



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DO  
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO-UEMA

CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS-CCA

MESTRADO EM CIÊNCIA ANIMAL

**OCORRÊNCIA DE CARRAPATO DO COMPLEXO *Amblyomma maculatum*  
(ACARI: IXODIDAE) E SUA RELAÇÃO COM *Rickettsia* NA BAIXADA MARANHENSE,  
MARANHÃO, BRASIL**

São Luís – MA

2019

**ANA BEATRIZ AMÉRICO PEREIRA**

**OCORRÊNCIA DE CARRAPATO DO COMPLEXO *Amblyomma maculatum*  
(ACARI: IXODIDAE) E SUA RELAÇÃO COM *Rickettsia* NA BAIXADA MARANHENSE,  
MARANHÃO, BRASIL**

São Luís – MA

2019

**ANA BEATRIZ AMÉRICO PEREIRA**

OCORRÊNCIA DE CARRAPATO DO COMPLEXO *Amblyomma maculatum* (ACARI:  
IXODIDAE) E SUA RELAÇÃO COM *Rickettsia* NA BAIXADA MARANHENSE,  
MARANHÃO, BRASIL

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado  
em Ciência Animal da Universidade Estadual  
do Maranhão, com o intuito de obtenção do  
título de Mestre.

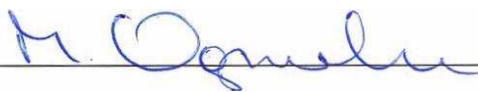
Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

BANCA EXAMINADORA

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira (Orientadora)**

Doutora em Biologia Parasitária  
Universidade Estadual do Maranhão



---

**Dra. Maria Halina Ogrzawska**  
Doutora em Medicina Veterinária  
Instituto Osvaldo Cruz/IOC/FIOCRUZ

---

**Prof<sup>a</sup>. Dra. Andréa Pereira da Costa**

Doutora em Ciências  
Universidade Estadual do Maranhão

A Deus, aos meus avôs Policarpo Pereira e Raimundo Américo (*in memoriam*), à minha sobrinha Ana Catarina, à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e pelas pessoas que Ele tem colocado no meu caminho. Não tenho dúvidas do Seu cuidado comigo.

Aos meus amados pais, Elmiro Pereira e Maria Américo, por serem meus exemplos de caráter e por me educarem tão bem. Por acreditarem em mim e me incentivarem a buscar meus objetivos. Sem eles nada seria possível. Tudo é por eles!

À minha irmã, Ana Maria, pelo companheirismo e amizade. Por ser um exemplo de dedicação e minha inspiração. Por ser meu ponto de apoio. Por sempre acreditar e lutar por mim.

À minha sobrinha e afilhada Ana Catarina, que mesmo antes de nascer já iluminava meus dias e me motiva a ser melhor.

Ao meu namorado e amigo José Carlos, por toda disponibilidade e por sempre me colocar para cima. Pela amizade e carinho. Por toda paciência durante os últimos meses do mestrado.

Aos meus sobrinhos, avós, primos, tios e padrinhos, por serem a melhor família que eu poderia ter. Por serem calma e descanso em meio a esses dois anos de correria.

Ao Prof. Dr. Francisco Borges Costa, pela orientação e amizade. Pela paciência em tirar minhas inúmeras dúvidas e por toda dedicação ao trabalho. Sem ele nada seria possível.

À Maria Halina Ogrzewalska, por dedicar seu tempo a este trabalho. Por estar sempre disposta a ajudar. Pelos ensinamentos e pela amizade.

À Prof. Dr. Rita de Maria Seabra Nogueira, pela orientação e paciência. Por todo o cuidado em sentar comigo e me ajudar em cada detalhe na escrita do trabalho. Seus ensinamentos foram fundamentais.

À Carolina Serpa, por todo apoio na minha estadia na Universidade de São Paulo. Pela ajuda com processamento das amostras, pelos ensinamentos, pelas risadas e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna por abrir as portas do seu laboratório, pela oportunidade concedida e pela parceria.

Ao grupo de estudos em parasitologia veterinária-GEPVET, em especial à Profa Andréa Pereira Costa, Nayana Louzeiro e Gustavo Matias, por toda ajuda, pela amizade e companheirismo.

A todos do Laboratório de Parasitologia FMVZ/ USP, pelo acolhimento e ensinamentos. Em especial, à Naiani Uchôa, Amália Barbieri, Bruna Alves, Jaciara de Oliveira, Jonas Moraes Filho, Diego, Thiago Martinz e Sebástian Muñhoz por sempre estarem disponíveis para me ajudar, pelos momentos de descontração, por fazerem eu me sentir em casa. Serei sempre grata.

A Thiago Martinz, por toda a ajuda na identificação dos carrapatos coletados. Obrigada pela disponibilidade.

Aos amigos que me acompanham desde a graduação, Ana Eliza Oliveira, Ana Clara Bastos, Aleska Lima, Diego Nascimento, Lucélia Teixeira, Thalyta Frazão e Luciana Veloso, pela companheirismo e amizade. Por tentarem estar presentes mesmo na distância. Grata pela amizade de vocês.

Às amigas Ana Clara Bastos, Ana Eliza Oliveira e Lucélia Teixeira, que, por seguirem o mesmo caminho por mim escolhido, compartilham dos mesmos medos, inseguranças e sonhos. Por estarem sempre disponíveis para ajudar, pela motivação e pela força. Seria muito mais pesado se eu não tivesse vocês comigo, seja na UEMA ou na USP. Obrigada pelo apoio!

À FAPEMA, pelo financiamento do projeto.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudo.

À Universidade Estadual do Maranhão, pela oportunidade de fazer a graduação, e agora o mestrado.

MUITO OBRIGADA!

*“Deus é bom o tempo todo”.*

## RESUMO

Em 2013 foi registrada pela primeira vez, no estado do Maranhão, a ocorrência de carrapatos pertencentes ao complexo *Amblyomma maculatum*, na mesorregião da Baixada Maranhense. Até então, o ciclo de vida destes ectoparasitas na região, assim como os hospedeiros relacionados, permanecia desconhecido. Todas as fases de vida desta espécie de carrapato podem transmitir bactérias do gênero *Rickettsia*, inclusive aquelas pertencentes ao grupo da febre maculosa, uma das mais importantes doenças transmitidas por carrapatos que tem como vetor principal carrapatos do gênero *Amblyomma*. Objetivou-se relatar a ocorrência dos estágios de vida do carrapato *Amblyomma maculatum* sensu lato na Baixada Maranhense, seus hospedeiros e sua relação com *Rickettsia*. De outubro de 2017 a setembro de 2018 foram realizadas cinco campanhas no município de Bacurituba, Maranhão, localizado na Baixada Maranhense, com intervalo de três meses entre elas. Através de armadilhas e contenção manual, amostras de sangue e carrapatos foram coletadas de pequenos mamíferos silvestres não voadores e mamíferos domésticos, aves também foram capturadas e inspecionadas para pesquisa de infestação por carrapatos. As amostras de soro foram testadas para as seguintes espécies de *Rickettsia*: *Rickettsia rickettsii* cepa Taiaçu, *Rickettsia parkeri* cepa At24, *Rickettsia amblyommatis* cepa Ac37, *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ5 e *Rickettsia bellii* cepa Mogi, pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI). Arrastes de flanelas foram realizados em todas as campanhas. Cães, equinos, suínos e bovinos estavam parasitados por formas adultas de *A. maculatum* s. l. Aves da espécie *Ammodramus humeralis* apresentaram parasitismo por formas imaturas de *A. maculatum* s. l. Formas adultas e imaturas de *A. maculatum* s. l. foram coletadas por meio de arrastes durante quatro das cinco campanhas. Testes moleculares para detecção de *Rickettsia* em espécimes *A. maculatum* s. l. foram negativos. Cães, equinos, suínos e um roedor do gênero *Rattus* sororeagiram (título  $\geq 64$ ) para pelo menos uma espécie de *Rickettsia*, com títulos que variaram de 64 a  $\geq 4096$ . As amostras de búfalos e bovinos foram negativas. Esta pesquisa registra pela primeira vez a ocorrência de estágios adultos do carrapato *A. maculatum* s. l. em cães, suínos e bovinos, e formas imaturas em aves, aumentando assim o leque de hospedeiros deste carrapato na região, onde antes só havia relato de parasitismo em equinos.

**Palavras-chave:** parasitismos, aves silvestre, búfalos, bovinos.

## ABSTRACT

In 2013 it was reported for the first time in the State of Maranhão ticks of the *Amblyomma maculatum* complex, in the meso-region of Baixada Maranhense. Until then, the life cycle of these ectoparasites in the region, as well as the related hosts, remained unknown. All stages of life of this tick species can transmit bacteria of the genus *Rickettsia*, including those belonging to the spotted fever group (SFG), one of the most important diseases transmitted by ticks, that has as its main vector, ticks of the *Amblyomma* genus. The aim of this study was report the occurrence of the life stages of these ticks in Baixada Maranhense, its hosts and its relation with *Rickettsia*. The objective was to report the occurrence of life stages of *Amblyomma maculatum* sensu lato ticks in the Baixada Maranhense, its hosts and its relationship with *Rickettsia*. From October 2017 to September 2018 five campaigns were carried out in the municipality of Bacurituba, Maranhão state, located in the Baixada Maranhense, with an interval of three months between them. Through traps and manual containment, serum samples and ticks were collected from small non-flying wild mammals and domestic mammals; birds were trapped using mist nets and inspected for tick infestation research. The serum samples were tested for the following species of *Rickettsia*: *Rickettsia rickettsii* cepa Taiacu, *Rickettsia parkeri* cepa At24, *Rickettsia amblyommatis* cepa Ac37, *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ5 e *Rickettsia bellii* cepa Mogi, by indirect immunofluorescence assay (IFA). Durant all expeditions the dragging of flannels were performed. Dogs, horses, pigs and cattle were parasitized by adult forms of *A. maculatum* s. l. ticks. Birds of the species *Ammodramus humeralis* presented parasitism by immature forms of *A. maculatum* s. l. Adult and immature forms of *A. maculatum* s. l. were collected in four of the five campaigns. Molecular tests for detection of *Rickettsia* in specimens *A. maculatum* s. l. were negative. Dogs, horses, pigs and a rodent of the genus *Rattus sororeagiram* ( $\geq 64$ ) for at least one species of *Rickettsia*, with titers ranging from 64 to  $\geq 4096$ . Buff and buffalo samples were negative. This research records for the first time the occurrence of adult stages of the *A. maculatum* s. l. tick in dogs, pigs and cattle, and immature forms in birds, thus increasing the range of hosts of this tick in the region, where before there was only reported parasitism in horses.

**Keywords:** parasitism, wild bird, buffaloes, cattle.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Mapa da localização geográfica do município de Bacurituba no Estado do Maranhão. **25**
- Figura 2** - Campo de captura de pequenos mamíferos silvestres não voadores durante a primeira campanha (A). O mesmo campo da figura A, agora durante a terceira campanha (B). **26**

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Número absoluto de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum* nos arrastes de flanela, cães, equídeos, bovinos, suínos, aves e humanos durante as 5 campanhas no município de Bacurituba – Maranhão, Brasil. **35**

**Tabela 2** – Equídeos soropositivos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para diferentes cepas de *Rickettsia* spp. na cidade de Bacurituba na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. **38**

**Tabela 3** – Cães soropositivos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para diferentes cepas de *Rickettsia* spp. na cidade de Bacurituba na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. **39**

**Tabela 4** – Suínos soropositivos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para diferentes cepas de *Rickettsia* spp. na cidade de Bacurituba na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. **40**

**Tabela 5** – Lista de espécies de aves silvestres capturadas através de redes de neblina na cidade de São Bento, na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil. **55**

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1-</b> Lista dos primers utilizados nas reações da PCR para a identificação das riquétsias nos carrapatos.	<b>30</b>
--	-----------

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FM	Febre maculosa
FMB	Febre maculosa brasileira
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
GFM	Grupo da febre maculosa
GT	Isotiocianato de Guanidina
<i>gltA</i>	Citrate synthase gene
MI	Microlitros
mg/Kg	Miligramas por quilo
Mm	Milímetros
M	Metros
MA	Maranhão
<i>ompA</i>	Outer membrane protein A
rDNA	DNA Ribossomal
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
TBE	Tris-borato-EDTA
TE	Tris-EDTA
USP	Universidade de São Paulo
V/cm	Volts por centímetro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
2.1 GERAL.....	17
2.3 ESPECÍFICOS.....	17
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1 Os carrapatos ixodídeos.....	18
3.2 Complexo <i>Amblyomma maculatum</i> .....	20
3.3 O gênero <i>Rickettsia</i> .....	21
3.4 Febre maculosa brasileira (FMB).....	22
3.5 <i>Rickettsia parkeri</i> e o complexo <i>Amblyomma maculatum</i> .....	23
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
4.1 COMITÊ DE ÉTICA E LICENÇA SISBIO .....	24
4.2 ÁREA DE ESTUDO.....	24
4.3 COLETA DE AMOSTRAS.....	25
4.3.1 COLETA DE CARRAPATOS NO AMBIENTE.....	26
4.3.2 CAPTURA DE ANIMAIS, COLETA DE SANGUE E CARRAPATOS.....	26
4.4 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE CARRAPATOS .....	28
4.5 DETECÇÃO DE <i>Rickettsia</i> NOS CARRAPATOS.....	28
4.6 REAÇÃO DE IMUNOFLOUORESCÊNCIA INDIRETA.....	31
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
5.1 QUANTITATIVO DE ANIMAIS AMOSTRADOS E MATERIAL COLETADO	32
5.2 CARRAPATOS <i>Amblyomma maculatum</i> COLETADOS E DETECÇÃO DE <i>Rickettsia</i>	32

5.2.1 Mamíferos domésticos.....	32
5.2.2 Pequenos mamíferos silvestres não voadores.....	34
5.2.3 Carrapatos coletados no ambiente.....	34
5.2.4 Aves silvestres.....	35
5.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORÊNCENCIA INDIRETA (RIFI) PARA <i>Rickettsia</i> spp.	36
5.3.1 Mamíferos domésticos.....	36
5.3.2 Pequenos mamíferos silvestres não voadores.....	38
5.4 TESTE DE HEMOLINFA.....	41
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>42</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>43</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Maranhão é um estado da região Nordeste do Brasil com três grandes biomas – Amazônia, Cerrado e Caatinga, aparecendo no cenário nacional com uma grande diversidade animal e vegetal (AB´SABER 1977; DIAS et al., 2009). A microrregião da Baixada Maranhense situa-se na mesorregião Norte do estado e a Sudoeste da ilha de São Luís do Maranhão, constituindo um ecossistema complexo caracterizado por um período chuvoso, formando várias lagoas entre os meses de janeiro a junho e um período seco entre os meses de julho a dezembro. Esta região apresenta um potencial em diferentes áreas como pesca, pecuária, extrativismo vegetal, turismo e ecoturismo (ALMEIDA, 2013).

Para Sangioni (2003), designar as condições socioeconômicas da população, a distribuição e densidade dos vetores como transmissores de agentes patogênicos e os hospedeiros envolvidos são imprescindíveis para o conhecimento da epidemiologia das doenças. Diante disso, as atividades humanas no campo sobre a vegetação têm um importante papel no surgimento e expansão das riquettsioses, como observado pelo mesmo autor em área considerada não endêmica para FM em São Paulo. O reflorestamento feito com arbustos e a prática agrícola de monoculturas favorecem a proliferação de artrópodes devido à formação de microclimas favoráveis, os quais geram um excelente habitat, favorecendo a sobrevivência dos ixodídeos e mamíferos, hospedeiros dos estádios imaturos (CARDOSO, 2006).

Mudanças territoriais em espécies de carrapatos vem sendo apontadas e com elas despertando o interesse de conhecer a atuação destes ectoparasitas no novo ambiente (PADDOCK et. al, 2015; ALLERDICE et al., 2017), principalmente quando se trata de espécies que estão associadas com agentes patogênicos que ameaçam a saúde do seres humanos e animais. A inclusão de hospedeiros sentinelas, animais mais propensos a serem expostos a determinada espécie de carrapato, assim como métodos eficazes de captura de carrapatos no ambiente são essenciais para uma busca efetiva (GINSBERG; EWING, 1989; SCHULZE et al., 1997; HAMER et al., 2009; POLITO et al., 2013). O hospedeiro sentinela ideal vai variar de acordo com o estágio de vida e espécie de carrapato envolvida (ESSER et al., 2016).

Segundo Costa (2014), em especial na baixada maranhense, os animais domésticos que vivem nas áreas rurais estão frequentemente expostos a diferentes espécies de carrapatos. Esses animais têm contato direto com o ambiente silvestre, seus ectoparasitas e agentes a eles associados, tornando-se um elo entre este ambiente e o ambiente doméstico. Nas últimas décadas, as pesquisas em carrapatos de animais domésticos e silvestres têm aumentado devido as doenças emergentes e reemergentes transmitidas por eles, incluindo as riquettsioses, que algumas possuem natureza zoonótica.

Sabe-se que a incidência das riquetisioses nos seres humanos depende da ecologia e distribuição de carrapatos vetores (SANGIONI, 2003), assim torna-se imprescindível seu conhecimento, com objetivo de estabelecer normas e prevenir surtos. Estudos soroepidemiológicos têm demonstrado que anticorpos anti-*Rickettsia* estão presentes em cães e equinos no estado do Maranhão, tanto no bioma Amazônico quanto no Cerrado (COSTA, 2011; COSTA, 2014; COSTA et al., 2017a; AMORIM FILHO et al., 2018). Em 2013 houve o primeiro relato de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum*, isto é *Amblyoma maculatum* sensu lato (s.l.) em equinos, na Baixada Maranhense (COSTA et. al, 2013); carrapatos comumente relacionados com *Rickettsia parkeri* no continente Sul Americano (VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; TOMASSONE et al., 2010).

Desta forma, conhecer a ocorrência das fases de vida do carrapato *A. maculatum* s.l. na Baixada Maranhense e sua possível relação com bactérias do gênero *Rickettsia*, seria importante para subsidiar ações da Vigilância Epidemiológica frente a estes ectoparasitas e prevenir possíveis surtos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 GERAL**

- Descrever a ocorrência dos estágios de vida do carrapato *A. maculatum* s.l. e sua relação com a *Rickettsia* em diferentes hospedeiros na microrregião da Baixada Maranhense.

### **2.2 ESPECÍFICOS**

- Determinar a ocorrência do carrapato *A. maculatum* s.l. em pequenos mamíferos silvestres, mamíferos domésticos e aves silvestres, e na vegetação;
- Identificar a presença de anticorpo anti-*Rickettsia* no soro dos animais domésticos e silvestres;
- Detectar *Rickettsia* spp no carrapato *A. maculatum* s.l. coletado sobre hospedeiros, e de vida livre, na área de estudo.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. Os carrapatos Ixodídeos

Carrapatos são artrópodes ectoparasitas, membros da classe Arachnida, ordem Acari e subordem Ixodida (BARROS-BATTESTI, 2006a). Estão classificados em três famílias: Ixodidae, conhecidos como carrapatos duros, Argasidae, os carrapatos moles, e Nuttalliellidae, que contém uma única espécie, *Nuttalliella namaqua* (VIEIRA et al., 2004; MARTINS et al., 2012).

A família Ixodidae é considerada a maior e mais importante, com cerca de 80% da ixodofauna descrita no mundo; seguida pela Argasidae, que compreende 211 espécies. Pouco mais de 900 espécies de carrapatos já foram descritas em todo o mundo (GUGLIELMONE et al., 2010; TRAPE et al., 2013; BARROS-BATTESTI et al., 2015; MUÑOZ-LEAL et al., 2016), destas, 73 já relatadas no Brasil (LABRUNA et al., 2016; MICHAEL et al., 2017; MUÑOZ-LEAL, 2017; 2018).

Os ixodídeos estão distribuídos por praticamente todo o mundo e durante o ciclo biológico apresentam fases de vida parasitária e livre (ANDERSON, 2002; BARROS-BATESTI et al., 2006). Os estágios de desenvolvimento dos carrapatos incluem larva hexápode, ninfa octópode, e adultos machos e fêmeas octópodes, ambos com dimorfismo sexual (OLIVER, 1989; ANDERSON, 2002). A alimentação nos estágios pós-embrionários perdura por diversos dias (SONENSHINE, 1993; ANDERSON, 2002; BARROS-BATESTI et al., 2006) e as mudas ocorrem no ambiente pós desprendimento ativo da larva, ninfa, no caso de espécies heteroxenas (VIEIRA et al., 2004), e sob a pele do hospedeiro, em espécies monoxênicas (SUCEN, 2002). Há registros de parasitismo destes artrópodes em mamíferos (inclusive o homem), aves, répteis e anfíbios (KEIRANS; DURDEN, 2005).

Condições climáticas – como temperatura e umidade relativa – latitude, qualidade e manejo da forrageira que compõe a pastagem e presença de inimigos naturais, como insetos, sapos e aves, influenciam diretamente na duração do ciclo biológico dos carrapatos (VERÍSSIMO, 2013). A temperatura é comprovadamente um fator importante na regulação do tempo de duração de cada fase de desenvolvimento fora do hospedeiro (BARROS-BATESTI et al., 2006). Como exemplo podemos destacar que em locais de climas tropicais, como no Brasil, o tempo de uma geração dura em torno de 1 a 2 anos, embora nos climas mais frios esta possam durar até 6 anos (MARTINS et al., 2016). Em locais de clima frio, fêmeas ingurgitadas passam maior tempo a procura de um local apropriado para a deposição de ovos, sendo este um dos fatores que influenciam para que a duração do seu ciclo de vida seja maior, quando comparada a regiões de clima quente (BROVINI et al., 2003).

Apesar de não terem a capacidade de locomoção a longas distâncias, com formas imaturas limitando-se a poucos centímetros do local onde emergiram (DANIELS; FISH, 1990) e adultas de aproximadamente 2 a 10 metros (FALCO; FISH, 1991), os carrapatos podem ser transportados a longas distâncias por meio de seus hospedeiros, tendo a fauna silvestre um papel essencial na disseminação e adaptação deles em diversos tipos de ambientes (MAGALHAES, 1937; CLOUDSLEY-THOMPSON, 1980).

Mesmo em ambientes inóspitos, algumas espécies de carrapatos conseguem se adaptar por meio de um mecanismo conhecido por diapausa, onde estes artrópodes passam por modificações no comportamento que são desencadeadas por fatores ambientais que antecedem a chegada de condições inóspitas, e o adequam a enfrentá-las (BRADSHAW; HOLZAPFEL, 2007). No Brasil, a única espécie que realiza este fenômeno é o *Amblyomma sculptum*, sendo ele diferenciado por ter uma diapausa comportamental e não fisiológico, o que é um importante fator regulador no ciclo biológico dessa espécie (LABRUNA, 2003; CABRERA; LABRUNA, 2009a).

A família Ixodidae é dividida em doze gêneros, o gênero *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocoton*, *Cosmiomma*, *Dermacentur*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus* (BARKER; MURRELL, 2004). O primeiro é composto por 130 espécies, dentre as quais 32 já foram relatadas no Brasil e em sua maioria possuem importância para a Saúde Pública e animal por serem transmissoras de patógenos (BARROS-BATTESTI et al., 2006a; DANTAS-TORRES et al., 2009; LABRUNA; VENZAL, 2009a; NAVA et al., 2012; 2014; BARROS-BATTESTI et al., 2015; KRAWCZAK et al., 2015). No geral, carrapatos estão entre os vetores invertebrados que transmitem uma maior variedade de patógenos para os seres humanos e animais (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Após diversas discussões a respeito da confirmação de espécies em determinadas regiões geográficas, houve a necessidade de distribuir os carrapatos em complexos, com intuito de compreender os modos de especiação. O gênero *Amblyomma* possui dois complexos: *Amblyomma maculatum* e *Amblyomma cajennense*. Cada um deles é composto por espécies de carrapatos que compartilham de características similares. No Brasil, é registrado a ocorrência de duas espécies do complexo *A. cajennense*: o *Amblyomma cajennense* sensu stricto (s.s.) e o *Amblyomma sculptum* (MARTINS, 2014).

### 3.1 Complexo *Amblyomma maculatum*

O complexo *A. maculatum* é composto por três espécies de carrapatos: *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma tigrinum* e *Amblyomma triste*, morfologicamente similares entre si, o que

confunde sua distribuição nas Américas (ESTRADA-PEÑA et al., 2005; MERTINS, et al., 2010; ABARCA et al., 2012). As duas últimas vêm sendo relacionadas à América do Sul, embora o *A. triste* já tenha sido identificado em espécimes históricos no México; e o *A. maculatum*, ao Estados Unidos, América Central e alguns locais da Colômbia e Venezuela (EVANS et al., 2000; ESTRADA-PEÑA et al., 2005; GUZMÁN-CORNEJO et al., 2006).

Há registros de carrapatos do complexo *A. maculatum* em várias regiões do Brasil: *A. tigrinum* e *A. triste* nas regiões Centro-Oeste e Sudeste, distribuídos em alguns estados, e *A. maculatum* s.l. foi descrito pela primeira vez na região Nordeste, no estado do Maranhão, em 2013 (SZABÓ et al., 2003; SILVEIRA et al., 2007; MELO et al., 2015; SILVA et al., 2015; BARBIERI, 2016; COSTA et al., 2013). Em 2015 foi relatado pela primeira vez a espécie *A. maculatum* parasitando búfalos no Brasil (SILVA et al., 2015).

Com ciclo de vida trioxêno, estes carrapatos têm preferência por determinados hospedeiros de acordo com seu estágio de vida: as larva e ninfas, são relacionados com aves e pequenos mamíferos silvestres, enquanto as fases adultas parasitam uma variedade de hospedeiros, dependendo da espécie de carrapato envolvida, entre grandes mamíferos doméstico e silvestres (TEEL et al., 2010; DUELL et al., 2013; FLORIN et al., 2014). Esses carrapatos necessitam de três hospedeiros para completar seu ciclo de vida (ANDERSON, 2002).

Cavalos e suínos foram descritos como hospedeiros primários de *A. maculatum* na América do Norte, sendo considerados bons hospedeiros sentinelas para estágios adultos deste carrapato (FORRESTER et al., 1996; TEALL et al., 2010; HERTZ et al., 2017; MERRILL et al., 2018); enquanto que o *A. triste* no Brasil tem como hospedeiro primário o veado do pantanal (*Blastocerus dichotomus*), com relatos também em antas (*Tapirus* sp.), capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), cão doméstico, equinos e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tetractyla*) (LABRUNA et al., 2002a; SZABÓ et al., 2003; GUGLIELMONE et al., 2003, 2013; GUZMÁN-CORNEJO et al., 2006; VENZAL et al., 2008; MERTINS et al., 2010; BARBIERI, et al., 2018). Parasitismo em seres humanos foram relatados desde o início da década de 1940 por carrapatos pertencentes ao complexo *A. maculatum* (COOLEY; KOHLS, 1944), consideradas espécies agressivas para este hospedeiro e tendo o *A. triste* como principal espécie de carrapato que infesta humanos nos países do cone Sul (VENZAL et al., 2004; GUGLIELMONE et al., 2006).

O *A. maculatum* é ativo durante final do verão e início do outono, é normalmente encontrado em áreas de pastagens diretamente iluminadas pelo sol, com altos níveis de umidade e chuvas fortes (YODER et al., 2008; GLEIM et al., 2016). *A. triste* e *A. maculatum* têm sido relacionados com

zonas úmidas e propensas a inundações (SZABO et al., 2003; SZABO et al., 2007; VENZAL et al., 2008; NAVA et al., 2011); porém, estas espécies recentemente foram relatadas em uma região de clima semiárido, ambiente considerado atípico para estas espécies, considerando os relatos disponíveis na literatura (ALLERDICE et al., 2017). Paddock e Goddard (2015) defendiam que a distribuição geográfica de carrapatos não é fixa, podendo se expandir ou diminuir em intervalos de tempo relativamente curtos, o que pode acontecer devido a uma real mudança na “expansão territorial” do artrópode, ou pela descrição errônea de espécies similares. Segundo Dantas-Torres (2015), as mudanças climáticas poderiam interferir na ampliação territorial de algumas espécies.

Inicialmente conhecido apenas pelo prejuízo econômico causado em bovinos nos Estados Unidos, o *A. maculatum* foi posteriormente relacionado com diversos patógenos em outros locais do mundo (BURGDORFER et al., 1988; SPIELMAN et al., 1993; PADDOCK et al., 2007). Foi a primeira espécie na qual houve relato de *R. parkeri*, bactéria patogênica para os seres humanos (PARKER et al., 1939; PARKER, 1940). Atualmente sabe-se que os carrapatos que pertencem ao complexo *A. maculatum*, podem albergar esta bactéria, assim como transmiti-la para seres humanos (VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; NAVA et al., 2008; TOMASSONE et al., 2010; FLORES-MENDONZA et al., 2013).

As aves silvestres são hospedeiros importantes para a manutenção e dispersão de estágios imaturos de carrapatos do gênero *Amblyomma*, que é considerado o principal gênero parasitando aves no Brasil. Por meio da migração, as aves levam consigo carrapatos e agentes etiológicos a eles associados, onde podemos destacar as bactérias do gênero *Rickettsia* (OGRZEWALSKA et al., 2011a; LUZ; FACCINI, 2013; FLORIN et al., 2014).

### 3.2 Gênero *Rickettsia*

Riquetsias são cocobacilos, intracelulares obrigatórios, Gram-negativas, da ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae (RAOULT; ROUX, 1997; DUMLER, 2001). O gênero *Rickettsia* atualmente é composto por 27 espécies, dentre as quais 17 são capazes de infectar seres humanos (FANG et al., 2017). Elas estão classicamente divididas em grupos: o grupo tifo (GT), composto por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, associadas com os piolhos e pulgas, respectivamente. O grupo da febre maculosa (GFM) inclui mais de 25 espécies válidas, principalmente associadas a carrapatos, com exceção da *R. felis*, que é associada com pulgas (PAROLA et al., 2005; PAROLA, 2011; FANG; WALKER, 2017), grupo transicional (TRG), o grupo *Rickettsia canadense*, e o grupo *Rickettsia bellii* (WEINERT et al., 2009; PAROLA et al., 2013). Somente o GT e o GFM possuem espécies patogênicas.

Os carrapatos se infectam alimentando-se em animais com a bactéria circulante. Após contaminados, podem também infectar animais e o homem, sendo este último um hospedeiro acidental. Os carrapatos têm capacidade de propagar essas bactérias por transmissão transovariana e perpetuação transestadial (BURGDORFER; BRINTON, 1975; MCDADE; NEWHOUSE, 1986). Animais silvestres e domésticos já foram descritos como hospedeiros de *Rickettsia* sp. (MOREIRA; MAGALHÃES, 1937; LABRUNA, 2009b; JORGE et al., 2010). O cão e o cavalo são dois importantes hospedeiros domésticos, considerados hospedeiros sentinelas para *R. rickettsii* e *R. parkeri* (SANGIONI et al., 2005; POUBEL et al., 2018; LADO et al., 2015). Hospedeiros sentinelas são animais com maior susceptibilidade a um determinado patógeno e que, devido a isto, sua infecção serve de alerta para casos humanos ou em outros animais, de uma determinada doença, e é ainda utilizado como modelo para elaboração de um plano de medidas que visem eliminação ou controle da doença (VALADARES, 2015).

Como hospedeiros silvestres podemos destacar os pequenos e grandes roedores silvestres, como os ratos e as capivaras, respectivamente, com papel importante na manutenção destas bactérias, agindo como amplificadores por serem altamente prolíferos, serem abundantes em áreas endêmicas para a febre maculosa (FM), serem hospedeiros primários do carrapato vetor, serem susceptíveis à *Rickettsia* e desenvolverem riquetsemia por alguns dias (HORTA et al., 2009; LABRUNA, 2009).

### 3.3 Febre maculosa brasileira (FMB)

Bactérias do GFM são relatadas por todo o mundo e tem distribuição geográfica de acordo com seus vetores envolvidos (PAROLA, 2011). A gravidade dos sinais clínicos varia de acordo com a espécie envolvida, costumando ser inespecíficos e difíceis de diferenciar de febres causadas por outras bactérias e até por vírus (VALBUENA, 2015). A FM é uma doença febril aguda causada por riquetsias do GFM sendo a doença mais importante transmitida por carrapatos na América do Sul (HORTA et al., 2004; LABRUNA, 2009b). No Brasil, os carrapatos do gênero *Amblyomma* são os principais vetores envolvidos na transmissão destes patógenos (LEMOS, 2013).

A febre maculosa brasileira (FMB), é uma das mais importantes doenças transmitidas por carrapatos e tem como agente causador a *Rickettsia rickettsii* (PINTER; LABRUNA, 2006) levando o indivíduo acometido a sinais clínicos graves, incluindo casos fatais (PADDOCK, et al., 2016). Porém, *R. parkeri* sensu stricto e *R. parkeri* cepa Mata Atlântica também estão relacionadas com FM no Novo Mundo, levando a sintomatologias mais brandas, com febre, escara de inoculação e linfadenopatia (SPOLIDORO et al., 2010; KRAWCZAK et al., 2016; ROMER, et al., 2011; 2014).

Espécies de riquetsias isoladas no Brasil - *R. ritckettsi*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali* e *R. belli* - (LABRUNA et al., 2004c; LABRUNA et al., 2005a; PINTER; LABRUNA, 2006; SILVEIRA et al., 2007) vem sendo apontadas em inquéritos sorológicos em algumas espécies de animais, em vários estados do país. No Maranhão, estudos têm demonstrado que *R. amblyommatis*, *R. belli* ou uma cepa muito próxima a elas, estão circulando em animais domésticos (COSTA et al., 2015; AMORIM FILHO et al., 2018).

### 3.4 *Rickettsia parkeri* e o complexo *Amblyomma maculatum*

Em 1939, durante uma expedição nos Estados Unidos, Dr. R. R. Parker e colaboradores isolaram do carrapato *A. maculatum* uma espécie de *Rickettsia* do GFM, anteriormente desconhecida, no momento designada “agente maculatum”, de patogenicidade a ser melhor investigada (PARKER et al, 1939; PARKER, 1940). Anos depois foi designada como *R. parkeri*, e em 2004 confirmado sua patogenicidade para seres humanos (LACKMAN et al. 1965; PADDOCK et al., 2004), mesmo ano em que houve seu primeiro relato no continente Sul Americano, em *A. triste* no Uruguai (VENZAL et. al, 2004). Atualmente sabe-se que também os outros carrapatos pertencentes ao complexo *A. maculatum* são hospedeiros desta bactéria neste continente (VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; NAVA et al., 2008; TOMASSONE et al., 2010; FLORES-MENDONZA et al., 2013).

Nieri-Bastos et al (2013) relataram que para a manutenção de *R. parkeri* na natureza, parece ser essencial a presença de hospedeiros amplificadores, devido ao efeito deletério que a bactéria causou em ninfas ingurgitadas de *A. triste* em estudo laboratorial, o que causaria o seu desaparecimento na população de carrapatos a longo prazo. Há bastante tempo sabe-se que formas de larva, ninfa e adultos de carrapatos conseguiram transmitir algumas bactérias do gênero *Rickettsia* durante o repasto sanguíneo (COMER, 1991), mas somente em 2013 isto também foi comprovado em relação a *R. parkeri* (NIERI-BASTOS et al., 2013). A transmissão transovariana e transestadial desta espécie de *Rickettsia* também já foi descrita em carrapatos *A. triste* e *A. americanum* (GODDARD, 2003; NIERI-BASTOS et al., 2016).

Na América do Sul, *R. parkeri* já foi detectada em *A. maculatum* no Peru (FLORES-MENDOZA et al. 2013), em *A. triste* da Argentina, Brasil e Uruguai, e em carrapatos *A. tigrinum* da Argentina, Bolívia, e Uruguai, refletindo uma estreita associação entre esta espécie de *Rickettsia* e carrapatos do complexo *A. maculatum* neste continente (VENZAL et al. 2004; 2012; SILVEIRA et al. 2007; NAVA et al. 2008a; TOMASSONE et al. 2010; CICUTTIN; NAVA 2012; ROMER et al. 2014). Casos clínicos em seres humanos causados por *R. parkeri* já foram descritos na Argentina,

Uruguai e Brasil (CONTI-DÍAZ et al., 2009; SPOLIDORO et al., 2010; ROMER et al., 2011; PORTILLO et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2018).

Cepas filogeneticamente próximas a *R. parkeri* (*R. parkeri* cepa Mata Atlântica, *R. parkeri* cepa NOD, *R. parkeri* cepa Parvitasum) já foram detectadas em outras espécies de carrapatos na América do Sul: *Amblyomma ovale*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma parvitarsum* (OGRZEWALSKA et al., 2009b; SPOLIDORO et al., 2010; SZABÓ, et al., 2013; NIERI-BARROS et al., 2016; OGRZEWALSKA et al., 2016). Posteriormente foram descritas como linhagens Sul-americanas de *R. parkeri* e divididas em quatro clados: Clado A1, que é subdividido por cepas de *R. parkeri* (s.s.) relacionadas com *A. maculatum* da América do Norte, e aquelas relacionadas com *A. triste* da América do Sul; clado B com a cepa NOD, relacionada com *A. nodosum*; clado C com cepa parvitarsum, relacionada com *A. parvitarsum*; e o clado D cepa Mata Atlântica, relacionada com os carrapatos *A. ovale* e *A. aureolatum* (NIERI-BASTOS et al., 2018). *R. parkeri* e *R. parkeri* cepa Mata Atlântica são apontadas como causadoras de doença clínica em seres humanos no Brasil (SPOLIDORO et al., 2010; KRAWCZAK et al., 2016).

Levando em consideração as análises históricas e a diversidade de espécies de carrapatos em que a *R. parkeri* tem sido relatada na América do Sul, sugere-se que esta espécie de *Rickettsia* tenha se originado nesse continente e de lá se irradiado, por meio de carrapatos do gênero *Amblyomma*, para a América do Norte (BALASHOV, 1994; SMITH, 2010; BEATI et al., 2013; NIERI-BASTOS et al., 2018). No Novo Mundo, de acordo com relatos pré-existentes, pode-se inferir que *R. parkeri* s.s. foi primariamente associada com carrapatos do complexo *A. maculatum* e até o momento mantém-se esta relação (NIERI-BASTOS et al., 2018).

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 COMITÊ DE ÉTICA E LICENÇA DO SISBIO E SEMA**

Este trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Experimentação Animal da Universidade estadual do Maranhão sob número 29/2017, Licença SISBIO 596671 e Licença SEMA processo sob o número 49252/2018.

### **4.2 ÁREA DE ESTUDO**

O estado do Maranhão atualmente é dividido geopoliticamente em 217 municípios, distribuídos em cinco mesorregiões geográficas – Norte Maranhense, Leste Maranhense, Oeste Maranhense, Centro Maranhense e Sul Maranhense. O estado situa-se numa zona de transição dos climas semi-áridos do interior do Nordeste para os superúmidos equatoriais da Amazônia. A

Baixada Maranhense está localizada no extremo norte do estado e abrange 21 municípios, dentre eles o município de Bacurituba, onde ocorreu o primeiro relato no estado de carrapato pertencente ao complexo *A. maculatum* e, por isso, é nossa área de estudo (COSTA et al., 2013).

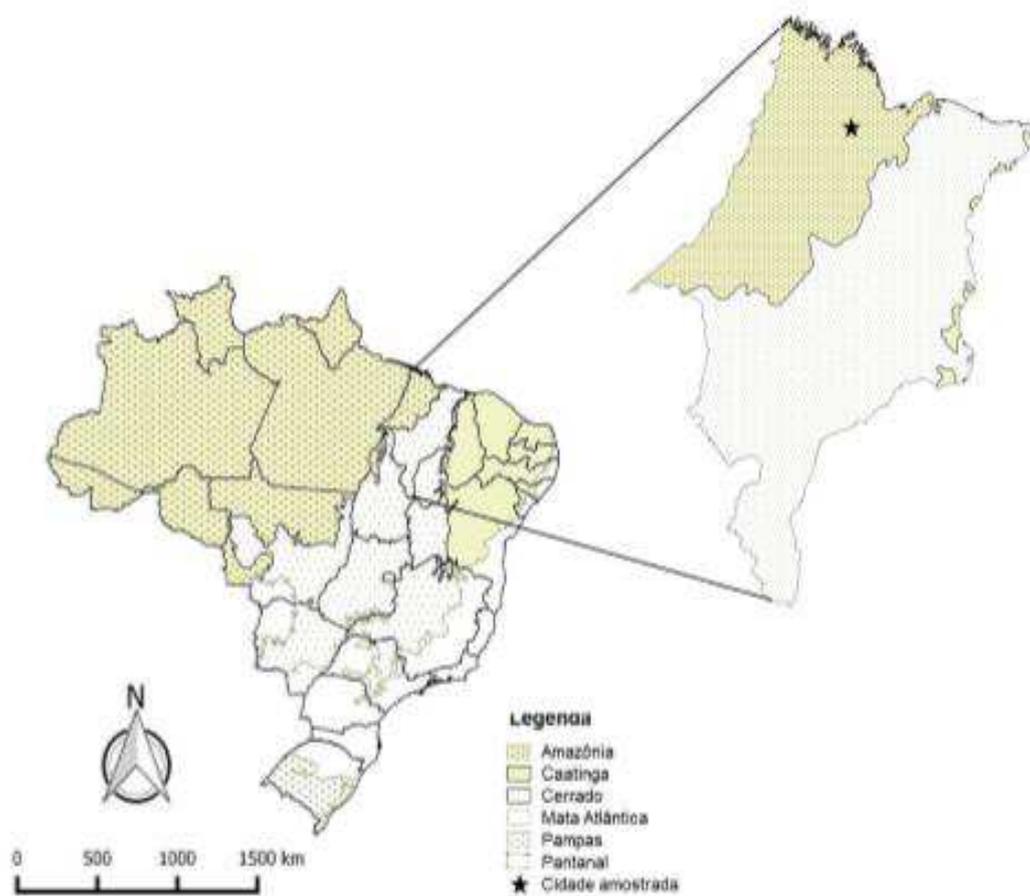


Figura 1 - Mapa da localização geográfica do município de Bacurituba do Estado do Maranhão

A Baixada Maranhense possui um ambiente caracterizado por condições climáticas úmidas e quentes, relevo plano, vasta rede hidrográfica e extensas planícies fluviais inundáveis. Todas essas características ambientais peculiares formam um complexo de ecossistemas composto por vegetação e fauna diversificada que assume importância social para a população local, que apesar de uma parcela expressiva viverem em centros urbanos do município, possuem fortes traços rurais (CONCEIÇÃO; MOREIRA; FARIAS FILHO, 2012; FILHO, 2013).

As áreas inundáveis, assim como os campos naturais da região, são ambientes ecologicamente complexos, integrados principalmente por lagos rasos que ocupam toda a extensão dos campos abertos, quando no transbordamento dos rios, por lagoas marginais e também por importantes

sistemas lacustres permanentes (PINHEIRO, 2003). A sua dinâmica natural envolve dois períodos distintos, um período chuvoso, que acontece de janeiro a junho, onde os rios perenes transbordam e inundam os campos, e um período de estiagem, que acontece de julho a dezembro, onde os campos ficam secos, favorecendo o aparecimento da vegetação, que é constituída principalmente de gramíneas e ciperáceas (COSTA NETO, 1990).



Figura 2 – Campo de captura de pequenos mamíferos silvestres não voadores durante a primeira campanha (A). O mesmo campo da figura A, agora durante a terceira campanha (B).

#### 4.3 COLETA DE AMOSTRAS

Foram realizadas cinco campanhas, com duração de cinco dias cada, e intervalo de aproximadamente três meses entre elas: a primeira em outubro de 2017, segunda em janeiro de 2018, terceira em abril de 2018, a quarta em julho de 2018 e a quinta em setembro de 2018 (figura 2). Durante as campanhas, mamíferos domésticos, pequenos mamíferos silvestres e aves foram amostrados para coleta de sangue e/ou de carrapatos do complexo *A. maculatum*. Também foram coletados carrapatos do ambiente.

##### 4.3.1 COLETA DE CARRAPATOS NO AMBIENTE

Carrapatos foram coletados do ambiente através de arraste de flanela, conforme previamente descrito por Terrassini et al. (2010). O arrastre foi realizado em área próxima ao local de captura de pequenos mamíferos silvestres, em um raio de aproximadamente 100 metros. Foram considerados os esforços de captura arrastando flanelas (01 metro de largura por 02 metros de comprimento) por dois investigadores, num período de 20 minutos cada. Todos os carrapatos imaturos (larvas e ninfas) foram conservados em etanol a 96%, e os adultos, sempre que possível, mantidos vivos até chegarem ao laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP para identificação e realização dos testes de hemolinfa nos espécimes vivos. Após o teste, as patas retiradas de cada carrapato foram utilizadas

para análise molecular e o restante congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$  para posterior tentativa de isolamento de *Rickettsia*.

Ocasionalmente, carrapatos que subiam nos pesquisadores durante o arraste de flanelas foram coletados de acordo com o que foi descrito acima, e neles também realizado testes para detecção de *Rickettsia*.

#### 4.3.2 CAPTURA DE ANIMAIS, COLETA DE SANGUE E DE CARRAPATOS

Durante as campanhas, todos os animais inclusos no estudo foram minuciosamente inspecionados quanto a presença de carrapatos. Os carrapatos *A. maculatum* s.l. foram coletados e mantidos vivos em uma estufa de  $\text{CO}_2$ , os adultos que morreram e as formas imaturas, foram armazenados em etanol a 96%. Todos os animais domésticos inclusos no trabalho viviam dentro, ou nos arredores dos campos onde foram colocadas as armadilhas para pequenos mamíferos silvestres e as redes de neblina. Esses animais foram coletados por conveniência.

#### PEQUENOS MAMÍFEROS SILVESTRES NÃO VOADORES

Para a captura dos pequenos mamíferos utilizou-se, por quatro noites consecutivas, 20 armadilhas do tipo livetrapp Tomahawk e 5 gaiolas do tipo Sherman's, colocadas a intervalos de 10-20m entre elas, devidamente identificadas com fitas de marcação enumeradas de 1 a 25. Utilizou-se como isca uma mistura de pasta de amendoim, aveia, sardinha e banana, conforme previamente descrito por SZABÓ et al. (2013). As armadilhas foram inspecionadas todos os dias às 06:30 da manhã, aquelas com animais capturados eram retiradas e levadas juntamente com o animal para o local onde realizava-se a coleta de amostras. Às 17:00hs da tarde do mesmo dia – com excessão do dia cinco – todas as armadilhas rearmadas e as iscas repostas.

Os animais capturados foram anestesiados com quetamina (50mg/Kg) e xilazina (20mg/Kg), por via intra-muscular para a coleta de sangue e inspeção visual para coleta de carrapatos. Os animais foram fotografados e realizada a mensuração das seguintes estruturas: comprimento total, comprimento da cauda, pé com garra, pé sem garra, comprimento da orelha e peso total. A ficha de identificação segue no ANEXO 1.

Devido a mudança climática e consequente alagamento de certos pontos do campo de coleta, o local de disposição das armadilhas foi alterado conforme a necessidade, em alguns momentos sendo necessário utilizar-se de canoas para acessá-lo. Essas alterações não ultrapassaram os limites pré-estabelecidos, desta foma não comprometendo o objetivo principal da pesquisa.

## ANIMAIS DOMÉSTICOS

O quantitativo de animais domésticos inclusos no trabalho foi por conveniência. Amostras de sangue foram colhidas de cães, equinos, búfalos, bovinos e suínos, após contenção manual ou com uso de cordas. Foi realizado a venopunção das veias jugular ou cefálica, de acordo com a espécie animal e necessidade, o sangue coletado em tubos de 3ml sem EDTA (Ácido etileno-diamino-tetracético) com intuito de haver separação do plasma e soro. Logo após a coleta, o sangue era centrifugado, o soro armazenado em microtubos e congelado. O transporte foi realizado em caixa de isopor com gelo até o Laboratório de Paraitologia do Prédio dos Laboratórios Multiusuários da Pós-Graduação (LAMP) da Universidade Estadual do Maranhão, onde fora armazenado para posteriores testes. Todos os animais foram inspecionados e os carrapatos coletados quando observada a infestação.

## AVES SILVESTRES

Foram escolhidas dentro do raio de 20 metros de proximidade do campo de coleta de pequenos mamíferos silvestres para a disposição das redes de captura das aves. Utilizou-se 10 redes de neblina de 2,5m x 12m, com malha de 36 mm. Durante cada campanha a captura foi realizada por um dia e meio. As redes foram abertas nos horários de pico de atividade das aves, das 06:00h da manhã e fechadas 17:00, no primeiro dia, e no segundo foram fechadas ao meio dia. Para o cálculo de esforço de captura foi usado como referência Roos (2010) onde:  $E = (\text{área da rede}) \times (\text{tempo de exposição}) \times (\text{número de redes})$ . As vistorias das redes armadas foram feitas a cada uma hora. As aves foram identificadas utilizando-se o Guia de Campo Avis Brasillis – Avifauna Brasileira e, quando possível, determinado o sexo. Inspeção visual foi realizada para a coleta de espécies de carrapatos.

### 4.4 IDENTIFICAÇÃO TAXONÔMICA DOS CARRAPATOS

A confirmação da identificação morfológica dos carrapatos coletados foi realizada, no caso de ninfas e adultos, segundo Martins et al. (2010) e Barros-Battesti et al. (2006a), respectivamente. Os estágios de larva, foram identificados por métodos moleculares, através de extração de DNA e reação em cadeia pela polimerase (PCR) para um fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA segundo Mangold et al. (1998). Os produtos da PCR foram sequenciados em sequenciador automático (AppliedBiosystems/PerkinElmer, Foster City, CA), conforme instruções do fabricante e as sequências obtidas foram comparadas com sequências de carrapatos disponíveis no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)) para identificação da espécie. Uma amostra de carrapatos de cada espécie foi depositada na Coleção Nacional de Carrapatos “Danilo Gonçalves Saraiva” (CNC) do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde

Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), da Universidade de São Paulo e outra na Coleção de Ixodídeos e Argásídeos do Nordeste CIANE, do Laboratório de Parasitologia do Prédio dos Laboratórios Multiusuários da Pós-Graduação (LAMP) da Universidade Estadual do Maranhão.

#### 4.5 DETECÇÃO DE *Rickettsia* NOS CARRAPATOS

##### TESTE DE HEMOLINFA

O teste de hemolinfa foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias FMVZ-USP em todos os carrapatos mantidos vivos como forma de triagem, com o objetivo de identificar organismos morfológicamente compatíveis com bactérias do gênero *Rickettsia* nos hemócitos (BURGDORFER, 1970). Para cada carrapato, a porção distal de uma das patas dianteiras foi cortada com tesoura e uma a duas gotas de hemolinfa foram colhidas em lâminas de vidro de 12 poços, previamente limpas e desengorduradas, sendo um poço para cada carrapato. Após este procedimento, os carrapatos foram acondicionados individualmente em microtubos de 1,5ml e mantidos congelados a -80°C para posterior tentativa de isolamento de *Rickettsia* sp. As lâminas foram fixadas à temperatura ambiente, coradas com corantes fucsina e verde malaquita através do método de Gimenez (1964) e examinadas ao microscópio óptico com aumento de 1000x com óleo de imersão.

As patas retiradas de cada carrapato foram armezanadas em microtubos e utilizadas para testes moleculares, igualmente todos os carrapatos conservados em etanol a 96%.

##### EXTRAÇÃO DO DNA

Os carrapatos mantidos em etanol a 96% foram descongelados e secados em temperatura ambiente. Nas patas provenientes dos carrapatos que foram submetidos ao teste de hemolinfa também foi realizado a extração de DNA. A extração de DNA ambas as amostras foram realizadas de acordo com o protocolo Isotiocianato de Guanidina (GT) previamente modificado (CHOMEZYNSKI, 1993). Neste caso, cada amostra foi colocada em um microtubo contendo 150 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7,4) e triturado com ponteira queimada, após sofrer pequenos furos através de uma agulha estéril. Em caso de fases imaturas, estas foram separadas em “pols” e assim processadas. Em seguida, foram homogeneizados no vortex por 10 segundos e centrifugado por 6 segundos. Foi então adicionado 450 µL de GT e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente homogeneizando brevemente no vortex a cada dois minutos. Posteriormente, 100 µL de clorofórmio foram acrescentados, fazendo a inversão deste por algumas vezes e deixando descansar por dois minutos. O microtubo foi então centrifugado a 12.000 g por

cinco minutos para separar a fase aquosa, a qual foi pipetada e transferida para outro microtubo previamente identificado. Serão incorporados à fase aquosa 600 µL de isopropanol com posterior incubação a -20°C de duas a 18 horas. Na etapa seguinte, o microtubo foi centrifugado a 12.000 g a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante descartado e adicionará-se 800 µL de etanol a 70%. Novamente o microtubo foi centrifugado a 12.000 g por cinco minutos a 4°C, o sobrenadante foi desprezado e o pellet no microtubo ficando aberto até a secagemse, a 56°C por 15 minutos no termobloco. O pellet foi ressuspensionado em TE, de 60 µL de acordo com a necessidade, sendo incubado novamente, porém com o microtubo fechado, a 56°C por 15 minutos no termobloco. O microtubo contendo DNA foi armazenado a -20°C até sua utilização na PCR.

### REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE

A presença de riquetsia nos carrapatos foi avaliada individualmente através da amplificação de um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de *Rickettsia*.

O gene da proteína externa de membrana 190-kDa (*ompA*), presente apenas nas *Rickettsias* do grupo da febre maculosa, foi utilizado para a confirmação do agente nas amostras positivas na primeira reação, empregando-se oligonucleotídeos iniciadores Rr190.70 e Rr190.602 que amplificam fragmentos de aproximadamente 532pb e/ou 632pb, respectivamente (REGNERY et al., 1991; ROUX et al., 1996; FOURNIER et al., 1998). Para cada reação foram utilizados controles negativos (água MilliQ livre de DNA) e positivos (DNA de *Rickettsia vini*). Os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) estão representados no quadro 1.

Quadro 1. Lista dos primers utilizados nas reações da PCR para a identificação das riquetsias nos carrapatos.

Gene alvo e pares de primers	Especificidade	Sequência de primers (5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>gltA</i> CS-78 CS- 323	Gênero <i>Rickettsia</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401	Labruna et al., 2004a
<i>ompA</i> Rr 190.70 Rr 190.602	Grupo da febre maculosa	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	532	Regnery et al., 1996
<i>ompA</i> Rr 190.70 Rr 190.701	Grupo da febre maculosa	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	632	Roux et al., 2000

\*Exceto algumas espécies dos grupos basais (Ex. *R. bellii*).

A reação de amplificação para o gene *gltA* foi realizada em microtubos de 200µL adicionando 2,5µL de DNA extraído acrescido de 22,5µL de Mix (12,6µL de água de miliqui; 4µL de Buffer [200mM Tris pH 8.4, 500 mM Kcl, Invitrogen®]; 2,5µL de dNTP [Invitrogen®]; 1,25µL de cada primer; 0,75µL de Cloreto de Magnésio [50 mM, Invitrogen®]; e 0,15µL de Taq polimerase [Invitrogen®]), para um volume total de 25µL de solução. O protocolo térmico utilizado para o gene *gltA*, realizado em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®), foi o seguinte: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 40 segundos 45 à 72°C, e 7 minutos à 72°C. A reação de amplificação para o gene *ompA* foi realizada em microtubos de 200µL adicionando 2,5µL de DNA extraído acrescido de 22,5µL de Mix (10,85µL de água de miliqui; 2,5µL de Buffer [200mM Tris pH 8.4, 500 mM Kcl, Invitrogen®]; 5µL de dNTP [Invitrogen®]; 1,5µL de cada primer; 0,75µL de Cloreto de Magnésio [50 mM, Invitrogen®]; e 0,15µL de Taq polimerase [Invitrogen®]), para um volume total de 25µL de solução. Para o gene *ompA* foi realizado o seguinte protocolo térmico: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 40 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 45 segundos à 72°C, com extensão final por 10 minutos à 72°C.

## ELETROFORESE

Os produtos da reação de PCR foram visualizados com aparelho de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (100 ml TBE 0,5%; 2,0g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™), em cuba horizontal e tampão TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA pH 8,0) submetida à voltagem de 1 a 10 V/cm durante 30 minutos. A revelação foi feita com Syber Safe de acordo com as especificações do fabricante e a visualização das bandas em transiluminador ultravioleta.

## 4.6 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Os soros de todos os pequenos mamíferos silvestres e animais domésticos capturados foram descongelados em temperatura ambiente no momento da realização do teste e processados pela reação de imunofluorescência indireta – RIFI, usando lâminas de antígeno produzidas no laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP para cinco riquetsias isoladas no Brasil: *R. rickettsii* cepa Taiacu (PINTER; LABRUNA, 2006), *R. parkeri* cepa At24 (SILVEIRA et al., 2007), *R. amblyommatis* cepa Ac37 (LABRUNA et al., 2004c), *R. rhipicephali* cepa HJ5 (LABRUNA et al., 2005a) e *R. bellii* cepa Mogi (PINTER; LABRUNA, 2006), seguindo protocolo previamente descrito por Horta et al. (2004). Em cada lâmina, soros conhecidamente negativos e positivos foram utilizados como controles, de acordo com a espécie de hospedeiro a ser testada. Os soros reativos

na diluição 1:64 para qualquer espécie de riquetsia foram testados em diluições seriadas (1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048...) para determinação do título final de reatividade. Os soros que demonstraram para uma determinada espécie de riquetsia um título quatro vezes maior que para as demais espécies testadas, foram considerados homólogos para a primeira espécie de riquetsia, conforme padrões previamente definidos (HORTA et al. 2004).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 QUANTITATIVO DE ANIMAIS AMOSTRADOS E MATERIAL COLETADO

Foram coletadas amostras sanguíneas de vinte e seis cães domiciliados e semi-domiciliados, que tinham acesso aos campos e alguns utilizados para caça; vinte e um equídeos, sendo vinte “cavalos baixadeiros”, que são abundantes na região, e um asinino, ambos criados em sistema extensivo e utilizados para trabalho no campo; quinze suínos; vinte e cinco búfalos; e dez bovinos, ambos criados em sistema extensivo. Os animais domésticos da região vivem em contato direto com o ambiente silvestre devido ao seu sistema de criação, desta forma, são expostos a ectoparasitas comumente encontrados no meio silvestre, conseqüentemente carreando-os, assim como seus agentes associados, para o ambiente doméstico, agindo como ponte entre os dois ambientes.

Pequenos mamíferos silvestres não voadores também foram coletados, um total de trinta e dois do gênero *Holochilus* e um roedor peridomicílio do gênero *Rattus*, que foi capturado próximo a uma residência, apontando-os também como um elo para o ambiente silvestre. Não foi possível a identificação dos roedores a nível de espécie devido a ausência de dados como características pontuais da pelagem e mensuração de crânio. Em todos os animais foi realizada inspeção visual para a pesquisa de carrapatos *A. maculatum* s.l.

Setenta e uma aves foram capturadas, identificadas e inspecionadas para a presença de carrapatos, sendo elas de desesseis espécies diferentes, oito famílias e quatro ordens (Anexo 2). A espécie *Columbia passerina* teve maior número de espécimes capturadas, um total de trinta e três, seguida de *Sturnella militares*, com vinte e quatro espécimes.

### 5.2 CARRAPATOS *Amblyomma maculatum* COLETADOS E DETECÇÃO DE *Rickettsia*

#### 5.2.1 Mamíferos domésticos

Obteve-se um total de trinta e oito carrapatos adultos coletados em equinos durante a terceira, quarta e quinta campanha. Em nenhum foi detectado a presença de *Rickettsia* spp. Equinos são apontados como hospedeiros sentinelas de carrapatos *A. triste* no Uruguai e na América do Norte (VENZAL et al., 2003a; HERTZ et al., 2017), no Brasil são considerados hospedeiros primários de

outros carrapatos, como o *A. cajennense* s.l. (LABRUNA, et al., 2002c). Recentemente, um estudo realizado no Parque Nacional Grande Sertão Veredas no norte do estado de Minas Gerais encontrou-se cavalos infestados por *A. triste* (BARBIERI et al., 2018). Na América do Sul, até o momento, não há relatos de equinos parasitados por *A. maculatum* s.s.

Em relação ao parasitismo em cães, foram coletados cinco machos de *A. maculatum* s.l. e uma ninfa do gênero *Amblyomma*. A ninfa posteriormente foi identificada como *Amblyomma cajenense* e, por isso, retirada do estudo. Cães são hospedeiros primários para carrapatos *A. triste* em países da América do Sul (NAVA et al., 2011; LADO et al., 2015), com relatos de parasitismo natural no Brasil (MELO et al., 2015; BARBIERI et al., 2018). Os cinco carrapatos coletados não apresentaram *Rickettsia* spp.

Utilizou-se rebanhos de búfalos de onde foram escolhidos de forma aleatória vinte e cinco animais para inspeção visual e coleta de amostras, nenhum estava parasitado por carrapatos *A. maculatum* s.l. Isso pode ter acontecido devido à resistência que esses animais têm a ectoparasitas e ao hábito de estarem constantemente dentro da água, pois são criados em sistema extensivo em locais e áreas alagadiças. Parasitismo por *A. maculatum* já foi relatado em búfalos no Brasil (SILVA et al., 2015), porém, até o momento, não há relatos no estado do Maranhão.

De um rebanho bovino escolheu-se de forma aleatória dez animais para serem inspecionados e realizado a coleta de amostras sanguíneas, três estavam parasitados por adultos de *A. maculatum*, sendo três fêmeas e dois machos. Todos os carrapatos coletados foram negativos na análise molecular quanto a presença de *Rickettsia* spp. Bovinos já foram relatos como bons hospedeiros de estágios adultos do carrapato *A. maculatum* s.l. em países da América do Sul, como Uruguai e Argentina (VENZAL et al., 2003a; NAVA et al., 2011; MONJE et al., 2016), porém este é o primeiro relato de *A. maculatum* s.l. parasitando bovinos no Brasil.

Fez-se inspeção visual de duas pocilgas, uma com aproximadamente trezentos animais. Os suínos foram escolhidos de forma aleatória, cinco estavam parasitados com carrapatos *A. maculatum* s.l., sendo oito fêmeas e quatro machos. Suínos domésticos e selvagens são considerados bons hospedeiros de estágios adultos de *A. maculatum* na América do Norte e para *A. triste* no Brasil (LABRUNA et al., 2002b; TEALL et al., 2010; MERRILL et al., 2018;), porém até o momento não há relatos de parasitismo desta espécie animal por *A. maculatum* s.s neste país. Nenhum dos carrapatos foi positivo na análise molecular para a presença de *Rickettsia* spp.

Aqui apresentamos o primeiro relato de carrapato *A. maculatum* s.l. em suínos, cães e bovinos no estado do Maranhão, desta forma, ampliamos o número de hospedeiros das formas adultas deste ectoparasita no estado, onde antes só havia relato de parasitismos em equínos (COSTA et al., 2013), assim como o primeiro relato de parasitismo em bovinos no Brasil.

Devido a proximidade morfológica entre as espécies *A. maculatum* e *A. triste*, a diferenciação entre elas é desafiadora mesmo na fase adulta, sendo ainda mais difícil para fases imaturas (ESTRADA-PENÃ et al., 2005; MERTINS et al., 2010; GUGLIELMONE et al., 2013), alguns autores sugerem inclusive a ocorrência de uma coespeciação (LADO et al., 2018). No presente estudo não foi possível determinar de qual espécie se tratava os carrapatos coletados, sendo assim designados como *A. maculatum* s.l. Uma espécime deste carrapato foi analisada em estudo prévio quanto ao gene mitocondrial 16S, demonstrando similaridade de 98,5% com *A. maculatum* dos EUA, 98,2% com *A. triste* do Chile e 97,6% com o *A. triste* do Sudeste/Centro-Oeste brasileiro. Morfológicamente, possui maior semelhança com o *A. triste* presente no Pantanal brasileiro.

Estudos com cruzamento precisam ser realizados para sabermos de qual espécie se trata o carrapato alvo do presente estudo.

### 5.2.2 Pequenos mamíferos silvestres não voadores

Na inspeção visual não foi observado formas adultas ou imaturas de carrapatos *A. maculatum* s.l. em nenhum dos animais capturados. Pequenos roedores silvestres são considerados hospedeiros comuns para formas imaturas de carrapatos do complexo *A. maculatum* (VENZAL et al., 2001; VENZAL et al., 2003c;), porém, no período em que foram capturados no presente estudo, não foi observado parasitismos. É importante ressaltar que não houve sucesso na captura destes na quarta e quinta campanha, o que pode ter subestimado nossa amostragem, não sendo possível descartar esta espécie como hospedeiro para fases imaturas na região.

### 5.2.3 Carrapatos coletados no ambiente

Arrastes foram realizados em todas as campanhas. Na primeira e terceira campanha nenhum carrapato *A. maculatum* s.l. foi coletado. Porém, na segunda, duas fêmeas e um macho, em arraste realizado aos arredores do retiro dos porcos; na quarta, um macho e uma fêmea de *A. maculatum* s.l., e quatro larvas foram coletadas no arraste realizado na área onde os equinos infestados pastavam; na quinta, três machos e uma fêmea de *A. maculatum* s.l., quatro ninfas e trinta e seis larvas de *Amblyomma* foram coletadas. Posteriormente as ninfas foram identificadas como *A. maculatum* s.l., por meio de chaves de identificação, e as larvas como *Amblyomma* sp. A dinâmica

sazonal não foi possível de ser realizada devido ao baixo número de carrapatos coletados durante as campanhas quanto nas áreas de pastejo dos equinos como nos suínos.

Durante o arraste de flanelas na primeira e quinta campanha, foram capturados dois carrapatos adultos (um macho e uma fêmea, repectivamente) em um de nossos pesquisadores: o primeiro estava fixo no flanco direito e o segundo sobre a pele, na região do antebraço. Todos os carrapatos coletados no arraste de flanelas e sobre os pesquisadores foram negativos para *Rickettsia* spp.

Carrapatos *A. maculatum* s.l. são conhecidamente agressivos para seres humanos, podendo transmitir a eles bactérias patogênicas, e outras de patogenicidade desconhecida (VENZAL et al., 2003a; VENZAL et al., 2004; PACHECO et al., 2006; NAVA et al., 2008), fato que nos serve de alerta, visto que moradores relatam que é comum o parasitismo de pessoas que lidam diretamente com animais nos campos, abrindo a possibilidade de pesquisar agentes patogênicos nestes carrapatos que podem ser um risco para os seres humanos na região. É importante descartar que outros agentes patogênicos para seres humanos também já foram relatados em carrapatos *A. maculatum*, como *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* (LEE et al., 2014; LOFTIS et al., 2016; ALLERDICE et al., 2016).

Este é o primeiro relato de *A. maculatum* s.l capturado em condições naturais fixado em ser humano no Brasil.

Tabela 1 – Número absoluto de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum* nos arrastes de flanela, cães, equídeos, bovinos, suínos, aves e humanos durante as 5 campanhas no município de Bacurituba – Maranhão, Brasil.

Campanha	Arraste				Cães			Equídeos			Bovinos	Suínos		Aves	Humano	
	1°	2°	4°	5°	3°	4°	5°	3°	4°	5°	5°	2°	3°	5°	1°	5°
<b>Estágios Carrapato</b>																
Machos	0	1	1	3	4	1	0	0	10	3	2	2	2	0	1	0
Fêmeas	0	2	1	1	0	0	1	2	8	15	2	6	2	0	0	1
Ninfas	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6	0	0
Larvas	0	0	4	36	0	0	0	0	0	0	0	0	0	15	0	0
<b>Total</b>	<b>53</b>				<b>7</b>			<b>38</b>			<b>4</b>	<b>12</b>		<b>21</b>	<b>2</b>	

#### 5.2.4 Aves silvestres

Durante a quinta campanha foram capturadas treze aves, em três espécimes de *Ammodramus humeralis* coletou-se vinte e uma larvas do gênero *Amblyomma*. Seis larvas mudaram para ninfa e foram identificadas como *A. maculatum* s.l. As quinze larvas que não mudaram foram identificadas como *Amblyomma* sp., porém, por se tratarem de carrapatos do mesmo “pool”, sugere-se que

também sejam *A. maculatum* s.l. *A. humeralis* tem o hábito de andar no solo, sob a vegetação, o que provavelmente facilita seu parasitismo por estágios imaturos de carrapato.

A literatura científica tem reportado as aves como hospedeiros comuns das fases imaturas de carrapatos do gênero *Amblyomma* (OGRZEWALSKA et al., 2008; OGRZEWALSKA et al., 2009a; OGRZEWALSKA et al., 2010; OGRZEWALSKA et al., 2011a; FLORIN et al., 2014). Há registro de aves parasitadas por *A. maculatum* s.l. no Brasil no estado de São Paulo (SILVEIRA et al., 2015) e no estado de Mato Grosso (RAMOS et al., 2015); *A. maculatum* foi relatado em aves na Costa Rica (OGRZEWALSKA et al., 2015). Aqui descrevemos pela primeira vez parasitismo em aves por formas imaturas de *A. maculatum* s.l. no estado do Maranhão, demonstrando que *A. humeralis* é hospedeira no ciclo de vida deste ectoparasita no estado. Todos os carrapatos coletados destes hospedeiros foram negativos para pesquisa de *Rickettsia*.

### 5.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORÊNCENCIA INDIRETA (RIFI) PARA *Rickettsia* spp.

#### 5.3.1 Mamíferos domésticos

Dos vinte e um soros dos equídeos analisados, 23,8% (cinco) não apresentaram anticorpos anti-*Rickettsia* para nenhuma das cinco espécies testadas, enquanto que 76,2% (dezesseis) apresentaram reatividade (título  $\geq 64$ ) para pelo menos uma espécie, com título  $\geq 1024$  (Tabela 1), inclusive para aquelas pertencentes ao GFM. Em seis animais foi possível determinar *R. bellii*, ou uma cepa muito próxima, como provável antígeno; nas outras dez amostras isso não foi possível, pois nenhuma apresentou título com valor quatro vezes maior que as demais que também foram reativas. Os maiores títulos e também maior quantidade de animais sororeativos foram observados para as espécies *R. bellii*, seguida de *R. amblyommatis*.

Um animal (EQUI-11) apresentou titulação igual para *R. bellii* e *R. parkeri* ( $\geq 1024$ ), não sendo possível apontar provável antígeno homólogo. Porém, não se descarta a possibilidade de infecção mista, visto que ambos apresentaram titulação alta. *R. parkeri* é uma espécie de rickettsia com patogenicidade moderada para seres humanos e tem sido frequentemente relacionada com carrapatos *A. maculatum* s.l. (VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; NAVA et al., 2008; TOMASSONE et al., 2010; FLORES-MENDONZA et al., 2013). Foi relatada por Silveira et al. (2015) em equinos da cidade de Paulicéia, São Paulo, onde os autores sugeriram que os animais que pastavam em áreas alagadas tinham 4,8% mais chance de sororegirem para *Rickettsias* do GFM. Equinos com sorologia positiva para *R. parkeri* também foram relatados no pantanal brasileiro (MELO et al., 2015). A região da Baixada Maranhense apresenta ao longo do ano áreas alagadas,

criando um ambiente similar ao dos estudos anteriormente citados, associado ao percentual relativamente alto de animais positivos para *Rickettsia*, poderia corroborar com a teoria dos autores.

Em um estudo recente na região da Baixada Maranhense de Amorim-Filho et al. (2018), utilizando cavalos baixadeiros, testaram 258 amostras e mais da metade (152 animais) sororegiram para pelo menos uma das espécies de *Rickettsia* spp., demonstrando provável antígeno homólogo para *R. bellii* e *R. amblyommatis*. Esta última vem sendo citada com frequência em inquéritos sorológicos na região, sua alta taxa de infecção pode ser explicada devido a presença de carrapatos *A. cajennense* s.s., o que também foi observado em estudos anteriores (COSTA, 2011; COSTA et al., 2015; COSTA et al., 2017a; AMORIM-FILHO et al., 2018). No entanto, na área pesquisada não foram encontrados com frequência carrapatados *A. cajennense* s.s.

Entretanto, um estudo de Ortiz, (2017) em Piracicaba, soros de vinte e um equinos foram testados quanto a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. e um animal sororeagiu para *R. bellii*, ou uma espécie muito próxima a ela como provável antígeno. A divergência entre o quantitativo de animais soropositivos no presente estudo e na pesquisa acima citada deve estar relacionada com o sistema de criação, pois nesta os animais são utilizados para equoterapia e receberam controle parasitário e suporte técnico, divergindo dos equídeos da Baixada Maranhense que estão frequentemente expostos aos carrapatos do gênero *Amblyomma* na área estudada.

Embora equinos sejam importantes na epidemiologia da FM por serem sensíveis à *R. rickettsii*, apresentando anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*, não são considerados amplificadores significativos para esta bactéria, pois apesar de desenvolverem uma boa resposta humoral, transmitem a bactéria a um número mínimo de carrapatos e estes não sendo capazes de manter a infecção para os próximos estágios evolutivos e, conseqüentemente, transmití-la a um hospedeiro susceptível (UENO, 2014).

Tabela 2 – Equídeos soropositivos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para diferentes cepas de *Rickettsia* spp. na cidade de Bacurituba na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.

AMOSTRA	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommatis</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. bellii</i>	PAH
EQUI-01	NR	NR	NR	NR	128	ND
EQUI-02	NR	NR	NR	NR	512	<i>R. bellii</i>
EQUI-03	NR	NR	128	NR	256	ND
EQUI-04	NR	NR	NR	NR	512	<i>R. bellii</i>
EQUI-06	NR	256	128	64	512	ND
EQUI-07	NR	64	1024	128	512	ND
EQUI-10	NR	NR	NR	NR	256	<i>R. bellii</i>
EQUI-11	64	1024	512	128	1024	ND
EQUI-12	64	64	256	128	256	ND
EQUI-13	128	64	256	NR	128	ND
EQUI-14	NR	NR	128	NR	512	<i>R. bellii</i>
EQUI-16	NR	NR	NR	NR	256	<i>R. bellii</i>
EQUI-18	64	NR	NR	NR	64	ND
EQUI-20	NR	NR	128	NR	256	ND
EQUI-21	NR	NR	NR	NR	128	ND

PAH: provável antígeno homólogo; NR: soro não reagente; ND: não determinado

Dos vinte e seis cães amostrados, 26,9% (sete) sororeagiram para *R. bellii*, com títulos variando de 64 a 512 (Tabela 2), 73,1% (dezenove) não reagiram para nenhuma das espécies testadas. Considerou-se que em quatro destes animais, *R. bellii* ou uma espécie muito próxima a ela, esteja estimulando o sistema imune. Há evidências sorológicas de *R. bellii* circulando em cães nos estados do Paraná (FORTES et al., 2010) Mato Grosso (MELO et al., 2011), Pará (SPOLIDORIO et al., 2013) e Maranhão (COSTA, et al., 2017b). No Uruguai, cães são apontados como hospedeiros sentinelas em área com casos clínicos humanos de infecção por *R. parkeri* associada com carrapato do complexo *A. maculatum* (LADO et al., 2015).

Tabela 3 – Cães soropositivos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para diferentes cepas de *Rickettsia* spp. na cidade de Bacurituba na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.

AMOSTRAS	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommatis</i>	<i>R. rhiphicephali</i>	<i>R. bellii</i>	PAH
CAM-C1	NR	NR	NR	NR	256	<i>R. bellii</i>
CAM-C8	NR	NR	NR	NR	256	<i>R. bellii</i>
CAM-C9	NR	NR	NR	NR	64	ND
CAM-C10	NR	NR	NR	NR	512	<i>R. bellii</i>
CAM-C12	NR	NR	NR	NR	256	<i>R. bellii</i>
CAM-C14	NR	NR	NR	NR	128	ND
CAM-C26	NR	NR	NR	NR	128	ND

PAH: provável antígeno homólogo; NR: soro não reagente; ND: não determinado

Coletou-se material sanguíneo de dez porcos, 100% foram soropositivos para *R. bellii*, com títulos variando de 64 a 4096 (Tabela 3). Considera-se *R. bellii* como provável antígeno homólogo, ou uma espécie muito próxima a ela. Em estudo realizado no estado de Mato Grosso do Sul, os autores também obtiveram altas taxas de soropositividade para *Rickettsia* spp. (dentre elas *R. bellii*), com percentual variando de 55,2% a 100%, de acordo com o tipo de criação do animal. Animais criados em sistema de criação semelhante ao do presente estudo, o sistema extensivo, tiveram 89,7% de soropositividade para *Rickettsia* spp. (OSAVA, 2016). Sorologia positiva para *Borrelia*, *Erlichia* e *Rickettsia* também foi observada em suínos selvagens no Texas, alguns com parasitismo por carrapatos *A. maculatum* (SANDERS, 2011), o que nos impulsiona a pesquisar esses agentes também na região da Baixada Maranhense, visto que há presença deste carrapato na região.

A inclusão de porcos selvagens, ou aqueles domésticos que vivem em contato com ambientes silvestre, na vigilância de doenças pode fornecer dados importantes, pois além de serem hospedeiros comuns de carrapatos transmissores de patógenos, albergam agentes de doenças que podem ser transmitidas para seres humanos e animais, como aqueles da brucelose e pseudo-raiva, como já relatado na literatura científica (MENG et al., 2009; MILLER et al., 2017; MERRILL et al., 2018).

Tabela 4 – Suínos soropositivos na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para diferentes cepas de *Rickettsia* spp. na cidade de Bacurituba na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.

AMOSTRAS	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommatis</i>	<i>R. rhiphicephali</i>	<i>R. bellii</i>	PAH
CAM-P1	64	NR	NR	NR	4096	<i>R. bellii</i>
CAM-P2	NR	NR	NR	NR	1024	<i>R. bellii</i>
CAM-P3	NR	NR	NR	NR	512	<i>R. bellii</i>
CAM-P4	NR	NR	NR	NR	512	<i>R. bellii</i>
CAM-P5	NR	NR	NR	NR	512	<i>R. bellii</i>
CAM-P6	NR	NR	NR	NR	1024	<i>R. bellii</i>
CAM-P7	NR	NR	NR	NR	4096	<i>R. bellii</i>
CAM-P8	NR	NR	NR	NR	256	<i>R. bellii</i>
CAM-P9	NR	NR	NR	NR	256	<i>R. bellii</i>
CAM-P10	NR	NR	NR	NR	64	ND

PAH: provável antígeno homólogo; NR: soro não reagente; ND: não determinado

A soropositividade encontrada nos animais domésticos sugere a circulação de *Rickettsia*, inclusive de espécies pertencentes ao GFM, pelo menos nos últimos 6 a 18 meses na área estudada (PIRANDA et al., 2008). *R. bellii* foi a espécie que apresentou maior reatividade frente a todos os animais domésticos testados, um total de 42,1 % (trinta e dois) de animais positivos, seguida de *R. amblyommatis* com 10,5 % (oito), ambos com títulos finais variados.

*R. bellii* vem sendo apontada em inquéritos sorológicos pelo país (COSTA et al., 2017a; AMORIM-FILHO et al., 2018; VIEIRA et al., 2018) e é considerada a mais comum espécie de *Rickettsia* encontrada em carrapatos nos quais já foi detectada em vinte e cinco espécies diferentes (LABRUNA et al., 2007b; LABRUNA et. al, 2011; COSTA et al., 2017b). Apesar de não ter patogenicidade comprovada em animais e seres humanos e, até o momento, não haver indícios sorológicos de infecção neste ultimo, destaca-se a importância da presença *R. bellii*, pois, quando infectando carrapatos, não permite que o mesmo transmita para seus descendentes uma outra espécie patogênica (BURGDORFER, 1988). Vinte e cinco amostras de búfalos e dez amostras de bovinos

foram coletadas para análise sorológica, nenhuma teve sorologia positiva para qualquer uma das cinco espécies de *Rickettsia* spp. testadas.

### 5.3.2 Pequenos roedores silvestres não voadores

Nenhum dos espécimens *Holochillus* sororeagiu para qualquer uma das espécies de *Rickettsia* spp. testadas, e o animal do gênero *Rattus* foi reagente para *R. rhiphicephali* (título  $\geq 256$ ) e *R. bellii* (título  $\geq 128$ ). Não foi possível identificar o provável antígeno, pois nenhuma das reações foi quatro vezes maior em relação aos outros antígenos testados. O papel dos roedores sinantrópicos na transmissão de doenças merece atenção nos estudos devido ao seu hábito intradomiciliar que permite um contato mais estreito com o homem, possibilitando a transmissão de doenças a ele (BONVICINO et al., 2008). Em estudos anteriores, roedores do gênero *Rattus* foram apontados com altas taxas de soropositividade para *Rickettsia* (PENA et al., 2009; PADILHA, 2010).

Roedores silvestres vêm sendo frequentemente utilizados em inquéritos sorológicos por se apresentarem como importantes reservatórios de patógenos que infectam animais e seres humanos (DANTAS-TORRES et al., 2012; MILAGRES et al., 2013). São considerados bons hospedeiros amplificadores de riquetisia, pois compreendem os cinco requisitos propostos por Labruna (2006): são abundantes nas áreas endêmicas para a FM; são hospedeiros primários para o carrapato vetor; são susceptíveis à *R. rickettsii*; desenvolvem riquetsemia por alguns dias e são altamente prolíferos.

## 5.4 TESTE DE HEMOLINFA

Nos carrapatos mantidos vivos, total de vinte e dois foi realizado o teste de hemolinfa, contudo não foram observadas estruturas compatíveis com *Rickettsia*.

Este teste é utilizado rotineiramente em pesquisas com *Rickettsia* em carrapatos por ser rápido e com baixo custo como forma de triagem para testes com maior sensibilidade e especificidade, como exemplo a PCR.

## 6. CONCLUSÕES

- Não houve detecção de *Rickettsia* nos carrapatos coletados.
- Cães, equinos, suínos e bovinos são hospedeiros dos estágios adultos do carrapato *A. maculatum* s.l. na Baixada Maranhense
  - Registra-se o primeiro relato de carrapatos adultos *A. maculatum* parasitando suínos, cães e bovinos na Baixada Maranhense.
  - Não foi observado formas adultas ou imaturas de carrapatos *A. maculatum* s.l. em pequenos roedores silvestres não voadores e búfalos, no período de execução do estudo.
  - Aves silvestres da espécie *Ammodramus humeralis* são hospedeiros dos estágios imaturos de carrapatos *A. maculatum* s.l. na Baixada Maranhense.
  - *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommatis*, ou uma espécie muito próxima a elas, estão circulando nos animais domésticos na Baixada Maranhense.

## REFERÊNCIAS

- AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. **Geomorfologia**, v. 52, p. 1-21, 1997.
- ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; LEPE, P.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne *Rickettsia* in Chile. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 219-222, 2012.
- ALMEIDA, Z. S. **Sumário Executivo para plano de ação na área de proteção ambiental da baixada maranhense**. (Org.) São Luís: Editora, 2013.
- ALLERDICE, M. E. J.; HECHT, J. A.; KARPATY, S. E.; PADDOCK C. D. Evaluation of Gulf Coast Ticks (Acari: Ixodidae) for *Ehrlichia* and *Anaplasma* Species. **Journal of Medical Entomology**, p.481–484, v.54, n.2, 2017.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- AMORIM FILHO, E.F.; COSTA, F. B.; MORAES-FILHO, J.; SANTOS, A.C. G.; VALE, T. L.; COSTA, A. P.; SILVA, A. B.; LABRUNA, M. B.; NOGUEIRA, R. M. S. Exposure of Baixadeiro horses to *Rickettsia* spp. and to ticks infected by *Rickettsia amblyommatis* in the Baixada Maranhense micro-region, Maranhão, Brazil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.48, n. 09, 2018.
- ANDERSON, J.F. The natural history of ticks. **Medical Clinics of North America**, v.86, p. 204-218, 2002.
- BURGDORFER W.; BRINTON, L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. **Ann NY Acad Sci**. 1975.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/, Butantan, 223 p., 2006a.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; LANDULFO, G.A.; LUZ, H.R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V.C., FAMADAS, K.M. *Ornithodoros facciii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae), **Brazilian Parasitology Vectors**, v. 8, p. 268, 2015.
- BARBIERI, A. R. M. Ecologia de carrapatos e riquetsias transmitidas por carrapatos em uma reserva natural de cerrado brasileiro. **Tese** (Doutorado em Ciências) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde animal, Universidade de São Paulo, São Paulo, f 103, 2016.
- BARBIERI, A.R.M.; SZABÓ, M. P.J.; COSTA F. B. ; MARTINS T. F.; SOARES H. S.; PASCOLI, G.; TORGA, K.; SARAIVA D. G.; RAMOS V. N.; OSAVA, C.; GERARDI M.; DIAS R. A.; MORAES, E. A. J.; FERREIRA F.; CASTRO M. B.; LABRUNA, M. B. Species richness and seasonal dynamics of ticks with notes on rickettsial infection in a Natural Park of the Cerrado biome in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v10, n 2, p 442-457, 2018.
- BRADSHAW, W. E.; HOLZAPFEL, C. M. Evolution of animal photoperiodism. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 38, p. 1-25, 2007.
- BARKER, S. C.; MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitology**, v. 129, n. 7, p. 15–36, 2004.
- BRASIL Casos Confirmados de Febre Maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2015, 2015.
- BALASHOV Y. S. Importance of continental drift in the distribution and evolution of ixodid ticks. **Entomology Reviel**, v. 73, p. 42–50, 1994.
- BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D.; LABRUNA, M.B.; GUGLIELMONE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C.; LÉON, R.; DURDEN, A. L. FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajenense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p.267, 2013.
- BROVINI, C.N.; FURLONG, J.; CHAGAS, A.C. Influência dos fatores climáticos na biologia e no comportamento de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* a campo. **Bioscience Journal**, v.19, n.1, p.71-76, 2003.
- BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. **Série de manuais técnicos**. Rio de Janeiro, 2008.

- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D. H. *Biology of rickettsial diseases*. Boca Raton: CRC, v. 1, p. 33-50, 1988.
- CABRERA, R. R.; LABRUNA, M. B. Influence of photoperiod and temperature on the larval behavioral diapause of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 46, p. 1303-1309, 2009a.
- CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V.; FIGUEIRA, F. C.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silente peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil [in Portuguese]. **Cadernos Saude Pública**, v.22, n. 3, p. 495–501, 2006.
- CIRCUITIN, G.; NAVA, S. Molecular identification of *Rickettsia parkeri* infecting *Amblyomma triste* ticks in an área of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, p. 314–318, 2012.
- COMER, M. K. **Rocky montain spotted fever**. **Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p. 27-44, 1991.
- CONTI-DÍAZ, I.A.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M.B. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as the etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. **Revista do Instituto Medicina Tropical de São Paulo** v. 51, p. 337-339, 2009.
- COSTA, A. P. Aspectos epidemiológicos de *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Rickettsia* spp. em cães de ambiente urbano e rural da mesorregião do leste maranhense, microrregião de Chapadinha-MA, Brasil. **Dissertação**. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2011.
- COSTA, F. B.; COSTA, A. P.; MARTINS, F. F.; GUERRA, R. M. S. N. C.; LABRUNA, M. B. Presença de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum* no Estado do Maranhão. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 4., 2013, Bento Gonçalves. **Anais...** Rio Grande do Sul: Infobibos, 2013.
- COSTA, F. B. Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do Estado do Maranhão. 2014. 115p. **Tese** (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.
- COSTA, ANDRÉA PEREIRA DA ; COSTA, FRANCISCO BORGES ; Labruna, Marcelo Bahia ; SILVEIRA, IARA ; MORAES-FILHO, J.; SOARES, J. F. ; SPOLIDORIO, M. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, p. 28-35, 2015.
- COSTA, F. B.; COSTA, A. P. ; MORAES-FILHO, J. ;MARTINS, T. F. ; SOARES, H. S.; RAMIREZ, D. G. ; DIAS, R. A. ; LABRUNA, M. B. *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks and exposure of domestic dogs to *Rickettsia* spp. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. **PLoS One**, v. 12, p. e0179163-17, 2017a.
- COSTA, F. B.; BARBIERI A. R. M.; SZABÓ M. P. J.; RAMOS, V. N.; PIOVEZAN; U.; LABRUNA M. B. New records of *Rickettsia bellii*-infected ticks in Brazil Braz. J. Vet. **Researt Animals. Science**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 92-95, 2017b.
- CHOMEKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 153, n. 3, p. 532-537, 1993.
- DANIELS, T.J.; FISH, D. Spatial distribution and dispersal of unfed larval *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) in southern New York. **Environmental Entomology**, v.19, p. 1029-1033, 1990.
- DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 14, p. 30-46, 2009.
- DANTAS-TORRES, F.; ALÉSSIO, F. M.; SIQUEIRA, D. B.; MAUFFREY, J. F.; MARVULO, M. F. V.; MARTINS, T. F.; MORAES-FILHO, J.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; LABRUNA, M. B.; SILVA, J. C. R. Exposure of small mammals to ticks and rickettsiae in Atlantic Forest patches in the metropolitan area of Recife, North-eastern Brazil. **Parasitology**, v. 139, p. 83-91, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. **International Journal for Parasitology**, p. 1-10, 2015.

DIAS, P. A. D.; SANTOS, C. L. C.; RODRIGUES, F. S.; ROSA, L. C.; LOBATO, K. S.; REBÊLO, J. M. M. Espécies de moscas ectoparasitas (Diptera, Hippoboscoidea) de morcegos (Mammalia, Chiroptera) no Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 1, p. 128-133, 2009.

DUMLER, J.S. et al. Reorganization of gene in families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* with neorickettsia, description of six new species combinations and designations. **International Journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 2001, p. 2145–2165, 2001.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; CAFRONE, M.M.; GUGLIELMONE, A.A. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae: Amblyomminae) tick group: diagnostic characters, description of the larva of *Amblyomma parvitarsum* Neumann, 1901, 16S rDNA sequences, distribution and hosts. **Systematic Parasitology** v 60, p. 99–112, 2005.

ESSER, H.J.; FOLEY, J.E.; BONGERS, F.; HERRE, E.A.; MILLER, M.J.; PRINS, H.H.; JANSEN, P.A. Host body size and the diversity of tick assemblages on Neotropical vertebrates. **International Journal Parasitology: Parasites and Wildlife**. v. 5, p. 295–304, 2016.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

FALCO, R. C.; FISH, D. Horizontal movement of adult *Ixodes dammini* (Acari: Ixodidae) attracted to CO<sub>2</sub>- baited traps. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, p. 726-729, 1991.

FANG R, BLANTON LS, WALKER DH. Rickettsiae as emerging infectious agents. **Clinics in Laboratory Medicine**. v. 37, n.2, p. 383–400, 2017.

FLORES-MENDONZA, C.; FLORIN, D.; FELICES, V.; POZO, E.J.; GRAF, P.C.; BURRUS, R.G.; RICHARDS, A.L. Detection of *Rickettsia parkeri* from within Piura, Peru, and the first reported presence of *Candidatus 'Rickettsia andeanae'* in the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.13, p. 505-508, 2013.

FLORIN D.A.; BRINKERHOFF R.J.; GAFF H.; JIANG, J.; ROBBINS, R.G.; EICKMEYER, W.; BUTLER, J.; NIELSEN, D.; WRIGHT, C.; WHITE, E.; GIMPEL, M.E.; RICHARDS, A.L. Additional collections of the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) from the State of Delaware, the first reported field collections of adult specimens from the State of Maryland, and data regarding the tick species from surveillance of migratory song birds in Maryland. **Syst Appl Acarol**. v.19, p.257–262, 2014.

FORTES, F. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE, R. V.; BONACIM, J. E.; BIONDO, A. W.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 19, n. 4, p. 222-227, 2010.

FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of the spotted fever rickettsiae by study of the outer surface protein rOmpA. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 839-849, 1998.

GINSBERG, H.S., EWING, C.P. Comparison of flagging, walking, trapping, and collecting from hosts as sampling methods for northern deer ticks, *Ixodes dammini*, and lone-star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari, Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**. v. 7, p. 313–322, 1989.

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

GLEIM, E.R., GARRISON, L.E., VELLO, M.S., SAVAGE, M.Y., LOPEZ, G., BERGHAUS, R.D., YABSLEY, M.J. Factors associated with tick bites and pathogen prevalence in ticks parasitizing humans in Georgia, USA. **Parasites Vectors**. v. 9, p.125, 2016.

GODDARD, J. Experimental Infection of Lones Star Ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and Exposure of Guinea Pigs to the Agent Experimental Infection of Lone Star Ticks, *Amblyomma americanum* (L.) with *Rickettsia parkeri* and Exposure of Guin. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 686-689, 2003.

- 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* Kock, 1844: hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273-288, 2003.
- GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S. VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, p. 83–100, 2006.
- GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.A.; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G.; SHAO, R.; BARKER, S.C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa** v. 2528, p. 1–28, 2010.
- GUZMÁN-CORNEJO, C.; PERÉZ, T.M.; NAVA, S. et al. First records of the ticks *Amblyomma calcaratum* and *A. pacae* (Acari: Ixodidae) parasitizing mammals of Mexico. **Rev. Mex. Biodiversit.**, v.77, p.123-127, 2006.
- HERTZ, J.C., FERREE CLEMONS, B.C., LORD, C.C., ALLAN, S.A., KAUFMAN, P.E. Distribution and host associations of ixodid ticks collected from wildlife in Florida, USA. **Exp. Appl. Acarol.** v.73, p. 223–236, 2017.
- HORTA, M. C.; LABRUNA, M.B.; SANGIONI, L. A. , VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a brasilian spotted fever – endemic area in the state of São Paulo, Brasil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 93-97, 2004.
- HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWALSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, Larchmont, v. 9, n. 1, p. 109-118, 2009.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The Global Importance of Ticks. **Parasitology**, v.129, p. S3-S14, 2004.
- JORGE, R. S. P.; ROCHA, F. L.; JÚNIOR, J. A. M.; MORATO, R. G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e Saúde Pública. **Oecologia Australis**, v. 14, n. 3, p. 686-710, 2010
- KEIRANS, J.E.; DURDEN, L.A. Tick systematics and identification. In: Goodman JL, Dennis DT, Sonenshine DE (eds), **Tick-borne diseases of humans**, ASM Press, p. 123-140, 2005.
- KRAWCZAK, F.S., MARTINS, T.F., OLIVEIRA, C.S., BINDER, L.C., COSTA, F.B., NUNES, P.H., GREGORI, F., LABRUNA, M.B. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in Southern Brazil. **Journal Medical Entomology**, v. 52, p. 28–37, 2015.
- KRAWCZAK FS, MUÑOZ-LEAL S, GUZTZAZKY AC, OLIVEIRA SV, SANTOS FC, ANGERAMI RN, MORAES-FILHO J, DE SOUZA JC, JR, LABRUNA MB. *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest infection in a patient from a spotted fever endemic area in southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 95, p. 551–553, 2016.
- LADO, P.; NAVA, S.; MENDOZA-URIBE, L.; CACERES, A. G.; MORA, J. D.; LICONA-ENRIQUEZ, J. D.; MORA, D. D.; LABRUNA M. B.; DURDEN L. A. 10, ALLERDICE, M. E. J.; PADDOCK, C. D.; SZABÓ, M. P. J.; VENZAL, J. M.; GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) group of ticks: phenotypic plasticity or incipient speciation? **Parasites & Vectors**. v. 11, p. 610, 2018.
- LADO, P.; COSTA, F. B.; VERDES, J. M.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. Seroepidemiological survey of *Rickettsia* spp. in dogs from the endemic area of *Rickettsia parkeri* rickettsiosis in Uruguay. **Acta Tropical**, v. 146, p. 7-10, 2015.
- LABRUNA, M.B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A.R.; NUNES, P.H.; HORTA, M.C.; VENZAL, J.M. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites Vectors**, v. 9 p. 5-11, 2016.

LABRUNA, M.B.; AMAKU, M.; METZNER, J. A.; PINTER, A.; FERREIRA, F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajenense* (Acari: Ixodidae) in southeast Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, p. 170-178, 2003a.

LABRUNA, M. B.; PAULA, CATIA DEJUSTE DE ; LIMA, THIAGO FERRAZ ; SANA, DENIS A . Ticks (Acari: Ixodidae) on Wild Animals from the Porto-Primavera *Hydroelectric* Power Station Area, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Brasil, v. 97, n.8, p. 1133-1136, 2002a.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, Luís Marcelo Aranha ; SCHUMAKER, Terezinha Tizu S ; CAMARGO, Erney Plessmann . Notes of the parasitism by *Amblyomma* ticks on domestic swine (*Sus scrofa*) in a farm at Monte Negro, Western Amazon, **Brazil. Journal of Medical Entomology**, USA, v. 39, n.1, p. 241-243, 2002b.

LABRUNA, M. B.; PINTER, Adriano ; CASTRO, M. B. ; CASTAGNOLLI, K. C. ; GARCIA, M. V. ; SZABÓ, Matias Juan Pablo . Some recordson host quest behavior of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Brasil, v. 11, n.2, p. 91-93, 2002.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; BOUYER, D. H.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Molecular Evidence for a Spotted Fever Group *Rickettsia* species in the Tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 533-537, 2004a.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004c.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 2006, Viçosa-MG. **ANAIS...**, p. 63-78, 2006.

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

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009b.

LACKMAN, D. B.; BELL, E. J.; STOENNER, H. G.; PICKENS, E. G. The Rocky Mountain spotted fever group rickettsias. **Health Laboratory Science**, v. 2, p. 135141, 1965.

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

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from ticks *Haemaphysalis juxtakochi* in the state of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869-873, 2007b.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; ALMEIDA, A. P.; PINTER, A. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 829-834, 2011b.

LEMOS, E.R.S. Rickettsioses. In: Coura JR, organizador. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. São Paulo: **Guanabara Koogan**; p. 1626-45, 2013.

LEE, S.; KAKUMANU, M. L.; PONNUSAMY, L.; VAUGHN, M.; FUNKHOUSER, S.; THORNTON, H.; MESHNICK, S. R.; APPERSON, C. S. Prevalence of Rickettsiales in ticks removed from the skin of outdoor workers in North Carolina. **Parasites Vectors** v.7, p. 607, 2014.

LOFTIS, A. D.; KELLY P. J.; PADDOCK, C. D.; BLOUNT, K.; JOHNSON, J. W.; GLEIM, E. R.; YABSLEY, M. J.; LEVIN, M. L.; BEATI, L. Panola Mountain *Ehrlichia* in *Amblyomma maculatum* from the United States and *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) from the Caribbean and Africa. **Journal Medicals Entomoly**. 53(3): 696–698, 2016.

MAGALHÃES, O. Tifo Exatemático de Minas Gerais. Transmissão pelo carrapato americano e outras moléstias. **Brasil Médico**, v. 51, n. 334, p. 871-873, 1937.

MARTINS, T. F.; MOURA, M. M.; LABRUNA, M. B. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 56, p. 151-158, 2012.

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

MARTINS, T. F. Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil. **Tese (Doutorado)** - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, f.113, 2014.

MARTINS, THIAGO F.; BARBIERI, AMÁLIA R. M. ; COSTA, FRANCISCO B. ; TERASSINI, FLÁVIO A. ; CAMARGO, LUÍS M. A. ; PETERKA, CÁSSIO R. L. ; DE C. PACHECO, RICHARD ; DIAS, RICARDO A. ; NUNES, PABLO H. ; MARCILI, ARLEI ; SCOFIELD, ALESSANDRA ; CAMPOS, ARTUR K. ; HORTA, MAURICIO C. ; GUILLOUX, ALINE G. A. ; BENATTI, HECTOR R. ; RAMIREZ, DIEGO G. ; BARROS-BATTESTI, DARCI M. ; LABRUNA, MARCELO B. . Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 186, 2016.

MARANHÃO. Atlas do Maranhão. Gerência de planejamento e desenvolvimento econômico/laboratório de geoprocessamento - UEMA. São Luís: **GEPLAN**, p. 44, 2002.

MERTINS, J. W.; MOORHOUSE, A. S.; ALFRED, J. T.; HUTCHESON, H. J. *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae): new North American collection records, including the first from the United States. **Journal of Medical Entomology**, 47, 536–542. 2010.

MERRILL, M. M.; RAOUL K. B., LORD, C. C.; SAYLE, K. A.; WIGHT, B.; ANDERSON, W.M.; WISEL S. M. Wild pigs as sentinels for hard ticks: A case study from south-central Florida. **IJP: Parasites and Wildlife**, v. 7, p. 161–170, 2018.

MENG, X.J.; LINDSAY, D.S.; SRIRANGANATHAN, N. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. **Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci**, v. 364, p. 2697–2707, 2009.

MILLER, R.S.; SWEENEY, S.J.; SLOOTMAKER, C.; GREAR, D.A.; DI SALVO, P.A.; KISER, D.; SHWIFF, S.A. Cross-species transmission potential between wild pigs, livestock, poultry, wildlife, and humans: implications for disease risk management in North America. **Science Rep.** v. 7, 2017.

MELO, A. L. T.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases, Lippertsdorf**, v. 2, n. 4, p. 213-218, 2011.

MELO, A. L.T.; ALVES, A. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARTINS, T. F.; WITTER, R.; PACHECO, T. A.; SOARES, H. S.; MARCILI, A. CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C., LABRUNA, M. B.; DANIEL AGUIAR, M. *Rickettsia parkeri* infecting free-living *Amblyomma triste* ticks in the Brazilian Pantanal. **Ticks and Tick-borne Diseases** 6, 237–241. 2015.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil Médico**, v. 51, n. 21, p. 20-21, 1937.

MCDADE JE, NEWHOUSE VF. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annu Rev Microbiol**, v. 40, n.1, p.287-309, 1986.

MONJE, L. D.; COSTA, F. B.; COLOMBO, V. C.; LABRUNA, M. B.; ANTONIAZZI, L. R.; GAMIETEA, I.; NAVA, S.; BELDOMENICO, P. M. Dynamics of Exposure to *Rickettsia parkeri* in Cattle in the Paraná River Delta, Argentina. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 3, p. 660–665, 2016.

MICHEL, T.; SOUZA, U.; DALL'AGNOL B.; WEBSTER A.; PETERS, F.; CHRISTOFF, A.; LUZA A.L.; KASPER, N.; BECKER, M.; FIORENTIN, G.; KLAFKE G.; VENZAL, J.; MARTINS, J.R.; JARDIM, M.M.A.; OTT, R.; RECK, J. *Ixodes* spp. (Acari: Ixodidae) ticks in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Syst Appl Acarol**, v. 22, p. 2057–2067, 2017.

- MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; MONTANDON, C. E.; FREITAS, R. N.; PACHECO, R.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M. Spotted Fever Group Rickettsia in Small Rodents from Areas of Low Endemicity for Brazilian Spotted Fever in the Eastern Region of Minas Gerais State, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 88, n. 5, p. 937-939, 2013.
- MUÑOZ-LEAL, S., VENZAL, J.M., GONZÁLEZ-ACUÑA, D., NAVA, S., LOPES, M.G., MARTINS, T.F., FIGUEROA, C., FERNÁNDEZ, N., LABRUNA, M.B. A new species of *Ornithodoros* (Acari: Argasidae) from desert areas of northern Chile. **Ticks Tick-Borne Diseases**. v.7, p. 901–910, 2016.
- MUÑOZ-LEAL S.; TOLEDO, L.F.; VENZAL, J.M.; MARCILI, A.; MARTINS, T.F.; ACOSTA I.C.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: *Ornithodoros*) associated with streambreeding frogs (Anura: Cycloramphidae: *Cycloramphus*) in Brazil. **Ticks Tick Borne Diseases**, v. 8, p. 682–692, 2017.
- MUÑOZ-LEAL S.; FACCINI, A.A.M.; COSTA, F.B.; MARCILI, A.; MESQUITA E.T.K.C.; MARQUES, E.P. J.R.; LABRUNA, M.B. Isolation and molecular characterization of a relapsing fever *Borrelia* recovered from *Ornithodoros rudis* in Brazil. **Ticks Tick Borne Disease**. v.9, n.4, p. 964-871, 2018.
- NIERI-BASTOS, F.A.; MARCILI, A.; DE SOUSA, R.; PADDOCK, C.D.; LABRUNA M.B. Phylogenetic Evidence for the Existence of Multiple Strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. **Appl Environ Microbiol**, v.2, n.8, 2018.
- NAVA, S.; ELSHENAWY, Y.; EREMEEVA, M. E.; SUMNER, J. W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* in Argentina. **Emerg Infectious of Diseases**. v.14, n. 12, p. 1894-7, 2008.
- NAVA, S., A. J. MANGOLD, M. MASTROPAOLO, J. M. VENZAL, N. FRACASSI, AND A. A. GUGLIELMONE. Seasonal dynamics and hosts of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Veterinary Parasitology**, v. 181, p. 301–308, 2011.
- NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 547-555, 2012.
- NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; UGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.
- NADOLNY, R. M.; WRIGHT, C. L.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W. L.; GAFF, H. D. Ticks and spotted fever group rickettsiae of southeastern Virginia. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 5, n. 1, p. 53-57, 2014.
- NADOLNY, R.M.; GAFF, H.D. Natural history of *Amblyomma maculatum* in Virginia. **Ticks Tick Borne Disease**. v. 9, p. 188–195, 2018.
- NIERI-BASTOS, F.A.; SZABÓ M.P.J.; PACHECO R.C.; SOARES J. F. SOARES H. S.; J. MOARES-FILHO; DIAS R. A.; LABRUNA M. B. Comparative evaluation of infected and noninfected *Amblyomma triste* ticks with *Rickettsia parkeri*, the agent of an emerging rickettsiosis in the New World. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 6, 2013.
- NIERI-BASTOS, F.A; HORTA, M.C, BARROS-BATTESTI D.M.; MORAES-FILHO, J.; RAMIREZ, D.G; MARTINS, T.F; LABRUNA, M.B. Isolation of the pathogen *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest from its presumed tick vector, *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), from two areas of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, p. 977-98, 2016.
- OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in an Atlantic rain forest region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p. 1225–1229, 2009a.
- OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting Wild Birds in an Atlantic Forest Area in the State of São Paulo, Brazil, with Isolation of Rickettsia from the Tick *Amblyomma longirostre*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 4, p. 770-774, 2008.

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. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology** v. 103, p. 413-425, 2009b.

OGRZEWALSKA, M., UEZU, A., LABRUNA, M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research**, v. 106, p. 809–816, 2010.

OGRZEWALSKA, M. ; LITERÁK, I.; CAPEK, M.; SYCHRA, O.; CALDERÓN, V. A.; RODRÍGUEZ, B. C.O; PRUDENCIO, C. ; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B. Bacteria of the genus *Rickettsia* in ticks (Acari: Ixodidae) collected from birds in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, p. 478-482, 2015.

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

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

OLIVER Jr., J.H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodidae). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.20, n.1, p.397-430, 1989.

ORTIZ, F.T. Ocorrência de infecção por *Rickettsia rickettsii* em hospedeiros do carrapato-estrela no Campus “Luiz de Queiroz”. **Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.**

PADILHA, A. F. Detecção sorológica e molecular de espécies do gênero rickettsia em pequenos roedores de três municípios de minas gerais com diferentes perfis de endemicidade. **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2010.**

PACHECO, R. C.; VENZAL, J. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1804-1805, 2006.

PADDOCK, C. D., AND M. J. YABSLEY. Ecological havoc, the rise of white-tailed deer, and the emergence of *Amblyomma americanum*-associated zoonoses in the United States. **Curr. Top. Microbiol Immunol.** v. 315, p. 289–314, 2007.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PIRANDA, E.M., FACCINI, J.L.H., PINTER, A., SAITO, T.B., PACHECO, R.C., HAGIWARA, M.K., LABRUNA, M.B., Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n.7, p. 696–701, 2008.

PADDOCK, C.D.; LANE R.S.; STAPLES J.E.; LABRUNA, M.B. Changing paradigms for the tick-borne diseases in the Americas, In: National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. Global Health Impacts of Vector-borne Diseases: workshop Summary. **The National Academic Press**, Washington, D.C. p.221-258, 2016.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719–756, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSCHI, C.; LABRUNA M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BOTAM, J.; FOUNIER, P. E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 657–702, vol. 26, no. 4, 2013.

PAROLA P. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. **Clinical Microbiol Infect**, v. 17, n.7, p. 996–1000, 2011.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004.

PADDOCK C.D.; GODDARD, J. The Evolving Medical and Veterinary Importance of the Gulf Coast tick (Acari: Ixodidae). **Journal Medical Entomology**, v. 52, n.2, p. 230–252, 2015.

PARKER, R. R. A pathogenic rickettsia from the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. In: **Third International Congress for Microbiology**, New York, p. 390-391, 1940.

PARKER, R. R.; KOHLS, G. M.; COX, G. W. Y.; DAVIS, G. E. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 54, p. 1482-1484, 1939.

PENA, D. C. H.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; LABRUNA, M. B.; MILAGRES, B. S.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. 2, p. 243-244, 2009.

POUBEL, I.T.; CUNHA, N.C.; FONSECA, A.B.M.; PINTER, A.; FONSECA, A.H.; CORDEIRO, M.D.; ALMOSNY, N.R.P. Seroprevalence of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* in dogs during a Brazilian Spotted Fever outbreak in the State of Rio de Janeiro. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.70 n.3, 2018.

PORTILLO, A.; GARCÍA-GARCÍA, C.; SANZ, M.M., SANTIBÁNEZ, S.; VENZAL, J.M.; OTEO, J.A. A confirmed case of *Rickettsia parkeri* infection in a traveler from Uruguay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 89, p. 1203–1205, 2013.

RAOULT, D.; ROUX, D. H. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infections disease. **Microbiology Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 694-719, 1997.

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. *Journal of Bacteriology*, v.173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

ROMER Y, SEIJO AC, CRUDO F, NICHOLSON WL, Varela-Stokes A, Lash RR, Paddock CD. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**. v.17, p. 1169-1173, 2011.

ROMER, Y.; NAVA, S.; GOVEDIC, F.; CICUTTIN, G.; DENISON, A.M.; SINGLETON, J.; KELLY, A.J.; KATO, C.Y.; PADDOCK, C.D. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis in different ecological regions of Argentina and its association with *Amblyomma tigrinum* as a potential .2014.

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

SANDERS, D. M. Ticks and tick-borne pathogens associated with feral swine in Edwards Plateau and gulf prairies and marshes ecoregions of Texas. (**Dissertação**) University of Memphis; M.S., University of Tennessee, 2011.

SANGIONI, L.A.; HORTA, M.C.; VIANA, M.C.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.; GALVÃO, M.A.; SCHUMAKER, T.T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265–270, 2005.

SANGIONI, L. A. Pesquisa de Infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães e equídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do Estado de São Paulo. 2003. 86 p. **Tese** (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada a Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SILVA B.J.; FONSECA, A.H.; BARBOSA, J.D. Molecular characterization of *Anaplasma marginale* in ticks naturally feeding on buffaloes. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 35, p. 38–41, 2015.

SIGRIST, T. Guia de Campo Avis Brasilis: Avifauna Brasileira/ Tomas Sigríst; ilustrado por Tomas Sigríst; São Paulo. 4 edição **Avis Brasilis**, 2014 (Série: Guia de Campo Avis Brasilis) 600p.

SMITH B. T.; KLICKA J. The profound influence of the Late Pliocene Panamanian uplift on the exchange, diversification, and distribution of New World birds. **Ecography**, v. 33, p. 333–342, 2010.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C.; DUARTE, J. M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) on wildmarshdeer (*Blastocerus dichotomus*) from southeast Brazil: infestations before and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 268-274, 2003.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1111–1113, 2007.

SILVEIRA, I.; MARTINS, T. F.; OLEGÁRIO, M. M.; PETERKA, C.; GUEDES, E.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals, humans and ticks in Paulicéia, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 7, p. 525-533, 2015.

SPIELMAN, A.; TELFORD III, S. R.; POLLACK, R. J. The origins and course of the present outbreak of Lyme disease, 250 **Journal of Medical Entomology** v. 52, n. 2 pp. 83–96, 1993.

SONENSHINE, D. E. Biology of ticks. Oxford University Press, 2 ed., p. 465, 1993.

SPOLIDORO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MANTOVANI, E.; BRANDAO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; YOSHINARI, N.H. Novel spotted Fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, p. 521-523, 2010.

SPOLIDORIO, M. G.; MINERVINO, A. H. H.; VALADAS, S. Y. O. B.; SOARES, H. S.; NEVES, K. A. L.; LABRUNA, M. B.; RIBEIRO, M. F. B.; GENNARI, S. M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 22, n. 2, p. 214- 219, 2013.

SUCEN. Manual de Vigilância Acarológica. **Secretaria de Estado da Saúde Superintendência de Controle De Endemias** – SUCEN, São Paulo, dezembro, 2002.

SZABÓ, M. P. J.; OLEGÁRIO, M. M. M.; SANTOS, A. L. Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. Experimental. **Applied Acarology**, v. 43, n. 1, p. 73-84, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C.; DUARTE, J. M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild marsh-deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast of Brazil: infestations prior and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**. 40(3):268-274. 2003.

TRAPE, J.F.; DIATTA, G.; ARNATHAU, C.; BITAM, I.; SARIH, M.; BELGHYTI, D.; BOUATTOUR, A.; ELGUERO, E.; VIAL, L.; MANÉ, Y.; BALDÉ, C.; PUGNOLLE, F.; CHAUVANCY, G.; MAHÉ, G.; GRANJON, L.; DUPLANTIER, J.M.; DURAND, P.; RENAUD, F.. The epidemiology and geographic distribution of relapsing fever borreliosis in west and north Africa, with a review of the *Ornithodoros erraticus* complex (Acari: Ixodida). **PLoS One**, v. 8, 2013.

TEEL, P.D.; KETCHUM, H.R.; MOCK, D.E.; WRIGHT, R.E.; STREY, O.F. The Gulf Coast tick: a review of the life history, ecology, distribution, and emergence as an arthropod of medical and veterinary importance. **Journal Medical Entomology**. v.47, p. 707–722, 2010.

TERRASSINI, F. A.; BARBIERI, F. S.; ALBUQUERQUE, S.; SZABÓ, M. P. J.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A. Comparison of two methods for collecting free-living ticks in the Amazonian forest. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, p. 194-196, 2010.

TOMASSONE, L.; CONTE, V.; PARRILLA, G.; DE MENEGHI D. *Rickettsia* infection in dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* ticks, Cochabamba Department, Bolivia. **Vector Borne Zoonotic Disease**. v.10, p. 953–958, 2010.

UENO, T.E.H., 2014. Infecção experimental em equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense*. **Tese** (Doutorado em Ciências)–Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

VALADARES, F.D. Pesquisa do linfonodo sentinela em cadelas portadoras de tumor de mama, 2015.

VENZAL, J. M.; CASTRO, O.; SOUZA, C. D.; GONZÁLEZ, E. Carrapatos de roedores Sigmodontinos de Uruguay. Jornadas argentinas de mastozoologia, **Resumen...**Mendoza, Argentina, p. 71, 2001.

VENZAL J. M.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; SOUZA, C. G.; GUGLIELMONE, A. A. Garapatas de importancia médica y veterinaria em Uruguay. **Entomology y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 635-650, 2003a.

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

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; SOUZA, C. G.; FÉLIX, M. L.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts and seasonality of the vector of *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p. 104- 109, 2008.

VENZAL, J.M., ESTRADA-PEÑA, A., PORTILLO, A., MANGOLD, A.J., CASTRO, O., DE SOUZA, C.G., FÉLIX, M.L., PÉREZ-MARTÍNEZ, L., SANTIBÁNEZ, S., OTEO, J.A. *Rickettsia parkeri*: a rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for spotted fever rickettsiosis in southern Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 3, p. 131–134, 2012.

VERRÍSSIMO, C.J. Fatores que afetam a fase de vida livre dos carrapatos. **Controle de carrapatos nas pastagens**, 2 edição. Nova Odessa, 2015.

WEINERT, L. A.; WERREN J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of *Rickettsia* bactéria. **BMC Biology**, vol. 7, n. 6, 2009.

NAVA, S.; A. J. MANGOLD, M. MASTROPAOLO, J. M. VENZAL, N. FRACASSI, AND A. A. GUGLIELMONE. Seasonal dynamics and hosts of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Veterinary Parasitology**. v.181, p. 301–308, 2011.

VIEIRA, A. M. L.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B.; MAYO, R. C.; SOUZA, S. S. L.; CAMARGO-NEVES, V. L. F. **Manual de Vigilância Acarológica, Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, p. 62, 2004.

VIEIRA, F. DE T.; ACOSTA, I. C. L.; MARTINS, T. F., FILHO; J. M., KRAWCZAK, F. DA S.; BARBIERI, A. R. M.; EGERTE, L.; FERNANDES, D. R. BRAGA, F. R.; LABRUNA, M. B.; Dietze, R. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 249, p. 43–48, 2018.

WEINERT, L. A.; WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**, v. 7, n. 6, p. 1-15, 2009.

YODER, J. A.; CHRISTENSEN, B. S.; CROXAL T. J. L; SCHUMAKER, L. K.; TANK J. L. Moisture requirements for activity/survival of the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* Koch (Acari: Ixodidae), based on a water balance study of all life cycle stages. **International Journal of Acarology**, v. 34, p. 285–292, 2008.



Fotos:

Observações:

## ANEXO 2

Tabela 5 –Lista de espécies de aves silvestres capturadas através de redes de neblina na cidade de São Bento, na Baixada Maranhense, Maranhão, Brasil.

<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nº de indivíduos</b>
	Icteridae	<i>Sturnella militaris</i>	24
	Furnariidae	<i>Certhiaxis cinnamomeus</i>	2
Passeriformes	Motacillidae	<i>Anthus lutescens</i>	1
	Passerellidae	<i>Ammodramus humeralis</i>	3
Columbiformes	Columbidae	<i>Columbina passerina</i>	33
		<i>Columbina minuta</i>	2
Charadriiformes	Scolopacidae	<i>Tringa solitária</i>	1
		<i>Actitis macularius</i>	2
	Jacanidae	<i>Jacana jacana</i>	1
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Guira guira</i>	1
Apodiformes	Trochilidae	<i>Amazilla fimbriata</i>	1
<b>Total</b>			<b>71</b>