricatus, conhecido popularmente como “Carrapato de pernas pretas”, ocorre desde o México até a Argentina (FLECHTMANN, 1977, MARQUES et al., 2004). É a espécie mais comum nos didelfídeos, podendo ser encontrado nele as larvas, ninfas e adultos, enquanto que os roedores silvestres são os hospedeiros para larvas e ninfas desse artrópode, e a fase adulta parasita os gambás, cuícas e catitas (BARROS-BATTESTI; KNYSAK, 1999; MULLER et al. 2005). No município de São Paulo já foi detectado *Rickettsia spp.* nessa espécie de artrópode, sendo ele portanto, um potencial vetor das riquetsioses (LABRUNA et al. 2004b).

3.8 *Rhipicephalus sanguineus*

R. sanguineus é o “carrapato vermelho do cão”, nativo da África, tendo distribuição cosmopolita (LEONARD et al. 2002). É um parasito heteroxeno e tem recentemente se tornado uma praga em ambientes urbanizados. Os principais hospedeiros desse parasito são os cães, e outros mamíferos, podendo ainda ser encontrado parasitando aves e répteis, e sendo responsáveis por danos diretos como espoliação sanguínea, estresse e prurido; e também danos indiretos com a transmissão de patógenos como *Ehrlichia canis*, *Babesia canis*, *Hepatozoon canis* a seus hospedeiros (LABRUNA, 2004a; DANTAS-TORRES 2008), bem como na transmissão de patógenos também ao ser humano (SOUSA E BACELAR, 2004; MATSUMOTO et al 2005).

A prevalência do parasitismo por esse carrapato tem aumentado nas últimas décadas em cães, e hoje já existem no mercado diversas bases químicas específicas para o controle. É, atualmente, junto às pulgas, o principal ectoparasito de cães no Brasil (LABRUNA, 2004c). Na figura 6 abaixo, é possível visualizar o parasito em seus diferentes estágios de desenvolvimento.



Figura 10 – Estágios de desenvolvimento (Larva, Ninfa, Macho e fêmea) do *A. cajennense*. Fonte: Tickencounter. 2017.

3.9 *Rickettsia* sp.

Há três subdivisões para as espécies do gênero *Rickettsia*, são elas: O Grupo Tifo, que é composto pela *R. prowazekii*, sendo o vetor um piolho (tifo epidêmico) e *R. typhi*, tendo a pulga como vetor (tifo murinho); o Grupo ancestral com bactérias de patogenicidade desconhecidas como a *R. canadensis* e *R. bellii*; e finalmente, o Grupo Febre Maculosa (GFM) (RAOULT, 2001; ROUX et al., 1997; STOTHARD; CLACK; FUERST, 1994).

Dentre as Riquetsias do GFM apenas nove eram consideradas patogênicas até o início desse século. Com o advento das tecnologias moleculares têm-se o conhecimento de pelo menos 30, e destas, pelo menos 15, são responsáveis pelas riquetsioses que ocorrem pelo mundo. Quando são identificadas apenas nos vetores, as riquetsias são consideradas de patogenicidade desconhecida, e quando encontradas em humanos e relacionadas a determinada enfermidade, como a *R. parkeri*, que é incriminada pela febre maculosa ganglionar, ela é considerada patogênica, e a *R. rickettsi*, que causa a Febre Maculosa Brasileira, a espécie mais patogênica no Brasil (PADDOCK et al. 2004).

Nos artrópodes, essas bactérias podem ser encontradas nas glândulas salivares, ovários, intestino e hemolinfa. Entretanto, nos hospedeiros vertebrados elas estão presentes principalmente nas células endoteliais. São mantidas em focos endêmicos, porém podem causar surtos epidêmicos na

população humana. Essas doenças apresentam característica febril e aguda, podem conduzir o indivíduo infectado à morte se não forem tratadas precocemente. Os casos de infecção em humanos pelo gênero *Rickettsia* sp. têm sido registrados em diversos países, principalmente na América do Sul nos últimos 20 anos (EREMEEVA; DASCH, 2000; CARDOSO et al. 2006; PAROLA et al. 2013).

Ainda hoje, esses patógenos representam grande risco à saúde dos homens na América Latina, Leste dos EUA, África e alguns países do leste Europeu, por se tratar de uma doença infecciosa, com caráter endêmico. Existem casos relatados dessa enfermidade desde 1896 nos Estados Unidos e foi chamada na época de (Doença febril endêmica), e apenas em 1902 chegou-se a conclusão da participação dos carrapatos (MONTEIRO, 2014).

As espécies consideradas patogênicas, e suas respectivas distribuições geográficas são: *R. rickettsi* nas Américas; *R. honei*, *R. felis*, *R. conorii* no mediterrâneo; *R. africae* na África; *R. sibirica* e *R. japônica*; na Ásia; *R. australis*; na Austrália; e *R. mongolotimona*, *R. slovacca*, *R. helvética*. *R. akari* na Europa (MONTEIRO, 2014).

A transmissão do agente ao homem ocorre pela picada de um dos vetores infectados. A bactéria se multiplica em vários órgãos do carrapato, inclusive no ovário, o que possibilita a transmissão transovariana em pelo menos uma geração. Para ocorrer essa transmissão, o artrópode deve ficar aderido ao homem, realizando a hematofagia por um tempo médio de 4 a 6 horas. São parasitos preferencialmente de células endoteliais que revestem pequenos vasos através da fagocitose do parasito, uma vez dentro da célula faz a lise da membrana do fagossomo e inicia multiplicação (MONTEIRO, 2014).

A enfermidade causada pelo GFM tem como principal característica apresentar maior incidência em seres humanos da área rural ou suburbana de forma endêmica e epidêmica. No Brasil as principais ocorrências são nos Estados de São Paulo e Minas Gerais, mas já foi registrado também no Rio de Janeiro, Espírito Santo, Paraná, Santa Catarina, Rio grande do Sul com surtos

localizados, sendo sazonal no Sudeste do País, com maior ocorrência entre os meses de setembro a novembro. Há ainda relatos nos municípios do Nordeste, como Ceará, Bahia, Maranhão e Paraíba (MONTEIRO, 2014).

Em humanos, a febre maculosa manifesta-se principalmente com febre contínua, calafrios, prostração, mal-estar, mialgia e artralgia nos tornozelos e punhos principalmente e cefaleia após o período de incubação de 2 a 14 dias (MONTEIRO, 2014). O diagnóstico pode ser clínico-epidemiológico, baseado nos sinais e sintomas, mas requer exames laboratoriais para diferenciar de outras enfermidades, por pesquisa de anticorpo específico e isolamento do agente em amostras de sangue, biópsia da pele ou amostras dos artrópodes colhidos nos hospedeiros (MONTEIRO, 2014).

3.10 Candidatus *Rickettsia andeanae*

Foi relatado por Blair et al (2014), a possibilidade de uma nova espécie de *Rickettsia*, que foi identificada em *A. maculatum* e *I. boliviensis* encontrados em região agrária andina no Nordeste do Peru. Com análises moleculares com sequenciamento de DNA, a partir de amplificação de fragmento dos genes *ompA* e *ompB* e comparações genéticas, foi conclusivo que se tratava de uma nova espécie do GFM, escolhendo o nome como referência às regiões Andinas onde foram desenvolvidas as atividades.

Em seguida, outros pesquisadores relataram uma possível nova *Rickettsia*, e a chamaram “*Rickettsia* sp. Cepa Argentina” em estudos na Argentina com estudo molecular de *A. parvum* (PACHECO et al. 2007a). Entretanto, em estudos de revisão de literatura, Labruna et al. (2011), consideraram ambos os achados como uma só espécie, “*Candidatus Rickettsia andeanae*”. No Brasil, foi detectada por Moreira (2015) em espécime de *Amblyomma parvum* em municípios do Estado do Ceará.

3.11 *Rickettsia belli*

Em estudo Sorológico nos EUA, foi detectada em áreas com grande ocorrência de *R. rickettsi*, uma possível nova espécie de riquetsia isolada em *Dermacentor variabilis*, que foi denominada cepa 369-C. Em seguida, em outros estudos sorológicos, ocorreram reações cruzadas dessa cepa com bactérias do grupo da febre maculosa e do grupo tifo, sendo essa cepa posteriormente identificada morfológicamente e genotipicamente como a nova espécie *R. belli* (PHILIP et al. 1983). Estudos posteriores à cerca dos genes 16s e 23s rRNA, demonstrou evidências de *R. belli* poderia ser classificada em qualquer dos dois grupos, com características ancestrais dos dois grupos das alphabacterias e Rickettsiaceae (STOTHARD et al. 1994), estando por isso até hoje classificada como grupo ancestral separado, junto com a *R. canadensis* (DUMLER et al. 2001).

Segundo Labruna et al. (2011), a *R. belli* está é uma das rickettsias mais encontradas em carrapatos nos EUA e no Brasil, tanto em vários ixodídeos como *Dermacentor* e *Amblyomma*, quanto em argasídeos, exibindo por isso uma maior amplitude de invertebrados comparadas as outras riquetsias (OGATA et al. 2006)

Não se conhece bem a patogenicidade desse parasito, entretanto, em estudos com cobaias e coelhos ela possui certo efeito patogênico (OGATA et al. 2006). Pacheco et al. (2007b), detectaram em São Paulo, capivaras com evidências sorológicas de infecção natural por *R. belli*.

No Brasil, essa bactéria já foi encontrada em potenciais vetores como: *A. ovale*, *A. oblongogatum*, *A. sculptum*, *A. humerale* e *A. rotundatum* em Rondônia (LABRUNA et al. 2004d); em São Paulo em *A. rotundatum*, *A. dubitatum*, *A. ovale*, *A. incisum*, *A. nodosum* e *I. loricatus* (PINTER, LABRUNA, 2006; LABRUNA et al. 2004a, 2007; HORTA et al. 2007; ORGZERWALSKA et al. 2009; PACHECO et al 2009), e em espécimes de *A. nodosum* em municípios no Estado do Ceará (MOREIRA, 2015).

3.12 *Rickettsia felis*

R. felis já foi descrita em todos os continentes, sendo inicialmente chamado de “agente ELB” (Eis Labs, Soquel, CA), sendo detectado nos EUA na pulga *C. felis* através de microscopia eletrônica (ADAMS, SCHMIDTMAN, AZAD, 1990). O nome oriundo de *Felis catus domesticus* (o gato doméstico) foi proposto em 1966 quando foi esclarecida sua diferença com as outras riquetsias do mesmo gênero (HIGGINS et al. 1966). O patógeno foi associado a casos de febre maculosa em humanos no Texas, EUA, que inicialmente foram suspeitos de tifo murinho (SCHRIEFER et al. 1994). Apesar de humanos infectados por essa bactéria apresentem sinal clínico semelhante aos ocorridos em infecções por *R. rickettsi*, acredita-se que a primeira seja menos virulenta pela ausência de casos letais relatados e tratáveis, o inverso da segunda espécie mencionada (DIAS, MARTINS, 1939; ZAVALA-VELÁZQUEZ et al. 2000).

No Brasil, pouco se conhece sobre a epidemiologia da riquetsiose causada pela *R. felis*, sua relação com os casos de febre maculosa originadas por outras riquetsias, ou sua interação com os demais patógenos e vetores. Foi diagnosticada no Brasil em 2001 no Estado de Minas Gerais em sague de pacientes com sinais compatíveis com os de febre maculosa (RAOULT et al. 2001), sendo posteriormente detectado e caracterizado, com técnicas moleculares em pulgas coletadas em cães de área com casos suspeitos (OLIVEIRA et al. 2002). Ainda no Brasil, foi encontrada patogênica em municípios do Estado do Ceará, através de biologia molecular em *C. felis* (MOREIRA, 2015).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Áreas de estudo

A pesquisa foi realizada em regiões com casos humanos e animais, suspeitos, compatíveis ou confirmados no estado do Ceará, no período de julho de 2014 a julho de 2017. Foram selecionados os municípios Fortaleza (Região Metropolitana de Fortaleza), Iguatú (Centro Sul) e Meruoca (Sertão do Sobral).

4.2 Coleta de material

As coletas de campo foram realizadas em parceria entre as equipes do LIRN e das Secretarias Municipais e Estaduais de Saúde do Ceará. Os ectoparasitos foram coletados sobre cães, gatos, galinhas, e presentes na localidade de provável infecção humana, bem como em ambiente (Galinheiro e matas). A técnica de obtenção de carrapatos nos hospedeiros foi por torção em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma e no ambiente a coleta foi realizada seguindo a técnica de arrasto de flanela e busca ativa. Os artrópodes coletados foram acondicionados em potes plásticos estéreis contendo isopropanol PA e encaminhados para o LIRN para identificação.

4.3 Identificação taxonômica dos artrópodes

Os ectoparasitos foram identificados seguindo o Procedimento Operacional Padrão para Identificação Taxonômica de Vetores das Riquetsias (POP-LIRN-017) elaborado e implementado pelo LIRN, utilizando chaves dicotômicas apropriadas (Amorim et al. 1999, Linardi e Guimarães 2000, Barros-Battesti et al. 2006, Martins et al. 2010).

4.4 Pesquisa do bioagente

Após a identificação morfológica, os ixodídeos e sifonápteros foram analisados molecularmente de forma individual ou reunidos em grupos (de dois a 10 indivíduos) de acordo com sexo, estágio de desenvolvimento (adulto, larva e ninfa), processo de ingurgitamento e hospedeiro, constituindo as alíquotas das amostras dos vetores. Os ectoparasitos foram submetidos à extração de

DNA genômico (DNAg), quantificação de ácidos nucleicos e PCR visando a detecção de riquetsias.

4.4.1 Extração de DNAg

O DNAg de carrapatos e pulgas foi obtido pela técnica de extração por NaCl (ALJANABI; MARTINEZ, 1997) e armazenado a -20°C . Os artrópodes foram triturados em banho de N_2 , e ressuspensos em um volume máximo de 400 μl de solução 1 (NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM pH 8,0). Em seguida foi adicionado SDS 2% e 0,4 mg/ml Proteinase K (Promega, Madison, EUA) e o material incubado em banho-maria à $56 - 60^{\circ}\text{C}$ por 1 à 2 h. Após esta incubação, à mistura foi acrescentada de 2,57 mM de NaCl, homogeneizada e centrifugada 10.000 g por 30 min; o sobrenadante foi precipitado em igual volume de isopropanol. O DNAg foi ressuspensado em 30 μl de água livre de DNase e RNase e quantificado em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™).

4.4.2 Quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotômetro

Após a extração de DNAg, pelo menos 10% das amostras eram selecionadas de forma aleatória e encaminhadas à Plataforma de Quantificação da FIOCRUZ, para quantificação dos ácidos nucleicos em espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Scientific™) através da aplicação direta de 1 μL de amostra para a leitura, validando a extração de DNAg e confirmando a qualidade da amostra para a amplificação.

4.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As amostras foram processadas utilizando oligonucleotídeos gênero-específicos CS2 (gene *gltA*) para detecção de *Rickettsia* spp e oligonucleotídeos grupo-específicos, para detecção de riquetsias GFM (gene *ompA*) (Tabela 4). O preparo das soluções e as condições das corridas de PCR foram adequados para cada tipo de gene pesquisado (LABRUNA et al., 2004b; REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991). Nas reações de PCR foram

utilizados 10 pmoles de cada oligonucleotídeo; 200 µM de cada dNTP; 1X de tampão 10X (Tris-HCl 200 mM pH 8,4; KCl 500 mM); 1,5 mM MgCl₂; 1,25 U de Taq DNA polimerase e água ultrapura livre de DNase e RNase (qsp 25 µl). Como controle positivo, foi utilizado DNAg de *R. rickettsii* e como controle negativo a água utilizada na reação da PCR. Para a visualização do fragmento de DNA amplificado, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2%, coradas por brometo de etídeo e observadas em luz de ultravioleta (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

Tabela 4 – Oligonucleotídeos utilizados para identificação genotípica de espécies de riquetsias.

Gene	Oligonucleotídeo	Seqüência de nucleotídeo (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>ompA</i> ^a	<i>Rr</i> 190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532
	<i>Rr</i> 190.602n	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	
<i>gltA</i> ^b	CS2-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401
	CS2-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	

FONTE: ^a REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991; ^b LABRUNA et al., 2004b;

4.5 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)

O valor da frequência mínima de vetores infectados (FMVI) permite inferir, com segurança, a frequência mínima de vetores infectados de uma dada espécie em uma determinada área. A FMVI para cada espécie foi calculada utilizando como base os resultados sobre a infecção dos ectoparasitas obtidos por PCR, empregado a fórmula segundo Burket et al. (1998):

$$FMVI = \frac{\text{n}^\circ \text{ de amostras positivas para cada espécie}}{\text{n}^\circ \text{ total de vetores de cada espécie}} \times 100$$

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um total de 125 ectoparasitos foram coletados nos municípios de: Fortaleza, Iguatú e Meruoca. Na tabela 5 estão os resultados obtidos nas coletas, com os dados dos hospedeiros examinados (espécie e número) e vetores coletados (espécie, número, estágio de desenvolvimento e sexo). Os artrópodes foram coletados: sobre bovino (n=1), caninos (n=32), galinha (n=1), felino (n=1), totalizando 45 hospedeiros. No ambiente, foram coletadas 10 artrópodes.

Tabela 5 - Espécies de vetores de riquetsias coletados em municípios investigados para Febre Maculosa Brasileira no estado do Ceará, no período de julho de 2014 a julho de 2017.

Município	Hospedeiro/ Ambiente	Espécie	♂	♀	Ninfa	Larva	Total
Fortaleza	Ambiente (n= 10)	<i>Amblyomma ovale</i>	-	4	4	-	8
		<i>Amblyomma parvum</i>	8	14	-	-	22
		<i>Ixodes loricatus</i>	2	6	-	-	8
Iguatu	<i>Canis familiaris</i> (n=3)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	3	5	-	-	8
	<i>Gallus gallus</i> (n=1)	<i>Argas miniatus</i>	3	3	-	-	6
Meruoca	<i>Bos taurus</i> (n=1)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	-	2	-	-	2
		<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	18	12	2	-	32
	<i>Canis familiaris</i> (n=29)	<i>Amblyomma parvum</i>	-	1	-	-	1
		<i>Ctenocephalides felis</i>	10	26	-	-	36
	<i>Felis catus</i> (n=1)	<i>Amblyomma parvum</i>	-	2	-	-	2
Total	45		44	75	6	-	125

Os 125 ectoparasitas analisados formaram 58 amostras, todas foram processadas por PCR, utilizando os dois oligonucleotídeos para detecção dos

genes *gltA* e *ompA*. Foi possível amplificar fragmento de pelo menos um dos genes riquetsiais em 14 amostras (24,14%; 14/58).

Entre os municípios coletados, apenas dois apresentaram amostras positivas para a presença de Riquetsias: Fortaleza (35,3%; 6/17) e Meruoca (24,24%; 8/33). Na tabela 6, é possível conhecer as amostras positivas, bem como as espécies de vetores envolvidos e seu estágio de desenvolvimento.

Tabela 6 – Espécies e estágios de vida das amostras positivas de carrapatos para riquetsioses.

Município	Amostra	Espécie	Estágio de desenvolvimento
Fortaleza	LIC 7748¹	<i>Amblyomma parvum</i>	1 ♀
Fortaleza	LIC 7748B¹	<i>Amblyomma parvum</i>	1 ♀
Fortaleza	LIC 7748C¹	<i>Amblyomma parvum</i>	1 ♂
Fortaleza	LIC 7749²	<i>Amblyomma parvum</i>	1 ♀
Fortaleza	LIC 7749B¹	<i>Amblyomma parvum</i>	1 ♀
Fortaleza	LIC 7749D³	<i>Amblyomma parvum</i>	1 ♂
Meruoca	LIS 578¹	<i>Ctenocephalides felis</i>	1 ♂
Meruoca	LIS 579¹	<i>Ctenocephalides felis</i>	2 ♀
Meruoca	LIS 580¹	<i>Ctenocephalides felis</i>	1 ♂
Meruoca	LIS 581B³	<i>Ctenocephalides felis</i>	1 ♀
Meruoca	LIS 583³	<i>Ctenocephalides felis</i>	1 ♀
Meruoca	LIS 584³	<i>Ctenocephalides felis</i>	1 ♀
Meruoca	LIS 585²	<i>Ctenocephalides felis</i>	1 ♀
Meruoca	LIS 588²	<i>Ctenocephalides felis</i>	1 ♀

Legenda: ¹ Amostras positivas para o gene *gltA* e *ompA*; ² Amostras positivas apenas para o gene *gltA*; ³ Amostras positivas apenas para o gene *ompA*.

O gene *gltA* está presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia*, e o gene *ompA* presente nas espécies no GFM.

No município de Fortaleza, as amostras positivas foram todas coletadas no ambiente em áreas de mata, sendo todos vetores infectados da espécie *A.*

parvum. Em Meruoca, as amostras positivas foram coletadas em cães, e o artrópode infectado pela riquetsia foi a pulga *C. felis*.

No Período de 2010 a 2014, Estado do Ceará notificou nove casos de febre maculosa em dois municípios da região do Maciço de Baturité, com sintomas semelhantes às aquelas características de infecção por *R. parkeri*, *R. sibirica* e *R. africae* (SINAN/SVS/MS, 2015). Segundo Moerbeck 2015, os artrópodes incriminados na circulação de riquetsias patogênicas em ambientes antrópicos foram os carrapatos *A. ovale* e *R. sanguineus*, diferindo do presente estudo, que identificou *A. parvum* e *C. felis* como principais hospedeiros infectados por riquetsias em diversos municípios do Ceará.

Em estudo na Região do Maciço do Baturité do Estado do Ceará, com uso da metodologia de Isolamento de *Rickettsia* spp. em cultura de células Vero, foram encontradas isolados provenientes dos artrópodes *A. ovale* e *C. felis*, diferindo quanto ao primeiro vetor que não foi incriminado como potencial vetor no presente estudo, e corroborando quanto ao segundo vetor, que foi incriminado em ambos os estudos.

Moerbeck (2015), encontrou no Estado do Ceará, amostras de *A. parvum* e *C. felis* positivas para riquetsias, o que também foi registrado no presente estudo. Entretanto, o primeiro artrópode foi encontrado por Moerbeck no município de Redenção, e o segundo nos municípios de Mulungu e Araçatuba. Além desses artrópodes infectados, Moerbeck (2015), encontrou ainda, patógenos riquetsiais em amostras de *A. ovale*, *A. nodosum* e *R. sanguineus*, diferindo do presente estudo, onde esses artrópodes não foram incriminados como potenciais vetores das riquetsias.

A frequência mínima de vetores infectados foi descrita a seguir, na tabela 7, separada por vetor e município, bem como os valores totais da FMVI.

Tabela 7 – Frequência mínima de vetores infectados com riquetsias (%) para cada espécie de artrópode e por municípios do Estado do Ceará no período do estado

Vetor	Localidade	Fortaleza	Meruoca	Iguatu	Total
<i>Amblyomma parvum</i>		26,1%	-	-	26,1%
<i>Amblyomma ovale</i>		-	-	-	-
<i>Ixodes loricatus</i>		-	-	-	-
<i>Argas miniatus</i>		-	-	-	-
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		-	-	-	-
<i>Ctenocephalides felis</i>		-	22,22%	-	22,22%

Os espécimes de *A. parvum* apresentaram o valor de FMVI de 26,1% (6/23) no Município de Fortaleza. No estudo de Moerbeck (2015); a FMVI obtida para este vetor foi de 22,22% (8/36), no município de Redenção, levemente inferior à encontrada no presente estudo.

A FMVI obtida para as pulgas *C. felis* foi de 22,22% no município de Meruoca. Em relato anterior, realizado nos municípios do Estado do Ceará: Mulungu e Aratuba, Moerbeck (2015), obteve FMVI de 20,93% para esse vetor, ambos os estudos obtiveram altas frequências e concordam entre si, demonstrado o alto número de *C. felis* infectantes no Estado estudado.

Apesar dos valores altos de FMVI, outros estudos são necessários para o entendimento do papel dessas duas espécies no ciclo epidemiológico da Febre Maculosa, já que as espécies encontradas positivas não realizam hematofagia em humanos.

Os resultados descritos no presente estudo, são considerados inovadores, por não haverem relatos precedentes da presença e circulação de riquetsias patogênicas nos municípios de Fortaleza e Meruoca, sendo por isso, importante, implementar nessas cidades, medidas de controle e prevenção para a enfermidade.

6.CONCLUSÃO

A presente investigação sobre genes riquetsiais (*gltA* e *ompA*) em potenciais vetores procedentes de áreas com casos suspeitos ou confirmados de Febre Maculosa, no estado do Ceará, permitiu:

- Registrar, pela primeira vez, a ocorrência de riquetsias nos municípios Fortaleza e Meruoca no Estado do Ceará

- Indicar a provável participação de cães no ciclo de algumas riquetsias que circulam nas áreas estudadas.

7. REFERÊNCIAS

ACOSTA, I.C.L. et al. First molecular detection of Rickettsia sp. strain Atlantic rainforest in Amblyomma ovale ticks from Espírito Santo state, Brazil. *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.*, n. AHEAD, 2018.

ADAMS, J. R.; SCHMIDTMAN, E. T.; AZAD, A. F. Infection of colonized cat fleas *Ctenocephalides felis* (Bouché) with a Rickettsia-Like microorganism. *Amer. J. of Trop. Med. and Hyg.* 43: 400-409, 1990.

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucl. Acids. Res.*, 25(22): 4692-4693, 1997.

AMORIM M, SERRA-FREIRE N.M. Chave dicotômica para identificação de larvas de algumas espécies do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Entomol. y Vectores* 1999; 6(1):75-90.

ARAGÃO, H.B.; FONSECA, F. Notas de ixodologia: IX. O complexo ovale do gênero *Amblyomma*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 59(2):131-148, 1961

BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H., Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. *Vox/ICTTD-3/Butantan*. São Paulo, SP. 2006.

BARROS-BATTESTI, D. N.; KNYSAK, I. Catalogue of Brazilian Ixodes (Acari: Ixodidae) material in mite collection of Instituto Butantan . *Papeis Avulsos de Zoologia*, 41(3):49-57, 1999.

BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROSBATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the cayenne tick: Phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol. Biol.*, 13:267, 2013. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2148-13-267>.

BITENCOURTH, K.; VOLOCH C.M.; SERRA-FREIRE N.M.; MACHADO-FREIRE, E.; AMORIM M.; GAZETA G.S.; Analysis of a *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for brazil spotted fever. *Med. And vet. Entomol.* 30:342-350. 2016.

BLAIR, P. J.; JIANG, J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; MENDOZA, L.; VILLASECA, P.; SUMMER, J. W.; RICHARDS, A. L.; OLSONM J. G. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. *J. of Clin. Microbiology*, 42:4961-4970, 2004.

BURKET, C.T.; VANN, C. N.; PINGER, R. R; CHATOT, C. L.; STEINER, F. E. Minimum infection rate of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by

Ehrlichia chaffeensis (Rickettsiales: Ehrlichieae) in southern Indiana. *J. Med. Entomol.*, 35(5):653-659, 1998.

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

DANTAS-TORRES, F. The brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *J. of Vet. Parasitol.* 152:173-185, 2008.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted Fever in Brazil. *Amer. J. of Trop. Med.* 19:103-108, 1939.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, description of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 51(6):2145-2165, 2001.

EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE. European Molecular Biology Laboratory (EMBL). Disponível em: <<http://www.ebi.ac.uk/clustalw>>. Acesso em: 06 mai. 2011.

EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY – EMBnet. BOXSHADE – Multiple alignments designer. Disponível em: <http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html>. Acesso em: 06 mai. 2011.

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

FLECHTAMANN, C.H.W. Ácaros de Importância Médico Veterinária. São Paulo: Nobel, p. 192, 1977

FRIEDHOFF, K. T. Interaction between parasite and tick vector. *Inter. J. for parasitol.*, 20(4):525-535, 1990.

GOMES, S.N.; PESENTI, Tatiana C.; MÜLLER, G. Parasitism by Amblyomma ovale and Amblyomma fuscum (Acari: Ixodidae) on Dasypus novemcinctus (Xenarthra: Dasypodidae) in Brazil. *Arq. do Inst. Biol.* 82:1-4, 2015.

GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PENA, A.; KEIRANS, J.E.; ROBBINS, R.G. Ticks (Acari: Ixodidae) of the zoogeographic region. Atlanta, Houten, The

Netherlands, *International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases (ICTTD-2)*, p. 173, 2003.

GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; VINABAL, A.E. Ticks (Ixodidae) parasitizing humans in four provinces of north-western Argentina. *An. of Trop. Med. and Parasitol.* 85:539-542, 1991.

GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A.J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; VENZAL, J.M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J. E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844: hosts, distribution and 16s rDNA sequences. *Vet. Parasitol.* 113(3-4):273-288, 2003.

GUGLIELMONE, A.A.; SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, J.R.S.; ESTRADA-PEÑA, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. In: BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. (Eds.) Carrapatos de Importância médico veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies, Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, p. 115–138. 2006.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. Ectoparasitos de Importância Veterinária, Plêiade, São Paulo, p. 213, 2001.

HIGGINS, J.A.; SACCI, J. B. J.; SCHRIEFER, M. E.; ENDRIS, R. G.; AZAD, A. F. Molecular identification of Rickettsia-like microorganisms associated with colonized cat fleas (*Ctenocephalides felis*). *Insect Mol. Biol.* 3:27-33, 1994.

HIGGINS, J. A.; RADULOVIC, S.; SCHRIEFER, M. E.; AZAD, A. F. Rickettsia felis: A new species of pathogenic Rickettsia isolated from cat fleas. *J. of Clin. Microbiol.* 34(3):671-674, 1996.

HOOGSTRAAL, Harry. Ticks in relation to human diseases caused by Rickettsia species. *An. Review of Entomol*, 12(1):377-420, 1967.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 102:793-801, 2007.

KOLONIN, G. V. Fauna of ixodid ticks of the world (Acari, Ixodidae). Moscow, 2009. Disponível em: <<http://www.kolonin.org/1.html>>. Acesso em: 9 jan. 2019.

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state

of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.*, 42(1):90-98, 2004b.

LABRUNA, M.B. Biologia-Ecologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13(1), 2004c.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; BOUYER, D. H.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J. of Med. Entomol.* 41:1073–1081, 2004d.

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

LABRUNA, M.B.; TERASSINI, F.A.; CAMARGO, L.M.A. Notes on population dynamics of *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) in Brazil. *J. Parasitol.* 95:1016-1018, 2009.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S. V.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. *Rickettsioses* in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev. de med. Vet. e zoot. de Córdoba*, 16(2):2435-2457, 2011.

LANE, R.P.; CROSSKEY, R.W. *Medical insects and arachnids*. Londres: Chapman & Hall, p.597-631, 1993.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P.A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R.; THOMPSON, J. D.; GIBSON, T. J.; HIGGINS, D. G. ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21):2947-2948. 2007.

LEITE, R.C. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887): susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiogeográficas da baixada do Grande-Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. 151f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária Preventiva) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais. 1988.

LEMO, T.L.G.; MONTE, F.J.Q.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A.; BARBOSA, R.C.S.B.; LIMA, E.O. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from Brazilian plants. *Fitoterapia*, 63:266–268, 1997.

LEONARD, J.A.; WAYNE, R.K.; WHEELER, J.; VALADEZ, R.; GUILLEN S & VILA C. Ancient DNA evidence for Old World origin of New World dogs. *Sci.* 298:1613-161, 2002.

LINARDI, P.M., Guimarães, L.R., Sifonápteros do Bras. Ed Museu de Zoologia USP/FAPESP, São Paulo, SP. 2000.

MONTENEGRO, D. C. et al. Spotted Fever: Epidemiology and Vector-Rickettsia-Host Relationship in Rio de Janeiro State. *Frontiers in Microbiol.* 8:505–515, 2017.

MARCHOUX, E. ; SALIMBENI, A. La spirillose des poules. *An. of Inst. Pasteur Lille*, Paris, 17(1):569-580, 1903.

MARQUES, S.; BARROS-BATTESTI, D.M.; ONOFRIO, V.C.; FAMADAS, K.M.; FACCINI, J.L.H.; KEIRANS, J.E. Redescription of larva, nymph and adults of *Ixodes (I.) loricatus* Neumann, 1899 (Acari:Ixodidae) based on light and scanning electromicroscopy. *Syst. Parasitol.* 59(2):135-146. 2004.

MARTINS, J.R.; MEDRI, I.M.; OLIVEIRA, C.M.; GUGLIELMONE, A. Ocorrência de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal Sul Mato-Grossense, *Bras. Ci. Rur.* 34(1):293-295, 2004.

MARTINS T.F., ONOFRIO VC, BARROS-BATTESTI D, LABRUNA MB. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions and identification key. *Ticks Tick Borne Dis.* 1(2):75-99. 2010.

MARTINS, Thiago Fernandes et al. Ticks infesting wild small rodents in three areas of the state of São Paulo, Brazil. *Ciê. Rur.*, 46(5):871-875, 2016.

MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conori*. *Vector Borne and Zoonotic Dis.* 5:363–372, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológico. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/_arquivos/pdf/febremaculosa_gve.pdf>. Acesso em 16 fev. 2010.

MONTEIRO, S. G.; Parasitologia na Medicina Veterinária. São Paulo: Roca, P. 92-93. 2014.

MOERBECK, L.M.C. et al. Ecoepidemiologia de Riquetsias em área de complexo florestal de Mata Atlântica, dentro do bioma caatinga, região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará. Tese de Doutorado. 2015

MOURA-MARTINIANO, Nicole O. et al. Rickettsia and vector biodiversity of spotted fever focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. *Emerging Infec. Dis.*, 20(3):498, 2014.

MULLER, G.; BRUM, J.G.W.; LANGONI, P.Q.; MICHELS, G.H.; SNKOC, A.L.; RUAS, J.L.; BERNE, M.E.A. *Didelphis albiventris* Lund, 1841, parasitado por

Ixodes loricatus Neumann, 1899, e *Amblyomma aureolatum* Pallas, 1772, (Acari: Ixodidae) no Rio Grande do Sul. *Arq. do Inst. Biol.* 72(3):319-324, 2005.

NACIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. BLAST Assembled RefSeq Genomes. Nucleotide Blast. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>>. Acesso em: 06 mai. 2011.

NAVA, S.; CAPARROS, J.A.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) infesting humans in North western Cordoba Province, Argentina. *Med.* 66:225-228, 2006a.

NAVA, S.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Aspects of the life cycle of *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae) under natural conditions. *Vet. Parasitol.* 156:270-276, 2008b.

NAVA, S.; SZABÓ, M.P.J.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. Distribution, hosts, 16S rDNA sequences and phylogenetic position of the Neotropical tick *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). *An. of Trop. Med. & Parasitol.* 102(5):409-425, 2008a.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and tick-borne dis.*, 5(3):252-276, 2014.

OGATA, H.; SCOLA, B. L.; AUDIC, S.; RENESTO, P.; BLANC, G.; ROBERT, C.; FOURNIER, P. E.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D. Genome Sequence of *Rickettsia bellii* Illuminates the Role of Amoebae in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. *PLoS genetics*, v.2, 2006. doi:10.1371/journal.pgen.0020076

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. *An. of Trop. Med. and Parasitol.* 103:413-425, 2009.

OLEGÁRIO, M.M.M.; GERARDI, M.; TSURUTA, S.A.; SZABÓ, M.P.J. Suitability of domestic hosts and life cycle of the tick *Amblyomma parvum*, Aragão 1908 (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 179:203-208, 2011.

OLIVEIRA, R. P.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; CHAMONE, C. B.; CALIC, S. B.; SILVA, S. U.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp fleas, Brazil. *Emerging Infectious Dis.* 8(3):317-319, 2002.

OLIVEIRA, P.R. Biologia e controle de *Amblyomma cajennense*. *Rev. Bras. de Parasitol. Vet.* v.13, suplemento 1, 2004.

OLIVEIRA, S.V. et al. Vigilância de ambientes da febre maculosa: explorando as áreas silenciosas do Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude*, 7(3):65-72, 2016.

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

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection In Capybaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*) From São Paulo, Brazil: Serological Evidence For Infection By *Rickettsia Bellii* And *Rickettsia Parkeri*. *Biomédica, Rev. del Inst. Nac. del Salud*, 27:364-371, 2007b.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. de Med. Trop.* 42:351-353, 2009.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: A newly reconized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin. Infect. Dis.*,38(6):805-811, 2004.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.*, 36(3):469-492, 2005.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; ANACKER, R. L.; CORY, J.; HAYES, S. F.; BURGDORFER, W.; YUNKER, C. E. "*Rickettsia bellii*" sp. nov.: a tick borne *Rickettsia*, widely distributed in the United States, that is distinct from the spotted fever and typhus biogroups. *Inter. J. of Syst. and Evol. Microbiol.* 33:94-106, 1983.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *An. of the New York Acad. of Sci.* 1078:523–529. 2006.

PRATA, M.C.A. Carrapato estrela: problemas e soluções para animais e humanos. In: Furlong J (Ed.) Carrapato: problemas e soluções. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, p. 51–65, 2005.

RAOULT, D.; LA-SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; FENOLLAR, F.; GALVÃO, M. A. M.; LAMBALLERIE, X. D. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerging Infec. Dis.* 7(1):73-81, 2001.

RAVINDRAN, R.; JULIET, S.; KUMAR, K.G.A.; SUNIL, A.R.; NAIR, N.S.; AMITHAMOL, K.K.; RAWAT, A.K.S.; GHOSH, S. Toxic effects of various

solvents against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Ticks Tick-borne Dis.* 2(3):160–162, 2011.

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.*, 173(5):1576-1589, 1991.

ROHR, C. J. Estudo sobre Ixodidas do Bras. Rio de Janeiro: Gomes, Irmão & C., p. 226. 1909.

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

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

SCHRIEFER, M. E.; SACCI-JR; J. B.; DUMLER, J. S.; BULLEN, M. G.; AZAD, A. F. Identification of a novel *Rickettsial* infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J. of Clin. Microbiol.* 32:949-954, 1994.

SILVA, A.B. et al. Isolamento, caracterização molecular, análise filogenética e expressão de genes relacionados à infecção de riquetsias do Grupo Febre Maculosa circulantes no Brasil. Tese de Doutorado. 2016.

SINAN/SVS/MS. Sistema Integrado Nacional de Agravos de Notificação, Secretaria de Vigilância em saúde, Ministério da Saúde. [Acessado em 17 de jan de 2018]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.

SOUSA, R.; BACELLAR, F. Morbi-Mortalidade por *Rickettsia conorii* em Portugal. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13:180–184, 2004.

SOUZA, C.E.; CALLE, S.B.; CAMARGO, M.C.G.O. O papel da capivara *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da febre maculosa brasileira. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 13:203–204, 2004.

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

SZABÓ, M.P.J.; OLEGÁRIO, M.M.M.; SANTOS, A.L.Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Experimental and Applied Acarology*, 43:73- 84, 2007.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molec. Biol. Evol.*, 28(10):2731-2739. 2011.

ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; RUÍZ-SOSA, J. A.; SÁNCHEZ-ELIAS, R. A.;
BECERRA-CARMONA, G.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* rickettsiosis in
Yucatán. *Lancet*, 356:1079-1080, 2000.