ADRIANO PINTER DOS SANTOS

ASPECTOS ECOLÓGICOS DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA
EM UM FOCO ENDÊMICO NO ESTADO DE SÃO PAULO

São Paulo
2007

ADRIANO PINTER DOS SANTOS

ASPECTOS ECOLÓGICOS DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA EM UM FOCO
ENDÊMICO NO ESTADO DE SÃO PAULO

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental e Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo
2007

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.1837
FMVZ

Santos, Adriano Pinter dos

Aspectos ecológicos da febre maculosa brasileira em um foco endêmico no Estado de São Paulo. – São Paulo: A. P. Santos, 2007.
86 f. : il.

Tese (doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, 2007.

Programa de Pós-graduação: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Amblyomma aureolatum*. 2. *Pyrglena leucoptera*. 3. Febre Maculosa. 4. Mogi das Cruzes (SP). I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Comissão Bioética

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Aspectos ecológicos da febre maculosa Brasileira em um foco endêmico no Estado de São Paulo", protocolo nº473/2004, utilizando 60 cobaias e 20 coelhos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

(We certify that the Research "Ecological aspects of Brazilian spotted fever disease in a endemic area in the State of São Paulo", protocol number 473/2004, utilizing 30 rats and 20 rabbits, under the responsibility of Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting).

São Paulo, 29 de outubro de 2004

Profª Drª Júlia Maria Matera
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SANTOS, Adriano Pinter dos

Título: Aspectos ecológicos da febre maculosa brasileira em um foco endêmico no Estado de
São Paulo

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

"...Coisas que acontecem
Deixa que eu lhe diga
Nada me cansou
Não senti fadiga
Porque gente amiga
Só me traz calor

Se eu tô indo embora
Não vai ser agora
que se vai sofrer
Deixa que mais tarde
Na curva da estrada
A gente se vê

Se eu deixo saudade
Vou levar também
Ter que ir embora
Todo mundo tem."

(Sater, A.; Teixeira, R.)

"...brother, can you see those birds?
they don't look to heaven.
they don't need religion,
they can see.
they go down to the water,
drink down of the water,
fly up off the water,
leave it be
This is not my time, sister
It is cold in heaven.
but no-one's coming after me..."

(Stipe, J. M.)

Agradecimentos:

Aos Meus Pais,

**Edelcio dos Santos
e Cioni Pinter dos Santos**

Pela compreensão e apoio, sem eles, jamais estaria aqui.

A toda minha família,

À minha irmã, Andressa e cunhado Sandro.

Aos primos, Cucão, Careca e Fá.

Aos meus avós,

João e Leonor

Norberto e Glória (*in memoriam*)

À Simone,

pelo carinho, companheirismo e muita paciência.

Ao Prof. Marcelo Bahia Labruna, pela amizade, confiança e por tudo que me ensinou nestes oito(!!!!) anos de convívio, um muito obrigado.

À Profa. Solange, por todo o carinho que tem com todos os alunos.

Ao Prof. Rodrigo, pela ajuda e amizade.

Ao Professor Leonardo J. Richtzenhain e ao Prof. Paulo Eduardo Brandão

À Sheila Oliveira por ter tido paciência comigo neste final de ano.

Ao Prof. Fernando Ferreira e ao Prof. Marcos Amaku e a todo o pessoal do LEB.

Ao Prof. Silvio Arruda Vasconcellos pelo apoio e incentivo nesta jornada.

Ao Prof. Luís Fábio Silveria, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Colega Arlei Marcili, por toda a ajuda com os mamíferos.

Ao Prof. Mario DeVivo e à colega Juliana Gualda de Barros pela ajuda com o depósito dos animais.

À Colega Valéria Onofrio por toda a ajuda com os Prostriatas.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias, Hilda, Alessandra, Renata, Guacyara, Alexandre Thomaz, Luciana Nunes e Mikaela.

À família carrapato: Mauricio, Ataliba, Ricardo, Pedrinho, Daniel, Silvão, Iara e Simone.

Em especial aos amigos Richard, Jonas, Marysia (Dzieki) e Eliane por terem me ajudado com a PCR, seqüenciamento e com as cobaias.

Ao grupo carrapato de Jaboti, Matias, Márcio, Karina, Marquinhos, Gê, Vivi, grandes companheiros de viagem.

À Dra. Darci Barros Battesti e a todas as meninas do Butantan, pelos ótimos momentos de convívio.

Ao Renato Caravieri, grande companheiro de viagem para Taiacu, quando tudo começou.

Ao Tiaguinho, Jonas e Marcelo Willian, me ajudaram muito nas idas a Taiacupeba, cada história....

Às colegas da BIO, Érika e Talitha, muito obrigado pela ajuda com as redes de neblina, sem elas as redes não durariam um mês na minha mão...

Ao Thiago, Alex, Baiano e Hiltinho por todo este período de convívio em Taiacu, pessoas fundamentais neste trabalho.

Aos funcionários e amigos Alexandre Sanches, Sandra Abelardo Sanches, Antônio, Carol, Bispo e Jucélia pelo apoio, amizade e força.

Aos funcionários da Secretaria do VPS, Virgínia, Cristina e Danival

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da USP pela gentileza, atenção e esclarecimentos bibliográficos.

À BIOVET, sob a figura das colegas Sandra e Alexandra, que forneceram cobaias para os experimentos

A Roseli, Stela, Ana, Ricardo, Kleber, Pri, Tais, Elaine, Julinha, Celso, Eudina e todos os colegas da SUCEN, está sendo um ótimo convívio.

Aos moradores de Taiacupeba e ao pessoal da SAT, que muito colaboraram e ainda esperam um auxílio.

À Vereadora Odete Rodrigues Alves Souza por sua fundamental ajuda na instalação da base de pesquisa em Taiacupeba.

À 61ª. Turma da Vet-USP, em especial aos amigos Quexão, White, Zé, Cox, Aninha, Pat, Guinsu, Kurt, Kusso, Tand, Nato, Pira... Apesar da Distância...

À Família Miyashiro e à Família Tada, por todo o carinho.

Ao TIMÃO, de tantas alegrias.

Ao IBAMA, por me confiar a licença para o trabalho com os animais.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a minha formação.

Agradeço, de uma maneira geral, a todos os que tenham contribuído para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho, que por descuido ou esquecimento não foram aqui mencionados.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) pelo apoio financeiro para a execução deste trabalho (processo nº 03/08798-0).

RESUMO

SANTOS, A. P. **Aspectos ecológicos da febre maculosa brasileira em um foco endêmico no Estado de São Paulo.** [Ecological aspects of Brazilian Spotted Fever in an endemic area in the State of São Paulo]. 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Foi conduzido um estudo sobre a ecologia da Febre Maculosa Brasileira, causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, em uma área endêmica, no distrito de Taiaçupeba, Município de Mogi das Cruzes, SP. Para o melhor entendimento de quais animais silvestres são os hospedeiros das formas imaturas do carrapato vetor, *Amblyomma aureolatum*, foram capturados entre janeiro e dezembro de 2005, 243 animais silvestres em dois fragmentos de mata. Foram utilizadas estações de pitfall para captura de roedores e pequenos didelfídeos e armadilhas tomahawk para captura de *Didelphis aurita*, além da colocação de redes de neblina (14m x 3m cada) para captura de aves. Os animais foram sacrificados e tiveram sangue, baço e fígado extraídos. O baço de cada animal foi submetido a testes moleculares e bioensaios para pesquisa de bactérias do gênero *Rickettsia*. Os carrapatos capturados dos animais foram submetidos à identificação taxonômica morfológica ou molecular e à pesquisa de bactérias do gênero *Rickettsia*. Foram colhidos carrapatos dos gêneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*. Imaturos do carrapato *Amblyomma aureolatum* foram colhidos parasitando três indivíduos da espécie de Passeriforme *Pyriglena leucoptera*. Não foram encontrados exemplares desta espécie de carrapato parasitando roedores ou didelfídeos. Nenhum animal foi identificado sendo infectado por riquetsias, enquanto que três espécies de riquetsias, sendo duas do grupo da febre maculosa, foram identificadas infectando carrapatos das espécies *Amblyomma longirostre*, *Ixodes aragaoi* e *Ixodes loricatus*. Nenhum carrapato foi encontrado naturalmente infectado com a bactéria *R.*

rickettsii. O estudo mostrou detalhes do ciclo de vida do carrapato *A. aureolatum* que podem auxiliar o entendimento do ciclo enzoótico da febre maculosa brasileira.

Palavras-chave: *Amblyomma aureolatum*. *Pyriglena leuoptera*. Febre Maculosa. Mogi das Cruzes (SP).

ABSTRACT

SANTOS, A. P. **Ecological aspects of Brazilian Spotted Fever in an endemic area in the State of São Paulo.** [Aspectos ecológicos da febre maculosa brasileira em um foco endêmico no Estado de São Paulo]. 2007. 86 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Brazilian Spotted Fever (BSF) is a tick-borne-disease caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii*. An ecological study was conducted in a BSF-endemic area in Taiaçupeba County, Mogi das Cruzes Municipality, State of São Paulo. With the purpose to determine natural hosts of the immature stages of the tick vector *Amblyomma aureolatum*, a total of 243 wild animals were captured in two fragments of Atlantic Forests between January and December of 2005. Pitfall trap stations were used for capture of rodents and small didelphids while tomahawk traps were used for *Didelphis aurita* capture. Mist nets (14m x 3m each) were used for bird capture. Captured animals were scarified and blood, spleen and liver were extracted. Spleen samples were submitted to molecular and bioassay tests for rickettsia research. Captured ticks were submitted to morphological or molecular taxonomic identification and to rickettsia research. Ticks from the genera *Amblyomma*, *Haemaphysalis* and *Ixodes* were collected. Immature tick stages of *A. aureolatum* were collected on three individuals of the bird species *Pyriglena leucoptera*, but no other *A. aureolatum* tick was found infesting neither rodents or didelphids. No animal was found infected by rickettsiae whereas three rickettsiae, two of them belonging to Spotted Fever Group, were found infecting the ticks *Amblyomma longirostre*, *Ixodes aragaoi* and *Ixodes loricatus*. No tick was found infected by *R. rickettsii*, the agent of BSF. The present study revealed details about the *A. aureolatum* life cycle in natural conditions, contributing for a better understanding about the enzootic cycle of BSF.

Key words: *Amblyomma aureolatum*. *Pyriglena leucoptera*. Spotted Fever. Mogi das Cruzes (SP).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Porcentagem de similaridade e divergência do fragmento do gene 16S mitocondrial para algumas espécies de carrapatos do gênero <i>Amblyomma</i> .- São Paulo – 2007.....	36
TABELA 2 -	Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar genes de riquetsias.- São Paulo – 2007.....	37
TABELA 3 -	Classificação das aves segundo o estrato vertical da floresta em que preferencialmente habitam - São Paulo – 2007.....	40
TABELA 4 -	Dados dos didelfídeos capturados de janeiro a dezembro de 2005 e presença de carrapatos (L=larva(s); N=ninfa(s); M=macho(s) e F=fêmea(s))- São Paulo – 2007.....	45
TABELA 5 -	Dados das aves capturados de janeiro a dezembro de 2005 e presença de carrapatos (L=larva(s); N=ninfa(s); M=macho(s) e F=fêmea(s)) - São Paulo - 2007.....	46
TABELA 6 -	Dados dos roedores capturados de janeiro a dezembro de 2005 e presença de carrapatos (L=larva(s); N=ninfa(s); M=macho(s) e F=fêmea(s)) - São Paulo - 2007.....	48
TABELA 7 -	Valores de abundância e intensidade médias para a infestação por sete espécies de carrapatos nos diferentes grupos de hospedeiros capturados durante o estudo - São Paulo - 2007.....	52
TABELA 8 -	Resultado da PCR e seqüenciamento realizados individualmente para os carrapatos objetivando diversos genes presentes em <i>Rickettsia</i> spp. Em azul estão marcados os genes submetidos ao seqüenciamento e em vermelho os resultados confirmados com a repetição da reação. (L= larva, N = ninfa, M = macho e F = fêmea, P = positivo e N = negativo) - São Paulo - 2007.....	59

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Modelo apresentado por Pinter (2003), representando o provável ciclo natural do carrapato <i>A. aureolatum</i> e a transmissão da bactéria <i>R. rickettsii</i> entre a população de vetores e hospedeiros vertebrados no local de estudo- São Paulo – 2007.....	26
FIGURA 2 -	Foto aérea (1:10.000) da região de estudo de Pinter e Labruna (2006), indicando os locais onde foram encontrados cães parasitados por adultos de <i>A. aureolatum</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> e os fragmentos de mata amostrados neste estudo, áreas norte (superior) e sul (inferior).- São Paulo – 2007.....	30
FIGURA 3 -	Esquema real da disposição das redes de neblina, estações de pitfall e armadilhas tomahawk - São Paulo – 2007.....	33
FIGURA 4 -	Hipostômio em forma de lança (detalhe) - São Paulo – 2007.....	34
FIGURA 5 -	Hipostômio em formato espatulado – São Paulo – 2007.....	34
FIGURA 6 -	Desenho esquemático da Mata Pluvial Atlântica com a delimitação ilustrativa dos estratos verticais utilizados para agrupar as espécies de aves capturadas neste estudo - São Paulo – 2007.....	41
FIGURA 7 -	Ave capturada da espécie <i>Pyrglena leucoptera</i> - São Paulo – 2007.....	43
FIGURA 8 -	Ave da espécie <i>Chiroxiphia caudata</i> sendo retirada da rede - São Paulo – 2007.....	43
FIGURA 9 -	Rede de neblina armada em trilha na mata - São Paulo – 2007.....	43
FIGURA 10 -	Estação de Pitfall armada na mata - São Paulo – 2007.....	44
FIGURA 11 -	Roedor capturado em armadilha Pitfall - São Paulo – 2007.....	44
FIGURA 12 -	Didelphídeo capturado da espécie <i>Monodelphis americana</i> - São Paulo – 2007.....	44
FIGURA 13 -	Aves capturas de acordo com os estratos verticais da mata contemplados durante os 12 meses de estudo. Os números de 1 a 6 são referentes aos seguintes estratos: 1 – Terrestre/sub-bosque; 2 – Sub-bosque; 3 – Sub-bosque/bosque; 4 – Bosque/dossel; 5 – Dossel; 6 – Terrestre/dossel- São Paulo – 2007.....	50
FIGURA 14 -	Parasitismo de larvas de <i>A. longirostre</i> em aves durante o ano de 2005- São Paulo – 2007.....	54

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 15 -	Parasitismo de larvas de <i>A. longirostre</i> em aves de acordo com o estrato vertical da floresta - São Paulo – 2007.....	55
FIGURA 16 -	Distribuição dos carrapatos de acordo com o estrato vertical da ave parasitada - São Paulo – 2007.....	55
FIGURA 17 -	Área de estudo em Taiaçupeba com referencia aos prováveis corredores funcionais (linha branca pontilhada) utilizados por alguns Passeriformes - São Paulo – 2007.....	69
FIGURA 18 -	Esquema da classificação taxonômica de alguns gênero de roedores da América do Sul (fonte: NCBI – Taxonomy Browser) - São Paulo – 2007.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	centímetro
dm	decímetro
DNA	ácido desoxirribonucléico
RNA	ácido ribonucleico
rRNA	ácido ribonucleico ribossômico
dNTP	deoxirribonucleotídeo-N-trifosfato
ddNTP	di-deoxirribonucleotídeo-N-trifosfato
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
<i>g</i>	gravidade terrestre
ha	hectare
m	metro
M	molar
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
min	minuto
mL	mililitro
mM	milimolar
NaCl	cloreto de sódio
nt	nucleotídeos
PCR	reação em cadeia pela polimerase
pb	pares de bases
pH	potencial hidrogeniônico
q.s.p	quantidade suficiente para
Seq	seqüenciamento
Sin.	Sinonímia
TE	tampão Tris-EDTA

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2 OBJETIVOS.....	27
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 ÁREA DE ESTUDO.....	28
3.2 CAPTURA DOS ANIMAIS SILVESTRES.....	28
3.2.1 Amostragem dos animais.....	28
3.2.2 Captura dos animais.....	29
3.3 PROCESSAMENTO DOS ANIMAIS.....	31
3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS.....	34
3.5 PESQUISA DE INFECÇÃO POR RIQUÉTSIAS NOS CARRAPATOS.....	36
3.6 ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE RIQUÉTISAS EM TECIDOS DOS ANIMAIS SILVESTRES.....	38
3.7 PESQUISA DE CARRAPATOS EM CÃES.....	39
3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	39
4 RESULTADOS.....	42
4.1 CAPTURA DE ANIMAIS SILVESTRE.....	42
4.2 PARASITISMO POR CARRAPATOS.....	51
4.3 PESQUISA DE INFECÇÃO POR RIQUÉTSIAS NOS CARRAPATOS.....	57
4.4 ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE RIQUÉTSIAS EM TECIDOS DE ANIMAIS SILVESTRES.....	60
4.5 PESQUISA DE CARRAPATOS EM CÃES.....	61
5 DISCUSSÃO.....	62
6 CONCLUSÕES.....	76
REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

Dentro do filo Artrópoda, os carrapatos são considerados vetores de um número de agentes infecciosos maior do que qualquer outro grupo, inclusive o dos mosquitos (HOOGSTRAAL, 1985). Das aproximadamente 825 espécies de carrapatos descritos no mundo, apenas cerca de 10% assumem uma maior importância direta em saúde pública, devido às possibilidades desses carrapatos parasitarem humanos (OLIVER, 1989). Obviamente, várias outras espécies que nunca foram descritas parasitando humanos, assumem importante papel indireto na saúde pública, pois contribuem para a manutenção enzoótica de agentes infecciosos na natureza (HOOGSTRAAL, 1967; MCDADE; NEWHOUSE, 1986).

No entanto, quando se refere à fauna ixodológica do Brasil, composta por 54 espécies de carrapatos (ARAGÃO; FONSECA, 1961a; GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTI, 2001), a literatura é ainda muito escassa. Apenas a febre maculosa é reconhecida atualmente, como uma zoonose transmitida por carrapatos no Brasil.

A febre maculosa, zoonose causada pela espécie *R. rickettsii*, foi primeiramente descrita nos Estados Unidos, onde a doença recebeu o nome de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. Neste país, o pesquisador Dr. Howard Taylor Ricketts efetuou o primeiro isolamento de *R. rickettsii* no início do século XX, quando também estabeleceu o papel do carrapato *Dermacentor andersoni* na transmissão da doença (RICKETTS, 1909). Atualmente, *D. andersoni* é o vetor da *R. rickettsii* na costa oeste, enquanto que *Dermacentor variabilis* é o vetor na costa leste dos Estados Unidos. Ambas espécies foram profundamente estudadas quanto a sua biologia, ecologia e competência vetorial (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; SONENSHINE; 1993)

Além do Brasil e Estados Unidos, *R. rickettsii* ocorre endemicamente no México (febre manchada), Colômbia (febre de Tobia), Costa Rica e Panamá (DIAS; MARTINS, 1939; PATINO; AFANADOR; PAUL, 1937; BUSTAMANTE; VARELA, 1947; RODANICHE, 1953; PHILIP et al., 1978). Nos Estados Unidos, *R. rickettsii* é transmitida a humanos por carrapatos do gênero *Dermacentor*. Nos demais países, incluindo o Brasil, a bactéria é transmitida primariamente por carrapatos do gênero *Amblyomma* (MCDADE; NEWHOUSE, 1986).

R. rickettsii integra, juntamente com várias outras espécies de *Rickettsia*, o chamado grupo da febre maculosa (GFM). Atualmente, o GFM está composto por pouco mais de 20 espécies válidas, distribuídas em todos os continentes do mundo, exceto na Antártida (YU; WALKER, 2003). A grande maioria das espécies do GFM está associada com carrapatos. As exceções são *Rickettsia felis* (associada a pulgas) e *Rickettsia akari* (associada a ácaros). Embora algumas espécies de *Rickettsia* do GFM sejam de comprovada patogenicidade para humanos, outras não o são, ao passo que algumas ainda permanecem de patogenicidade desconhecida (YU; WALKER, 2003).

No entanto, aquelas espécies consideradas não patogênicas podem apresentar um papel fundamental na história natural de espécies patogênicas, pois uma vez que um carrapato esteja infectado por uma espécie não patogênica (ex. *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia peacockii*), ele se torna incapaz de se infectar e transmitir uma espécie patogênica (ex. *Rickettsia rickettsii*) (BURGDORFER, 1988; MACALUSO et al., 2002). Este fato torna-se de grande importância prática, pois muitas populações de carrapatos estão infectadas com riquetsias não patogênicas em taxas de infecção muitas vezes maiores do que as taxas de infecção por riquetsias patogênicas (PHILIP; CASPER, 1981; LABRUNA et al., 2004a; PINTER E LABRUNA, 2006).

No Brasil, os primeiros casos de febre maculosa foram descritos no final da década de 20 em São Paulo (PIZA, 1932) e início da década de 30 em Minas Gerais (DIAS; MARTINS, 1939).

As pesquisas para determinar qual artrópode seria o vetor da FMB começaram no início da década de 30, quando Lemos-Monteiro, Fonseca e Prado (1932a), demonstraram pela primeira vez que o carrapato *Amblyomma cajennense* podia se infectar experimentalmente com o agente causador da doença, quando alimentado em uma cobaia doente, experimentalmente infectada. Os autores também testaram a competência vetorial de carrapatos do gênero *Argas* e *Ornithodoros*, obtendo resultados positivos apenas para o segundo gênero, utilizando a espécie *Ornithodoros rostratus*, que se infectou e transmitiu a infecção para cobaias.

Apesar destes resultados, baseados em observações epidemiológicas sobre a ocorrência da febre maculosa, os autores insistiam que seria mais provável que outro grupo de vetores fosse o responsável pela transmissão da doença em condições naturais.

Em trabalho subsequente, Lemos-Monteiro, Fonseca e Prado (1932b) testaram a competência vetorial de diversos ectoparasitos que eram encontrados nas habitações ou arredores de áreas onde houve casos de FMB, em busca da determinação do provável vetor.

Foram testadas pulgas (*Pulex irritans*, *Xenopsilla cheopis*, *Xenopsilla brasiliensis*, *Ctenocephalides felis*, *Ceratophyllus fasciatus*, *Ctenopsyllus musculi* e *Craneopsylla minerva*), piolhos (*Pediculus capitis* e *Linognathus pilliferus*), percevejos (*Cimex lectularius*), ácaros (*Echinolaelaps echidninus*, *Laelaps nutalli*, *Liponyssus bacoti* e *Liponyssus burse*) e os carrapatos *Amblyomma aureolatum*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Boophilus microplus*. Todas as experiências foram negativas. Os autores concluíram que o agente da febre maculosa brasileira deveria ocorrer numa proporção muito baixa na população de vetores.

No mesmo ano, Lemos-Monteiro e Fonseca (1932) demonstraram a transmissão intra-estadial do agente da FMB pelo carrapato *A. cajennense*, além de verificar a transmissão vertical do agente por fêmeas adultas do carrapato.

Paralelamente, Meyer, Saborido e Prado (1932), reproduziram a doença em cobaias a partir da inoculação intraperitoneal de emulsionado de piolhos *Pediculus capitis*, retirados de um cadáver humano acometido pelo FMB.

Um ano depois, Gomes (1933), defronte a estes achados, tentou reproduzir o experimento inoculando em cobaias, piolhos colhidos em pacientes com a doença, sendo que todas as tentativas foram consideradas negativas. Neste mesmo trabalho, o autor descreve o isolamento, em cobaia, do agente etiológico da doença a partir de um exemplar de *Amblyomma aureolatum* (Sin. *Amblyomma ovale striatum*) adulto colhido em um cão, que residia com uma família, cujos membros apresentavam casos de FMB.

Este representa o primeiro isolamento da bactéria causadora da FMB realizado a partir de carrapatos no Brasil. O autor coloca os carrapatos do gênero *Amblyomma* como os principais vetores da doença, sendo as principais espécies: *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum*, reservando aos piolhos um papel de transmissor eventual.

Ainda no ano de 1933, Lemos-Monteiro, em experimentos realizados em parceria com o “*Rocky Mountain Laboratory*” nos Estados Unidos, verificaram em uma série de experimentos em cobaias, a imunidade cruzada entre amostras do agente da FMB com amostras do agente da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. Esta foi a primeira evidência de que a espécie *R. rickettsii* era a causadora da doença no Brasil.

Embora a possibilidade da participação de animais silvestres no ciclo da febre maculosa já ter sido sugerida por Ricketts (1909), foi de Moreira e Magalhães (1935) o feito de isolar pela primeira vez, uma amostra do agente causador da febre maculosa a partir de um animal silvestre. Através de um experimento, os autores conseguiram reproduzir a doença em cobaias, após inoculação de sangue colhido de um gambá *Didelphis* sp (provavelmente

Didelphis aurita). Além disso, estes autores também encontraram carrapatos *A. cajennense* naturalmente infectados pelo agente, parasitando um cão doméstico.

Moreira e Magalhães (1937), utilizando a técnica de diagnóstico indireto de Weil-Felix, listaram como prováveis reservatórios do agente da FMB, o gambá *D. aurita*, o cão *Canis familiaris*, o cachorro do mato *Dusicyon* sp (Sin. *Canis brasiliensis*), o coelho do mato *Sylvilagus brasiliensis* (Sin. *Sylvilagus minensis*), o preá *Cavia aperea* e a cutia *Dasyprocta azarae*. Foram os primeiros autores a afirmar que a FMB era uma moléstia autóctone Sul-Americana, não tendo sido importada.

Já na década de 1940, Travassos e Vallejo (1942a) estudaram, em laboratório, a hipótese de que outro animal, além do gambá, poderia albergar o agente da doença. Os autores verificaram que o cavídeo *C. aperea* (Preá) era suscetível ao agente do Tifo Exantemático do Brasil, quando inoculado em laboratório e desenvolvia a doença, à semelhança da cobaia. Já as capivaras (*Hydrochaerus hydrochaerus*) não apresentavam qualquer sintoma clínico através de inoculação experimental, embora fosse possível isolar o agente de seu sangue e órgãos, a partir do quinto dia, até 11^o dia pós-inoculação, quando o experimento fora encerrado. Embora os autores não obtiveram sucesso em nenhuma das tentativas de isolar o agente de preás e capivaras capturados em áreas de ocorrência da doença, eles constataram que alguns preás trazidos da natureza eram refratários à inoculação em laboratório pelo agente da febre maculosa brasileira. Através da experiência dos autores com o comportamento da doença em cobaias, permitiu-lhes concluir que estes animais já haviam tido contato com a doença na natureza e sobreviveram.

Em uma segunda publicação, Travassos e Vallejo (1942b) mostraram a infecção de carrapatos adultos *A. cajennense*, após se alimentarem em capivaras experimentalmente infectadas pelo agente da febre maculosa brasileira, embora os pesquisadores não puderam constatar seguramente que os carrapatos utilizados no ensaio estavam previamente livres de infecção, já que estes foram colhidos parasitando cavalos em condições naturais.

Vallejo-Freire (1947) recebeu de pesquisadores mexicanos, amostras do isolado do agente etiológico da Febre Maculosa Mexicana. Demonstraram que este material, quando inoculado em cobaias, levava os animais a apresentarem a mesma sintomatologia dos animais inoculados com o agente de Febre Maculosa Brasileira. Seguindo o experimento, o autor mostrou que o carrapato *A. aureolatum* (Sin. *A. striatum*) se infectava ao se alimentar em cobaias inoculadas com o agente da doença do México, e que o agente era transmitido trasovarialmente para os ovos, que, quando emulsionados e inoculados em cobaia, reproduziam a doença clínica.

Philip et al. (1978) publicaram, pela primeira vez, a confirmação de que o agente causador da febre maculosa brasileira era de fato a *R. rickettsii*, através da técnica de sorotipagem por microimunofluorescência. Graças a uma amostra do agente causador da Febre Maculosa Brasileira, enviado pelo Dr. Lemos Monteiro ao Dr. Parker no “Rocky Mountain Laboratory” ainda na década de 30, este isolado brasileiro pôde ser utilizado no trabalho de Philip et al. (1978).

Recentemente, no Brasil, diversas espécies de riquetsias foram isoladas em cultivo celular a partir de carrapatos. O agente da FMB, *R. rickettsii*, teve um isolamento feito a partir de um carrapato *A. aureolatum*. Esta cepa recebeu o nome de Taiaçu, em homenagem ao local de origem do carrapato, o distrito de Taiaçupeba no Município de Mogi das Cruzes, SP (PINTER; LABRUNA, 2006).

Amostras de *Rickettsia bellii* foram isoladas de *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2004a), de *Amblyomma sculpturatum* no Estado de Rondônia (LABRUNA et al., 2004c), de *A. aureolatum* no Estado de São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006), de *Haemaphysalis juxtakochi* (LABRUNA et al., 2007) e de *Ixodes loricatus* no Estado de São Paulo (HORTA et al., 2006).

A espécie *Rickettsia amblyommii* foi isolada a partir de carrapatos *A. cajennense* do Estado de Rondônia (LABRUNA et al., 2004c). A espécie *Rickettsia parkeri* foi isolada a partir de carrapatos *Amblyomma triste* do Estado de São Paulo (SILVEIRA, 2006). A espécie *R. rhipicephali* foi isolada a partir de carrapatos *Haemaphysalis juxtakochi* no Estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2007).

Há evidências moleculares para a ocorrência destas espécies de riquetsias e outras ainda indefinidas, em outras espécies de carrapatos e outras localidades do Brasil.

A bactéria *R. rickettsii* foi detectada infectando o carrapato *A. cajennense* no Estado de Minas Gerais (GUEDES et al., 2005).

Em carrapatos *Amblyomma longirostre* colhidos em Rondônia, foi detectado uma riquetsia geneticamente próxima de *R. amblyommii* (LABRUNA et al., 2004b). Em *A. dubitatum* colhidos em São Paulo, foi detectado uma espécie próxima de *R. parkeri*, nomeada de Cepa COOPERI (LABRUNA et al., 2004a) e em carrapatos *H. juxtakocki* colhidos em Rondônia, foi detectada uma riquetisa próxima de *R. rhipicephali* (LABRUNA et al., 2005a).

Além destas, Meles, Colombo e Silva (1992) e Melles, Colombo e Lemos (1999) isolaram pelo menos duas amostras de riquetsias do GFM, porém não caracterizadas, de carrapatos *A. dubitatum*, provenientes de áreas endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo.

De modo geral, as espécies de riquetsias associadas a carrapatos são transmitidas entre gerações por transmissão transovariana e perpetuam transestadialmente, fazendo dos carrapatos, importantes reservatórios da riquetsia na natureza. Para muitas espécies de riquetsia (ex. *Rickettsia africae*, *R. rhipicephali*), este mecanismo de sobrevivência na população de carrapato é tão eficiente, que possivelmente garanta, por si só, a manutenção da riquetsia na natureza. Para outras espécies de riquetsias, tal como *R. rickettsii*, este mecanismo é menos eficiente, pois a infecção por esta espécie de riquetsia no carrapato pode diminuir a capacidade reprodutiva de fêmeas adultas, podendo ser inclusive letal para o ixodídeo (BURGDORFER 1988; NIEBYLSKI, PEACOCK; SCHWAN, 1999). Portanto, mesmo que os mecanismos de transmissão transovariana e perpetuação transestadial sejam extremamente importantes para a sobrevivência de *R. rickettsii* na natureza, por si só não devem ser suficientes para a manutenção da bactéria.

Neste caso, os animais vertebrados, hospedeiros naturais dos carrapatos vetores da *R. rickettsii*, devem assumir um papel fundamental na amplificação da infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (COOKSEY; HAILE; MOUNT, 1990, RANDOLPH, 1998). Diante desta premissa, pesquisadores das Américas do Norte e do Sul vêm buscando, desde o início do século XX, encontrar animais silvestres naturalmente infectados por *R. rickettsii*, a fim de compreender melhor a ecologia da febre maculosa.

Diversos isolados de *R. rickettsii* foram obtidos nos Estados Unidos, dos roedores *Microtus pensylvanicus*, *Pitymus pinetorum*, *Peromyscus leucopus*, *Sigmodon hispidus*, do coelho silvestre *Sylvilagus floridanus* e do gambá *Didelphis virginianus* (BOZEMAN et al., 1967, BURGDORFER, 1988). Posteriores estudos nos Estados Unidos, demonstraram que quando estas espécies de roedores foram experimentalmente infectados por *R. rickettsii* em laboratório, a espécie *M. pensylvanicus* foi a mais eficiente como fonte de infecção para o carrapato *Dermacentor variabilis*, um dos principais vetores da doença naquele país. Como esta espécie de roedor é também um hospedeiro natural das fases imaturas de *D. variabilis*, ela foi incriminada como um dos principais elos no ciclo da doença naquelas áreas endêmicas. (BURGDORFER, 1988).

No Brasil, onde os carrapatos *A. cajennense* e *A. aureolatum* são os principais vetores da febre maculosa, os animais vertebrados amplificadores da *R. rickettsii* na natureza ainda permanecem desconhecidos. Embora a bactéria já tenha sido isolada de gambás no Brasil, faltam estudos demonstrando se esta espécie animal se comporta como uma importante fonte de infecção e se é um eficiente hospedeiro do carrapato vetor nas áreas endêmicas.

O Distrito de Taiaçupeba, no Município de Mogi das Cruzes, tem sido considerado uma área endêmica para febre maculosa no Estado de São Paulo, dada a ocorrência temporal de casos humanos da doença (MELLES; COLOMBO; SILVA, 1992; MELLES; COLOMBO; LEMOS, 1999; FONTES et al., 2000).

Além de Mogi das Cruzes, a febre maculosa se apresenta endêmica em vários outros municípios do Estado de São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (LEMOS et al., 1994; SEXTON et al., 1994; LEMOS et al., 2001, GALVÃO et al., 2002; ROZENTAL et al., 2002).

Na grande maioria destas áreas endêmicas, o carrapato *A. cajennense* é incriminado como o principal vetor da doença, estando geralmente presente em populações super numerosas, fruto de desequilíbrio causado pela abundância de alguns de seus hospedeiros primários, tais como eqüinos e capivaras. No entanto, o foco endêmico de Mogi das Cruzes se diferencia, por não apresentar o carrapato *A. cajennense* como vetor (PINTER, 2003).

Neste caso o carrapato *A. aureolatum* é incriminado, parasitando freqüentemente os cães, e apresentando-se como o único carrapato a parasitar os humanos residentes na área (PINTER, 2003).

Os primeiros estudos buscando levantar alguns aspectos ecológicos do foco de febre maculosa em Taiaçupeba foram realizados recentemente por Pinter et al. (2004) e Pinter e Labruna (2006). Nestes estudos, foi evidenciado que apenas o estágio adulto de *A. aureolatum* parasita os cães domésticos e eventualmente os humanos, sendo que os cães foram parasitados durante os 12 meses do ano, sem pico definido de infestação.

Através de infestações artificiais em laboratório, com carrapatos provenientes de Taiaçupeba, foi comprovado que o cão, a ratazana (*Rattus norvegicus*), um camundongo silvestre (*Calomys callosus*) e o coelho de laboratório (*Oryctolagus cuniculus*) não são hospedeiros eficientes para os estágios de larva e ninfa de *A. aureolatum*. Por outro lado, cobaios (*Cavia aperea porcellus*) e frangos (*Gallus gallus*) foram altamente eficientes. Estes resultados sugerem que as fases imaturas de *A. aureolatum* utilizam-se principalmente de alguns roedores não murinos e aves silvestres, como hospedeiros primários na natureza.

Na literatura brasileira Arzua et al. (2003) relatam que *Turdus rufiventris* é um importante hospedeiro para larvas de *A. aureolatum* na região de Curitiba, PR, além de citarem mais 15 espécies de aves como hospedeiros menos importantes: *Conopophaga lineata*, *Craniroleuca obsoleta*, *Craniroleuca pallida*, *Furnarius rufus*, *Poospiza lateralis*, *Saltator similis*, *Synallaxis cinerascens*, *Synallaxis ruficapilla*, *Tachyphonus coronatus*, *Thamnophilus*

caerulescens, *Thamnophilus ruficapillus*, *Troglodytes aedon*, *Turdus albicollis*, *Turdus amaurochalinus* e *Zonotrichia capensis*.

No Uruguai as espécies *Turdus albicollis* e *Turdus rufiventris* também já foram encontradas parasitadas por larvas de *A. aureolatum* (Venzal et al., 2005).

Poucas espécies de mamíferos já foram encontradas parasitadas por imaturos de *A. aureolatum*, os relatos mais importantes foram feitos em roedores das espécies *Ctenomys* sp e *Euryzygimatomys spinosus*. Outros relatos de menor relevância foram feitos para cachorro-mato (*Cerdocyon thous*) e uma preguiça (*Bradipus* sp) (GUGLIELMONE et al., 2003).

Por outro lado, não há registro na literatura brasileira sobre o papel representado pelas aves na história natural da Febre Maculosa Brasileira. Nos Estados Unidos, algumas espécies de aves que foram experimentalmente infectadas com *R. rickettsii*, desenvolveram um quadro de riquetsemia por cerca de 10 dias, sem qualquer sintoma clínico, indicando-as como um potencial amplificador da bactéria na natureza, embora a capacidade de atuar como fonte de infecção para carrapatos não tenha sido testada em condições de laboratório (LUNDGREN; THORPE; HASKELL, 1966).

Ainda no foco endêmico de Taiaçupeba, Pinter e Labruna (2006) encontraram, em um total de 669 adultos de *A. aureolatum* colhidos dos cães durante dois anos, 16 carrapatos (2,3%) infectados por riquetsias, sendo identificadas as espécies *R. bellii* (n = 10) e *R. rickettsii* (n = 6).

Um modelo de transmissão e perpetuação da *R. rickettsii* na natureza foi apresentado por Pinter (2003) (Figura 1). Neste modelo, aves passeriformes e preás são apontados como os principais hospedeiros das fases imaturas de *A. aureolatum* e, portanto, também seriam os principais amplificadores da bactéria *R. rickettsii* entre os carrapatos. No entanto, o modelo foi baseado em dados de infestação em laboratório e raros relatos na literatura sobre a biologia do carrapato *A. aureolatum*, o que poderia afastá-lo da situação real.

O presente estudo foi elaborado no sentido de buscar novas informações sobre quais espécies animais estão envolvidas como hospedeiros das fases imaturas do carrapato *A. aureolatum* em condições naturais e sobre a relação destes animais com a bactéria *R. rickettsii*.

Figura 1 – Modelo apresentado por Pinter (2003), representando o provável ciclo natural do carrapato *A. aureolatum* e a transmissão da bactéria *R. rickettsii* entre a população de vetores e hospedeiros vertebrados no local de estudo

2 OBJETIVOS

O presente trabalho objetivou avaliar o papel de animais silvestres na história natural da febre maculosa na área endêmica de Taiaçupeba, Município de Mogi das Cruzes, através da:

- Avaliação do parasitismo por carrapatos em aves silvestres, pequenos roedores, e didelfídeos capturados na área endêmica, ao longo de 12 meses.

- Avaliação da infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em amostras de tecidos de aves silvestres, pequenos roedores e didelfídeos capturados na área endêmica.

- Avaliação da infecção por riquetsias em amostras de carrapatos colhidos nos animais silvestres capturados durante o estudo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este tópico descreve a conduta e procedimentos utilizados durante o estudo.

3.1 ÁREA DO ESTUDO

O estudo foi realizado em áreas de fragmentos circunvizinhas às propriedades rurais onde Pinter e Labruna (2006) encontraram carrapatos *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*, colhidos de cães criados soltos e com acesso livre a fragmentos de matas, no distrito de Taiaçupeba, Município de Mogi das Cruzes, SP (Figura 2). Neste mesmo local, ocorreram casos fatais de febre maculosa recentemente (MELLES; COLOMBO; SILVA, 1992; FONTES et al., 2000).

A área se caracteriza por estar inserida no domínio da Floresta Pluvial Atlântica a uma altitude de 800m e estar parcialmente isolada pelo lago de uma barragem (Represa do Rio Jundiaí). Apresenta dois fragmentos distintos compostos de floresta secundária jovem. Os relatos apontam que estas áreas eram totalmente desmatadas e utilizadas na agricultura até meados de 1990 quando a barragem foi construída e as áreas deixaram de ser utilizadas e entraram em processo de regeneração. Na Figura 2 as áreas estão representadas como área norte com 22 ha e área sul com 18 ha.

3.2 CAPTURA DOS ANIMAIS SILVESTRES

Neste tópico há o detalhamento sobre a captura e processamento dos animais silvestres acessados neste estudo.

3.2.1 Amostragem dos animais

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), após análise do projeto, expediu a Licença nº 175/2005 - CGFAU/LIC, que autoriza a captura e sacrifício de animais silvestres nas seguintes condições: em cada captura mensal, poder-se-ia sacrificar no máximo 15 indivíduos por espécie para aves, 10 indivíduos por espécie para mamíferos com mais de 100g de peso e 20 indivíduos por espécie para mamíferos com menos de 100g de peso, sendo que fêmeas prenhes ou lactantes não deveriam ser sacrificadas.

Bozeman et al. (1967) determinaram a prevalência de animais infectados para a bactéria *R. rickettsii* em populações de roedores de diversas espécies. Entre 954 animais capturados foram encontrados cinco infectados (0,5%). Se for considerada apenas a espécie de roedor *M. pensilvanicus*, a prevalência foi determinada em 1,08% (2/185). Esta espécie de roedor é o principal hospedeiro das formas imaturas do carrapato *D. variabilis*, importante vetor no lado leste dos EUA.

Baseado nesta informação, para este estudo, foi considerada uma prevalência esperada de 1% para a presença da bactéria *R. rickettsii*. O número ideal de animais foi determinado pela fórmula de amostragem aleatória simples (THRUSFIELD, 1995), utilizando-se 95% de intervalo de confiança e precisão absoluta entre 90% e 95%. Desta forma, determinou-se um valor ótimo de captura entre quatro e 16 animais por mês. Esta estimativa do número de animais foi considerada para cada um dos três grupos pré-determinados: aves, pequenos roedores e didelfídeos, independente da espécie capturada, uma vez que o amplificador da bactéria *R. rickettsii* na natureza é desconhecido.

3.2.2 Captura dos animais

As coletas das aves foram realizadas mensalmente, durante dois a quatro dias por mês, mantendo três ou quatro semanas de intervalo entre as campanhas, por um período de um ano. Para a captura das aves foram utilizadas dez redes de neblina 3 x 14 m, com malhas de 25 e 20 mm, dispostas em linhas, alternadamente nas transecções abertas nos fragmentos amostrados (Figura 3). As redes eram abertas ao amanhecer e fechadas ao entardecer, a uma altura do solo máxima de 5 cm, sendo vistoriadas a cada 40 minutos para retirada das aves capturadas.

Figura 2 - Foto aérea (1:10.000) da região de estudo de Pinter e Labruna (2006), indicando os locais onde foram encontrados cães parasitados por adultos de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii* e os fragmentos de mata amostrados neste estudo, áreas norte (superior) e sul (inferior)

As capturas de pequenos roedores e didelfídeos foram realizadas durante a mesma semana da captura das aves, através de 12 a 16 armadilhas do tipo “live trap” (20 x 20 x 40 cm) iscadas com bacon e banana e 41 estações de pitfall. Cada estação de pitfall foi composta por quatro baldes de 35 litros cada, interligados por faixas de lona plástica de 50 cm de largura perpendiculares ao solo e sustentadas por três hastes de madeira, sendo que 26 foram construídas no fragmento norte e 15 no fragmento sul. As armadilhas tomahawk foram colocadas adjacentes a algumas estações de pitfall, sendo que o local variou entre as campanhas para aumentar o campo amostrado (Figura 3). As armadilhas foram utilizadas durante quatro a cinco noites consecutivas de cada mês, pelo mesmo período de 12 meses das capturas de aves silvestres. As armadilhas eram dispostas linearmente com distâncias de aproximadamente 20 metros entre si. As estações de pitfall foram construídas no primeiro mês de captura e permaneceram no mesmo local durante os doze meses, sendo que nos intervalos entre as campanhas, cada balde foi fechada com uma tampa apropriada para que nenhum animal fosse capturado inoportunamente.

As campanhas de capturas foram realizadas nas seguintes datas:

Primeira campanha: de 16 a 21/01/2005

Segunda campanha: de 13 a 18/02/2005

Terceira campanha: de 19 a 25 /03/2005

Quarta campanha: de 17/04 a 23/04/2005

Quinta campanha: de 23/05 a 27/05/2005

Sexta campanha: de 27/06 a 30/06/2005

Sétima campanha: de 26/07 a 30/07/2005

Oitava campanha: de 22/08 a 26/08/2005

Nona campanha: de 20/09 a 24/09/2005

Décima campanha: 24/10 a 27/10/2005

Décima primeira campanha: 21/11 a 25/11/2005

Décima segunda campanha: 19/12 a 23/12/2005

Os animais capturados foram colocados em sacos de pano e transportadas à base de trabalho para o processamento apropriado.

3.3 PROCESSAMENTO DOS ANIMAIS

Após o deslocamento até a base de pesquisa, os animais foram sedados (xilasina + quetamina) e então lhes foi colhido sangue por punção intra-cardíaca, utilizando-se agulhas 13 x 0,45 mm para animais com peso até 50g, e 20 x 0,55mm para animais com peso maior que 50g. Posteriormente, os animais, ainda anestesiados, foram sacrificados para taxidermização. Para as aves, foi utilizado o método de compressão torácica manual, que tem por princípio, provocar parada cardio-respiratória no animais. Para os mamíferos, aplicou-se solução de cloreto de potássio (KCl) intra-cardíaco.

Após a constatação clínica da morte dos animais, estes eram vistoriados para presença de carrapatos, sendo que todo ixodídeo encontrado foi retirado com auxílio de pinças e acondicionado em frasco apropriado. A carcaça do animal era então colocada em decúbito dorsal sobre uma placa de material maleável e tinha os quatro membros fixados por alfinetes traspassados por sua extremidade.

Utilizando-se pinça e tesoura, a pele e camadas musculares da região abdominal dos mamíferos e celomática das aves foram seccionadas. O instrumentário cirúrgico era esterilizado em fogo direto a cada etapa da retirada dos órgãos. Uma vez exposto, um fragmento do fígado foi retirado e acondicionado em um frasco criotubo. Após nova esterilização em fogo direto do instrumentário cirúrgico, o estômago (mamíferos) ou o pró-ventrículo (aves) foi tracionado para o exterior do animal em sentido cranial facilitando o acesso ao baço que foi pinçado e totalmente extirpado (com exceção de *Didelphis aurita*, para o qual apenas um fragmento do baço foi retirado). A transferência dos órgãos dos animais para os criotubos foi feita ao lado de um Bico de Bunsen aceso com o intuito de amenizar as chances de contaminação bacteriana.

Os criotubos então foram imediatamente acondicionados em nitrogênio líquido e ao final de cada campanha foram transportados até o local de armazenamento final em freezer – 80° C no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

As carcaças dos animais sacrificadas foram colocadas em sacos plásticos transparentes, fechados hermeticamente, para que carrapatos que eventualmente não tivessem sido retirados durante a vistoria, fossem colhidos após se desprenderem naturalmente do hospedeiro. Após 24 à 48 horas os sacos com os animais eram abertos e as carcaças das aves eram armazenadas em congelador -20°C e as dos mamíferos em solução de Formol 10%. Os

Figura 3 – Esquema real da disposição das redes de neblina, estações de pitfall e armadilhas tomahawk.

animais sacrificados foram identificados por especialistas e encaminhados para o Museu de Zoologia da USP, onde foram tombados e depositados em coleção zoológica.

3.4 IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS

Todos os carrapatos encontrados nos animais foram mantidos vivos em frascos plásticos a temperatura entre 22°C e 25°C, e umidade relativa superior a 90%. Os carrapatos foram transportados ao laboratório, onde foram identificados taxonomicamente.

Carrapatos do gênero *Amblyomma* colhidos nos estágios imaturos (larvas ou ninfas), que se mantiveram vivos durante o transporte até o laboratório, foram alimentados em coelhos (se necessário) e mantidos em laboratório até que atingissem o estágio adulto, conforme descrito por Labruna et al. (2002). Este procedimento teve o objetivo de possibilitar a identificação da espécie de *Amblyomma*, já que não existe literatura disponível para identificação taxonômica para os estágios imaturos da maioria das espécies de *Amblyomma* do Brasil.

A identificação taxonômica da espécie de *Amblyomma*, diretamente através do estágio ninfal, foi possível apenas para a espécie *Amblyomma longirostre*, que apresenta duas características, possivelmente autopomórficas: hipostômio em formato de lança (Figura 4) e escudo tão longo quanto largo. As demais ninfas de *Amblyomma* spp conhecidas no Brasil apresentam hipostômio espatulado (Figura 5) e escudo mais largo do que longo.

Figura 4 – Hipostômio em forma de lança (detalhe)

Figura 5 – Hipostômio em formato espatulado

Para os carrapatos do gênero *Ixodes*, a identificação morfológica da espécie foi possível mesmo nas fases imaturas, através de análise comparativa com larvas e ninfas das espécies de *Ixodes* do Brasil, obtidas através de colônias de laboratório e dados da literatura (LABRUNA et al., 2005b, MARQUES et al., 2004). Para os exemplares do gênero *Haemaphysalis*, a identificação da espécie foi possível para os estágios imaturos de acordo com a literatura (COOLEY 1946). Uma vez identificados, os carrapatos foram armazenados em álcool isopropílico para posterior pesquisa de DNA de riquetsias.

Quando a identificação taxonômica não foi possível por caracteres morfológicos, utilizou-se a metodologia de amplificação e sequenciamento do fragmento do gene ribossômico-mitocondrial 16S (rRNA 16S mitocondrial). O DNA extraído de cada carrapato (descrito a seguir) foi submetido à reação de PCR (reação em cadeia pela polimerase). Os oligonucleotídeos iniciadores específicos para amplificação de um fragmento de 460 pares de bases foram F:5'-CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG-3' (16S + 1, BLACK; PIESMAN, 1994) e R:5' - CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3' (16S -1, BLACK; PIESMAN, 1994) como descrito por Mangold, Bargues e Mas-Coma (1998). O material amplificado foi sequenciado utilizando-se a metodologia de Sanger com reagente com ddNTP marcado BigDye 3.1 (Applied Biosystem, Foster, CA), conforme as instruções do protocolo do reagente e sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem, Foster, CA).

A análise dos cromatogramas gerados pelo sequenciador foi feita pelo programa de computador SeqMan (Lasergene; DNASTar, Madison, Wis.) e apenas trechos do sequenciamento com índice de qualidade maior ou igual a 20 (chance máxima de erro igual a 1%) foram consideradas e seqüências com menos de 100 bases com alta qualidade foram descartadas. O alinhamento foi feito pelo programa *BLAST two sequences analysis* (ALTSCHUL et al., 1990). As seqüências geradas então eram confrontadas com seqüências conhecidas de espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*. A identidade da seqüência foi conferida àquelas que obtiveram similaridade maior ou igual a 98% com uma das seqüências das espécies de carrapatos conhecidas.

O gene ribossômico-mitocondrial 16S é um importante marcador molecular para diferenciar espécies. A tabela 1 mostra o resultado de similaridade de alinhamento entre seqüências de carrapatos conhecidas. Não houve nenhum pareamento com similaridade maior do que 87,5%, o que oferece suporte ao critério adotado neste trabalho, de considerar seqüências de uma mesma espécie somente quando a similaridade for maior ou igual a 98%.

Tabela 1 – Porcentagem de similaridade e divergência do fragmento do gene 16S mitocondrial para algumas espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*.

				Porcentagem de Similaridade			
	A.aur	A.caj	A.dub	A.lon	A.ova	A.par	A.tig
<i>A. aureolatum</i>		84,8	84,3	85,3	86,1	85,3	82,5
<i>A. cajennense</i>	15,2		84,1	82,6	85,0	82,3	83,3
<i>A. dubitatum</i>	15,7	15,9		87,3	84,2	86,5	83,9
<i>A. longirostre</i>	14,7	17,4	12,7		84,5	87,5	84,1
<i>A. ovale</i>	13,9	15,0	15,8	15,5		83,4	84,2
<i>A. parkeri</i>	14,7	13,5	12,5	12,5	16,6		84,5
<i>A. tigrinum</i>	17,5	16,1	15,9	15,9	15,8	15,5	
	Porcentagem de Divergência						

3.5 PESQUISA DE INFECÇÃO POR RIQUÉTSIAS NOS CARRAPATOS

Cada carrapato foi individualmente processado para extração de DNA. Carrapatos nos estádios de larva ou ninfa foram colocados em microtubos plásticos de 1,5 ml, aos quais foram acrescentados 30 µl de TE, sendo os carrapatos macerados com micropistilos. Os tubos foram levados ao termobloco à temperatura de 100° C por 15 min. Para os carrapatos colhidos no estágio adulto, a extração de DNA foi executada utilizando-se o kit Tissue Kit® (Quiagen – Maryland, EUA), segundo o protocolo para isolamento de DNA de insetos.

O DNA extraído foi inicialmente submetido à PCR usando-se oligonucleotídeos iniciadores de altíssima sensibilidade que amplificam um fragmento de 147 pares de nucleotídeos do gene *citrato sintase*, descrito por Labruna et al. (2004a), presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia*. Uma vez positivos para esta PCR, amostras de DNA do mesmo carrapato foram submetidas a PCRs utilizando-se, separadamente, dois pares de oligonucleotídeos iniciadores que amplificam, respectivamente, um fragmentos de 512 pares de bases do gene *ompA*, presentes apenas nas espécies de riquetsias do grupo da febre maculosa e um fragmento maior do gene *gltA* com 401 pares de bases. Somente as amostras positivas para a segunda reação foram consideradas verdadeiramente positivas, pois são reações mais específicas.

O material genético extraído dos carrapatos, se positivos para os genes *gltA* e *ompA*, foi então processado em duas novas PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para um fragmento de 660 pares de bases do gene *ompB* e para um fragmento de 434 pares de bases para o gene codificador da proteína 17 kDa (*htrA*). Os protocolos para PCR foram os mesmos

utilizados por Labruna et al. (2004a), a lista de oligonucleotídeos iniciadores está representada na tabela 2.

Os carrapatos que se mostraram positivos para o gene *ompA* tiveram o fragmento amplificado submetido à reação de seqüenciamento genômico como descrito para o gene ribossômico-mitocondrial 16S no item 3.4. Os carrapatos que se mostraram positivos apenas para o gene *gltA* tiveram um fragmento amplificado de 401 pares de bases submetido à reação de seqüenciamento. As seqüências obtidas foram submetidas ao programa “BLAST analysis” (ALTSCHUL et al., 1990) para determinar similaridades com outras espécies de riquetsias.

Tabela 2 – Lista de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificar genes de riquetsias

Gene	ólígos	Seqüência dos óligos	referência	Posição do gene relativo à fase de leitura
<i>gltA</i> 1	CS-5	GAGAGAAAATTATATATCCAAATGTTGAT	Labruna et al., 2004a	922 a 948
	CS-6	AGGGTCTTCGTGCATTCTT		1068 a 1049
	2	CS-78	Labruna et al., 2004a	-78 a -56
	CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		323 a 296
<i>htrA</i> 3	17kD1	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	Webb et al., 1990	31 a 50
	17kD2	CATTGTTCGTCAGGTTGGCG		464 a 445
<i>ompA</i> 4	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	Regnery et al., 1991	478 a 499
	Rr190.602n	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT		990 a 969
<i>ompB</i> 5	Rr120.501p	GGCAATTAATATCGCTGACGG	Eremeeva et al, 1994	696-716
	Rr120.1000n	GCATCTGCACTAGCACTTTC		1349-1330

3.6 ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE RIQUEÍSIAS EM TECIDOS DE ANIMAIS SILVESTRES

As amostras de baço de cada animal, após descongeladas à 37° C, tiveram uma alíquota (~10 µg) retirada e submetida à extração de DNA utilizando-se o kit comercial Dneasy Tissue Kit® (Quiagen – Maryland, EUA), segundo o protocolo para isolamento de DNA de tecidos animais. O material genético extraído foi utilizado na reação de PCR como descrito para os carrapatos (item 3.5). Concomitantemente fragmentos do baço foram submetidos às técnicas de isolamento de riquetsias.

Para as nove primeiras amostras dos animais processadas, o macerado do restante do baço foi inoculado diretamente em cultivo de células Vero pela técnica de “Shell vial”. Como controle positivo foi utilizado fragmentos de baço de cobaias infectadas em laboratório com a bactéria *R. rickettsii* e sacrificadas entre o 5º e 7º dia após a infecção. Um “shell vial” consiste em um tubo cilíndrico, com fundo raso, no qual é estabelecida uma monocamada de células Vero com o intuito de isolar organismos intracelulares obrigatórios. Dois destes tubos foram utilizados para cada animal, sendo que alíquotas do baço foram inoculadas individualmente em cada tubo.

Os tubos inoculados foram imediatamente centrifugados por uma hora a 600 g a 22°C. Após isso, a monocamada de células Vero foi lavada com meio “Minimum Essential Medium”(MEM), contendo 5% de soro de bezerro bovino. Então, 1 ml do mesmo meio foi colocado em cada tubo, os quais foram incubados às temperaturas de 28 e 32°C (um tubo para cada temperatura). Após três dias, o meio líquido de cada tubo foi centrifugado e o sedimento foi fixado em lâmina de vidro, a qual foi corada pelo método de Gimenez (GIMÉNEZ, 1964), para visualização de estruturas tipo riquetsias no interior das células (LABRUNA et al., 2004a).

No entanto, devido ao fato de que os controles positivos (baço de cobaia infectada) se mostraram negativos no isolamento com células Vero, optou-se por modificar a metodologia para uma técnica mais sensível, utilizando-se cobaias como descrito por Bozeman et al. (1967). Assim, após a retirada de uma alíquota para a PCR, o restante do baço foi macerado utilizando-se cadinho e pistilo e inoculado em cobaias pela via intraperitoneal. Os macerados foram feitos em grupos de até seis baços de animais do mesmo gênero taxonômico. Cada macerado de um grupo de baços de animais do mesmo gênero foi inoculado em duas cobaias (*Cavia aperea porcellus*). Estas cobaias tiveram a temperatura corporal mensurada diariamente entre do primeiro ao 21º dia após a inoculação. Se alguma cobaia apresentasse

hipertermia ($T^{\circ}\text{C} > 39,5^{\circ}\text{C}$) por um período de 3 dias consecutivos e se o material do baço inoculado se apresentasse positivo para a presença de riquetsias pelo teste de PCR, o animal silvestre cujo baço foi originado seria considerado infectado para riquetsia.

3.7 PESQUISA DE CARRAPATOS EM CÃES

Durante as 12 campanhas mensais de captura de animais, cães domésticos de propriedades rurais da área do estudo foram examinados para infestação por carrapatos. Os carrapatos encontrados foram identificados conforme a espécie.

3.8 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Com base nos dados de parasitismo dos carrapatos nos diferentes grupos de animais foram calculados valores de abundância parasitária média e intensidade parasitária média. Segundo Bush et al. (1997), abundância parasitária média é o valor do número total de indivíduos de uma espécie particular de parasita em uma amostra de uma espécie particular de hospedeiro dividido pelo número total de hospedeiro desta espécie examinada (incluindo ambos hospedeiros infestados e não infestados), enquanto que intensidade parasitária média é o valor do número total de indivíduos de uma espécie particular de parasita em uma amostra de uma espécie particular de hospedeiro dividido pelo número total de hospedeiros parasitados desta espécie examinada (não estão incluídos os hospedeiros não parasitados).

Os resultados de parasitismo por carrapatos foram analisados pelo teste estatístico de normalidade Anderson-Darling. Uma vez determinado que os valores não tinham distribuição normal ($p < 0,005$), foi utilizado o teste Kruskal-Wallis para K variáveis e o teste de Mann-Whitney, quando foi necessário comparar as variáveis duas a duas, os cálculos foram feitos no programa para computador SPSS 14.0 *for Windows* – LEAD Technologies.

Os carrapatos colhidos foram divididos por espécie e estágio evolutivo e comparados ao grupo de espécies hospedeiras e mês do ano em que foram colhidos. Apenas para as aves houve divisão em grupos segundo o estrato vertical em que cada espécie de ave tem preferência em habitar. As espécies de aves capturadas foram classificadas em seis estratos

verticais, segundo Parker, Stotz e Fitzpatrick (1996). Os estratos foram: Terrestre/sub-bosque; Sub-bosque; Sub-bosque/bosque; Bosque/Dossel; Dossel e Terrestre/Dossel (Tabela 3 e Figura 6)

Tabela 3 – Classificação das aves segundo o estrato vertical da floresta em que preferencialmente habitam

Ordem	Família	Espécie	Estrato
Piciformes	Picidae	<i>Celeus flavescens</i>	Bosque/Dossel
Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Bosque/Dossel
Falconiformes	Accipitridae	<i>Rupornis magnirostris</i>	Dossel
Passeriforme	Thraupidae	<i>Thraupis sayaca</i>	Dossel
Passeriforme	Tyrannidae	<i>Megarynchus pitangua</i>	Dossel
Passeriforme	Tyrannidae	<i>Tolmomyias sulphureus</i>	Dossel
Passeriforme	Furnariidae	<i>Synallaxis ruficapilla</i>	Sub-bosque
Passeriforme	Furnariidae	<i>Syndactyla rufosuperciliata</i>	Sub-bosque
Passeriforme	Parulidae	<i>Basileuterus leucoblepharus</i>	Sub-bosque
Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Pyriglena leucoptera</i>	Sub-bosque
Passeriforme	Tityridae	<i>Schiffornis virescens</i>	Sub-bosque
Passeriforme	Tyrannidae	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Sub-bosque
Passeriforme	Dendrocolaptidae	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	Sub-bosque/Bosque
Passeriforme	Furnariidae	<i>Xenops minutus</i>	Sub-bosque/Bosque
Passeriforme	Parulidae	<i>Basileuterus culicivorus</i>	Sub-bosque/Bosque
Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sub-bosque/Bosque
Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Dysithamnus mentalis</i>	Sub-bosque/Bosque
Passeriforme	Thraupidae	<i>Trichothraupis melanops</i>	Sub-bosque/Bosque
Passeriforme	Tyrannidae	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	Sub-bosque/Bosque
Passeriforme	Tyrannidae	<i>Mionectes rufiventris</i>	Sub-bosque/Bosque
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga ani</i>	Terrestre/Dossel
Passeriforme	Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i>	Terrestre/Dossel
Passeriforme	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Terrestre/Dossel
Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Terrestre/Sub-bosque

Figura 6 – Desenho esquemático da Mata Pluvial Atlântica com a delimitação ilustrativa dos estratos verticais utilizados para agrupar as espécies de aves capturadas neste estudo

4 RESULTADOS

Neste tópico serão apresentados os resultados do estudo.

4.1 CAPTURA DE ANIMAIS SILVESTRES

O número de animais amostrados sofreu influência direta da capacidade de suporte da área para cada espécie. Após doze campanhas, 243 animais foram capturados sendo 46 didelfídeos (Tabela 4), 76 aves (Tabela 5) e 121 roedores (Tabela 6) (Figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12). Todos os animais foram sacrificados, com exceção de dois animais que estavam apresentando sinais de estarem lactantes e foram liberados após o exame do pelame. Órgãos de quatro didelfídeos e seis roedores não foram armazenados, pois os animais já foram encontrados mortos nas armadilhas, e apresentavam os tecidos em estado avançado de autólise. Para quatro aves não foi possível retirar o baço devido a dificuldades no procedimento de necropsia.

Foram capturadas aves de cinco ordens diferentes: Columbiformes (8), Cuculiformes (2), Falconiformes(1), Passeriformes (64) e Piciformes (1). As aves capturadas da ordem Passeriforme se distribuíram em nove famílias: Dendrocolaptidae (4), Furnariidae (5), Parulidae (2), Pipridae (16), Thamnophilidae (8), Thraupidae (10), Tityridae (2), Turdidae (1), Tyrannidae(16).

Todos os roedores capturados pertenciam à família Cricetidae e sub-família Sigmodontinae. Assim como todos os didelfídeos pertenciam à família Didelphidae e sub-família Didelphinae.

As aves foram classificadas de acordo com o estrato vertical que ocupam preferencialmente na mata. Os estratos com maior número de aves capturadas foram o “sub-bosque/bosque” (com 34 aves capturadas durante todo o ano, exceto no mês de outubro) e o “sub-bosque” (com 13 aves capturadas durante todo o ano, exceto nos meses de julho e outubro) (Figura 13).

Figura 7 – Ave capturada da espécie *Pyriglena leucoptera*

Figura 8 – Ave da espécie *Chiroxiphia caudata* sendo retirada da rede

Figura 9 – Rede de neblina armada em trilha na mata

Figura 10 – Estação de Pitfall armada na mata

Figura 11 – Roedor capturado em armadilha Pitfall

Figura 12 – Didelfídeo capturado da espécie *Monodelphis americana*

Tabela 4 - Dados dos didelfídeos capturados de janeiro a dezembro de 2005 e presença de carrapatos (L=larva(s); N=ninfa(s); M=macho(s) e F=fêmea(s))

Identificação	Data	Espécie	Mata	Carrapatos
VPS 039	17/02	<i>Didelphis aurita</i>	Norte	9F - <i>Ixodes loricatus</i>
VPS 040	17/02	<i>Didelphis aurita</i>	Sul	1L - <i>A. dubitatum</i> * e 1L - <i>A. dubitatum</i> ***
VPS 044	18/02	<i>Didelphis aurita</i>	Sul	1M e 6F - <i>I. loricatus</i>
VPS 064	23/03	<i>Didelphis aurita</i>	Sul	1M e 4F - <i>I. loricatus</i>
VPS 084	24/03	<i>Didelphis aurita</i>	Sul	1L - <i>H. juxtakochi</i> **
VPS 166	29/07	<i>Didelphis aurita</i>	Norte	
VPS 172	29/07	<i>Didelphis aurita</i>	Sul	
VPS 173	29/07	<i>Didelphis aurita</i>	Sul	
VPS 192	23/09	<i>Didelphis aurita</i>	Sul	1M e 1F - <i>I. loricatus</i>
VPS 199	26/10	<i>Didelphis aurita</i>	Norte	
VPS 200	26/10	<i>Didelphis aurita</i>	Norte	3F - <i>I. loricatus</i>
				1L - <i>A. dubitatum</i> ***
VPS 201	26/10	<i>Didelphis aurita</i>	Norte	1F - <i>I. loricatus</i>
VPS 203	22/11	<i>Didelphis aurita</i>	Sul	
VPS 208	23/11	<i>Didelphis aurita</i>	Norte	2F - <i>I. loricatus</i>
VPS 212	24/11	<i>Didelphis aurita</i>	Norte	
VPS 013	18/01	<i>Gracilianus microtarsus</i>	Sul	
VPS 121	24/05	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 122	25/05	<i>Marmosops</i> sp	Sul	
VPS 131	25/05	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 132	25/05	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 182	25/08	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 001	17/01	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 016	19/01	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 017	19/01	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 020	19/01	<i>Marmosops</i> sp	Sul	2L - <i>I. loricatus</i>
VPS 052	22/03	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 061	23/03	<i>Marmosops</i> sp	Norte	
VPS 217	20/12	<i>Marmosops</i> sp	Norte	1L - <i>I. loricatus</i>
VPS 004	17/01	<i>Monodelphis americana</i>	Sul	1L - <i>I. loricatus</i>
VPS 029	15/02	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	
VPS 030	16/02	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	5L - <i>I. loricatus</i>
VPS 033	16/02	<i>Monodelphis americana</i>	Sul	1N - <i>I. aragaoi</i>
VPS 042	18/02	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	1N e 1L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 043	18/02	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	1L - <i>I. loricatus</i>
		<i>Monodelphis americana</i>		2L - <i>I. loricatus</i>
VPS 067	23/03		Norte	1L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 073	24/03	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	
VPS 089	21/04	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	
VPS 133	25/05	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	
		<i>Monodelphis americana</i>		4L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 189	21/09		Norte	3N - <i>I. loricatus</i>
VPS 191	21/09	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	
VPS 198	26/10	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	1N - <i>I. loricatus</i>
VPS 216	20/12	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	1N - <i>I. aragaoi</i>
VPS 219	21/12	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	11N - <i>I. aragaoi</i>
VPS 220	21/12	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	
VPS 232	21/12	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	
VPS 238	21/12	<i>Monodelphis americana</i>	Norte	

* Criado até a fase adulta; ** Criado até a fase de ninfa; *** Diagnóstico molecular

Tabela 5 - Dados das aves capturados de janeiro a dezembro de 2005 e presença de carrapatos (L=larva(s); N=ninfa(s); M=macho(s) e F=fêmea(s))

Id.	Data	Ordem	Família	Espécie	Mata	Carrapatos
VPS 023	13/02	Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Norte	
VPS 026	15/02	Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Sul	
VPS 027	15/02	Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Sul	
VPS 070	23/03	Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Sul	
VPS 071	23/03	Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Sul	
VPS 072	23/03	Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Sul	
VPS 159	28/07	Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Sul	
VPS 174	23/08	Columbriforme	Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i>	Sul	
VPS 143	28/06	Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga ani</i>	Sul	
VPS 144	28/06	Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga ani</i>	Sul	
VPS 195	25/10	Falconiformes	Accipitridae	<i>Rupornis magnirostris</i>		
VPS 162	28/07	Passeriforme	Dendrocolaptidae	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	Sul	2L - <i>Amblyomma</i> sp 2L - <i>A. longirostre</i> **
VPS 170	29/07	Passeriforme	Dendrocolaptidae	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	Sul	3L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 184	25/08	Passeriforme	Dendrocolaptidae	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	Norte	1L - <i>A. longirostre</i> **
VPS 185	25/08	Passeriforme	Dendrocolaptidae	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	Norte	1L - <i>Amblyomma</i> sp 1L - <i>A. longirostre</i> *** 3L - <i>A. parkeri</i> ***
VPS 050	20/03	Passeriforme	Furnariidae	<i>Synallaxis ruficapilla</i>	Norte	
VPS 140	28/06	Passeriforme	Furnariidae	<i>Synallaxis ruficapilla</i>	Sul	
VPS 015	18/01	Passeriforme	Furnariidae	<i>Syndactyla rufosuperciliata</i>	Norte	
VPS 154	27/07	Passeriforme	Furnariidae	<i>Xenops minutus</i>	Sul	
VPS 186	21/09	Passeriforme	Furnariidae	<i>Xenops minutus</i>	Sul	1L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 024	13/02	Passeriforme	Parulidae	<i>Basileuterus culicivorus</i>	Norte	
VPS 239	21/12	Passeriforme	Parulidae	<i>Basileuterus leucoblepharus</i>	Norte	
VPS 021	13/02	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Norte	
VPS 055	23/03	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 087	15/04	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 138	26/05	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	1L - <i>A. longirostre</i> **
VPS 139	28/06	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	2L - <i>Amblyomma</i> sp 3L - <i>A. longirostre</i> ** 1L - <i>A. Longirostre</i> ***
VPS 155	27/07	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 156	27/07	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 167	29/07	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 163	29/07	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	4L - <i>A. longirostre</i> *** 2L - <i>Amblyomma</i> sp 10L - <i>Amblyomma</i> sp 5L - <i>A. longirostre</i> *** 1N - <i>A. parkeri</i> ***
VPS 175	24/08	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	2L - <i>Amblyomma</i> sp 1L - <i>A. longirostre</i> ** 1L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 177	24/08	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	1L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 178	24/08	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 188	22/09	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 190	22/09	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Norte	
VPS 207	22/11	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 218	20/12	Passeriforme	Pipridae	<i>Chiroxiphia caudata</i>	Sul	
VPS 168	29/07	Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Dysithamnus mentalis</i>	Sul	
VPS 171	29/07	Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Dysithamnus mentalis</i>	Sul	2L - <i>Amblyomma</i> sp 3L - <i>A. parkeri</i> *** 6L - <i>A. longirostre</i> **
VPS 010	18/01	Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Dysithamnus mentalis</i>	Norte	
VPS 022	13/02	Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Pyriglena leucoptera</i>	Norte	
VPS 109	22/04	Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Pyriglena leucoptera</i>	Sul	19L e 1N - <i>A. aureolatum</i> ***

Id.	Data	Ordem	Família	Espécie	Mata	Carrapatos
VPS 113	24/05	Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Pyriglena leucoptera</i>	Sul	1 N e 3L - <i>A. aureolatum</i> *** 1L - <i>Amblyomma</i> sp 1L - <i>A. longirostre</i> ** 1L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 176	24/08	Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Pyriglena leucoptera</i>	Sul	7L - <i>A. aureolatum</i> *** 1N - <i>A. aureolatum</i> * 2L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 213	24/11	Passeriforme	Thamnophilidae	<i>Pyriglena leucoptera</i>	Norte	1L - <i>H. juxtakochi</i> **
VPS 025	15/02	Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Sul	
VPS 112	22/04	Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Sul	
VPS 161	28/07	Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Sul	1L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 194	25/10	Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Sul	
VPS 227	21/12	Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Norte	1N - <i>A. longirostre</i>
VPS 236	21/12	Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>	Norte	1N - <i>A. longirostre</i>
VPS 243	22/12	Passeriforme	Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i>		
VPS 205	22/11	Passeriforme	Thraupidae	<i>Thraupis sayaca</i>	Sul	
VPS 141	28/06	Passeriforme	Thraupidae	<i>Trichothraupis melanops</i>	Sul	10L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 158	28/07	Passeriforme	Thraupidae	<i>Trichothraupis melanops</i>	Sul	2L - <i>A. longirostre</i> *** 2L - <i>A. longirostre</i> ** 1L - <i>Ixodes</i> sp 1N - <i>A. longirostre</i>
VPS 086	15/04	Passeriforme	Tityridae	<i>Schiffornis virescens</i>	Sul	
VPS 183	25/08	Passeriforme	Tityridae	<i>Schiffornis virescens</i>	Sul	
VPS 214	20/12	Passeriforme	Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i>	Sul	
VPS 111	22/04	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	Sul	1L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 145	28/06	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	Sul	2L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 242	22/12	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	Sul	
VPS 028	15/02	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Megarynchus pitangua</i>	Sul	
VPS 085	15/04	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Mionectes rufiventris</i>	Sul	3L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 110	22/04	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Mionectes rufiventris</i>	Sul	
VPS 142	28/06	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Mionectes rufiventris</i>	Sul	4L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 054	23/03	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Sul	
VPS 157	28/07	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Sul	
VPS 165	29/07	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Sul	
VPS 196	25/10	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Sul	
VPS 197	25/10	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Sul	
VPS 204	22/11	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Sul	
VPS 179	24/08	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Norte	
VPS 187	22/09	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	Norte	1L - <i>Amblyomma</i> sp
VPS 169	29/07	Passeriforme	Tyrannidae	<i>Tolmomyias sulphurescens</i>	Sul	1L - <i>A. longirostre</i> ** 1L - <i>A. longirostre</i> ***
VPS 235	21/12	Piciformes	Picidae	<i>Celeus flavescens</i>	Norte	

* Criado até a fase adulta; ** Criado até a fase de ninfa; *** Diagnóstico molecular

Tabela 6 - Dados dos roedores capturados de janeiro a dezembro de 2005 e presença de carrapatos (L=larva(s); N=ninfa(s); M=macho(s) e F=fêmea(s))

Id.	Data	Espécie	Mata	Carrapatos
VPS 035	17/02	?	Norte	
VPS 005	17/01	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 006	17/01	<i>Akodon</i> sp	Sul	1L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 008	17/01	<i>Akodon</i> sp	Sul	2L - <i>I. loricatus</i>
VPS 009	17/01	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 011	18/01	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 012	18/01	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 014	18/01	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 018	19/01	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 019	19/01	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 032	16/02	<i>Akodon</i> sp	Sul	4L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 036	17/02	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 038	17/02	<i>Akodon</i> sp	Sul	1N - <i>I. aragaoi</i>
VPS 045	15/03	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 048	15/03	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 049	15/03	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 051	22/03	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 053	23/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 056	23/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 057	23/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 059	23/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 060	23/03	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 075	24/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 078	24/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 080	24/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 081	24/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 082	24/03	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 090	21/04	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 091	21/04	<i>Akodon</i> sp	Norte	2L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 092	21/04	<i>Akodon</i> sp	Sul	4L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 095	22/04	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 097	22/04	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 098	22/04	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 099	22/04	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 102	22/04	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 103	22/04	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 105	22/04	<i>Akodon</i> sp	Sul	1L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 107	22/04	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 108	22/04	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 114	24/05	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 115	24/05	<i>Akodon</i> sp	Sul	1N - <i>I. loricatus</i>
VPS 116	24/05	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 117	24/05	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 118	24/05	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 119	24/05	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 120	24/05	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 123	25/05	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 124	25/05	<i>Akodon</i> sp	Sul	

Id.	Data	Espécie	Mata	Carrapatos
VPS 134	25/05	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 135	25/05	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 137	25/05	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 146	28/06	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 147	28/06	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 148	28/06	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 149	29/06	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 151	29/06	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 152	29/06	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 153	29/06	<i>Akodon</i> sp	Sul	1L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 160	28/07	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 164	29/07	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 180	25/08	<i>Akodon</i> sp	Sul	1L e 2N - <i>I. aragaoi</i>
VPS 193	21/09	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 206	22/11	<i>Akodon</i> sp	Sul	
VPS 209	24/11	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 221	21/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 222	21/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 224	21/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 226	21/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 230	21/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 231	21/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 234	21/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 240	22/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 241	22/12	<i>Akodon</i> sp	Norte	
VPS 002	17/01	<i>Bibimes labiosus</i>	Norte	
VPS 181	25/08	<i>Bibimes labiosus</i>	Norte	
VPS 237	21/12	<i>Brucepattersonius</i> sp	Norte	6L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 046	15/03	<i>Holochilus brasiliensis</i>	Norte	
VPS 003	17/01	<i>Juliomys pictips</i>	Norte	
VPS 007	17/01	<i>Juliomys pictips</i>	Sul	1L - <i>I. loricatus</i>
VPS 031	16/02	<i>Juliomys pictips</i>	Norte	
VPS 037	17/02	<i>Juliomys pictips</i>	Sul	
VPS 062	23/03	<i>Juliomys pictips</i>	Sul	1L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 066	23/03	<i>Juliomys pictips</i>	Norte	
VPS 068	23/03	<i>Juliomys pictips</i>	Norte	
VPS 076	24/03	<i>Juliomys pictips</i>	Sul	
VPS 079	24/03	<i>Juliomys pictips</i>	Sul	1L - <i>I. loricatus</i>
VPS 083	24/03	<i>Juliomys pictips</i>	Sul	1N - <i>I. loricatus</i>
VPS 202	22/11	<i>Juliomys pictips</i>	Norte	1M e 3N - <i>I. loricatus</i>
VPS 225	21/12	<i>Juliomys pictips</i>	Norte	
VPS 229	21/12	<i>Juliomys pictips</i>	Norte	3N e 1L - <i>I. loricatus</i>
VPS 233	21/12	<i>Juliomys pictips</i>	Norte	
VPS 223	21/12	<i>Nectomys squamipes</i>	Norte	
VPS 047	15/03	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	
VPS 058	23/03	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 063	23/03	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	1N - <i>I. loricatus</i>
VPS 065	23/03	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	1N e 2L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 069	23/03	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 074	24/03	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	

Id.	Data	Espécie	Mata	Carrapatos
VPS 077	24/03	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 088	21/04	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	1N - <i>I. loricatus</i>
VPS 093	22/04	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 094	22/04	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 096	22/04	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	
VPS 100	22/04	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	2L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 101	22/04	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	1L - <i>I. aragaoi</i>
VPS 104	22/04	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 106	22/04	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 125	25/05	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 126	25/05	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 127	25/05	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 128	25/05	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 129	25/05	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	1N - <i>I. aragaoi</i>
VPS 130	25/05	<i>Oligorysomys</i> sp	Sul	
VPS 136	25/05	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	
VPS 150	29/06	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	
VPS 215	20/12	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	1L - <i>I. loricatus</i>
VPS 228	21/12	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	
VPS 034	17/02	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	
VPS 041	18/02	<i>Oligorysomys</i> sp	Norte	
VPS 210	24/11	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	Norte	
VPS 211	24/11	<i>Rhipidomys mastacalis</i>	Norte

Figura 13 – Aves capturas de acordo com os estratos verticais da mata contemplados durante os 12 meses de estudo. Os números de 1 a 6 são referentes aos seguintes estratos: 1 – Terrestre/sub-bosque; 2 – Sub-bosque; 3 – Sub-bosque/bosque; 4 – Bosque/dossel; 5 – Dossel; 6 – Terrestre/dossel

4.2 PARASITISMO POR CARRAPATOS

Durante os 12 meses do estudo, foram encontrados 247 carrapatos parasitando animais silvestres capturados nos fragmentos de mata. Foram identificados três gêneros e sete espécies de carrapatos: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma parkeri*, *Haemaphysalis juxtakochi*, *Ixodes aragaoi* e *Ixodes loricatus*. Alguns exemplares não tiveram a espécie determinada, sendo indentificados como *Amblyomma* sp e *Ixodes* sp.

A identificação genotípica através de fragmento do gene mitocondrial ribossômico 16S foi utilizada com sucesso para 83 carrapatos imaturos enquanto que a técnica de alimentação em coelhos no laboratório foi eficiente para 22 carrapatos imaturos. Através destas técnicas foi possível identificar 105 carrapatos imaturos dos gêneros *Amblyomma* e *Haemaphysalis*. As espécies encontradas foram *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. longirostre*, *A. parkeri* e *H. juxtakochi*. Não foi possível identificar a espécie de 23 exemplares do gênero *Amblyomma* e 1 exemplar do gênero *Ixodes*.

A identificação morfológica direta pelo estágio imaturo foi possível para 51 carrapatos da espécie *I. aragaoi* e 64 carrapatos da espécie *I. loricatus* e apenas três imaturos de *A. longirostre*. Apenas carrapatos da espécie *I. loricatus* foram colhidos no estágio adulto. Dados sobre o estágio parasitário e o método para a identificação dos carrapatos colhidos sobre os animais silvestres estão representados nas tabelas 4, 5 e 7.

Vinte e um didelfídeos (44,6%) foram encontrados parasitados por 69 carrapatos, distribuídos nas seguintes espécies: *I. loricatus* (n=45), *I. aragaoi* (n=20), *A. dubitatum* (n=3) e *H. juxtakochi* (n=1) (Anexo 1). Vinte e seis aves (34,2%) foram encontradas parasitadas por 128 carrapatos, distribuídos nas seguintes espécies: *A. longirostre* (n=64), *A. aureolatum* (n=32), *A. parkeri* (n=7), *Amblyomma* sp (n=23), *H. juxtakochi* (n=1) e *Ixodes* sp (n=1) (Anexo 2). Vinte e quatro roedores (19,8%) foram encontrados parasitados por 50 carrapatos, sendo *I. aragaoi* (n=31) e *I. loricatus* (n=19) (Anexo 3).

Apenas aves da ordem Passeriforme foram encontradas parasitadas por carrapatos. A abundância média da infestação e a intensidade média de infestação estão representadas na Tabela 7. A espécie *A. aureolatum* mostrou o maior valor para intensidade média de parasitismo, já que todos os 32 exemplares desta espécie (29 larvas e 3 ninfas) foram encontrados em apenas três indivíduos, todos da espécie *Pyriglena leucoptera*. Os pássaros com maior ocorrência de parasitismo foram as seguintes espécies: *X. fuscus* (4/4 - 100%)

parasitados por *A. longirostre* e *A. parkeri* (IM= 3,25) e *P. leucoptera* (4/5 – 80%) parasitados por *A. aureolatum*, *A. longirostre* e *H. juxtakochi* (IM=8,25).

Tabela 7 – Valores de abundância e intensidade médias para a infestação por sete espécies de carrapatos nos diferentes grupos de hospedeiros capturados durante o estudo

Carrapato	Abundância Média			Intensidade Média		
	Didelfídeos	Aves	Roedores	Didelfídeos	Aves	Roedores
<i>A. aureolatum</i>	~	0,42	~	~	10,60	~
<i>A. dubitatum</i>	0,06	~	~	1,50	~	~
<i>A. longirostre</i>	~	0,84	~	~	2,70	~
<i>A. parkeri</i>	~	0,09	~	~	2,30	
<i>H. juxtakochi</i>	0,02	0,01	~	1,00	1,00	~
<i>I. loricatus</i>	0,97	~	0,15	3,20	~	1,70
<i>I. aragaoi</i>	0,43	~	0,25	3,33	~	2,20
TOTAL	1,50	1,68	0,41	3,20	4,90	2,08

Larvas de *A. longirostre* foram observadas parasitando aves entre os meses de Abril e Setembro (Figura 14). Houve diferença estatística ($p = 0,04$) na distribuição do encontro das larvas nas aves durante o ano, e não houve diferença entre os meses de abril e setembro ($p = 0,582$), mostrando que o parasitismo em aves por larvas de *A. longirostre* está estritamente relacionado a esses meses do ano. Apenas três ninfas de *A. longirostre* foram encontradas parasitando as aves durante o ano, um relato em julho e dois em dezembro de 2005.

Houve diferença estatística com relação aos valores de abundância média de carrapatos entre os estratos que as aves naturalmente infestadas por larvas de *A. longirostre* utilizam como habitat ($p = 0,03$) (Figura 15). Um grupo estatisticamente semelhante foi encontrado quando comparados apenas os estratos “sub-bosque/bosque”, “bosque/dossel” e “dossel” ($p = 0,07$). Quando este grupo foi comparado com as aves que preferem o estrato “sub-bosque”, estas últimas apresentaram significativamente ($p = 0,029$) menos carrapatos. Quando comparado os dois estratos com maior número de capturas (“sub-bosque” x “sub-bosque/Bosque”), o grupo “sub-bosque/Bosque” apresentou significativamente ($p = 0,023$) maior abundância média de carrapatos.

De fato, 94% (57/61) das larvas de *A. longirostre* colhidas estavam parasitando aves que preferem habitar a faixa vertical de mata entre o “sub-bosque/bosque” até o dossel, enquanto que apenas 6% (4/61) das larvas colhidas estavam parasitando aves que preferem

habitar o sub-bosque da floresta. As três ninfas de *A. longirostre* colhidas estavam parasitando aves que preferem os estratos de “sub-bosque/bosque” a “bosque/dossel”.

Apenas seis larvas e uma ninfa de *A. parkeri* foram colhidas sobre as aves capturadas. Não foi possível determinar diferenças estatísticas para os variáveis estratos verticais da floresta e meses de ocorrência, devido ao fato de que apenas três das 76 aves estavam parasitadas por esta espécie de carrapato. As seis larvas de *A. parkeri* foram encontradas parasitando aves, nos meses de julho e agosto, a ninfa foi encontrada no mês de agosto. Embora a amostra seja pequena a ocorrência das larvas de *A. parkeri* também está dentro do intervalo encontrado para as larvas de *A. longirostre* e as três aves encontradas parasitadas são de espécies que preferem o estrato “sub-bosque/bosque”.

Larvas de *A. aureolatum* foram encontradas parasitando aves nos meses de abril, maio e agosto. Não houve diferença estatística na distribuição dos carrapatos durante o ano ($p = 0,139$). Como apenas três das 76 aves foram encontradas parasitadas, a amostra pode não ser grande o suficiente para serem detectadas diferenças. No entanto, as larvas de *A. aureolatum* foram encontradas dentro do mesmo intervalo de meses das larvas de *A. longirostre*.

Houve diferença estatística quando os achados de larvas de *A. aureolatum* são comparados com os grupos de estratos verticais de habitat das aves ($p=0,011$). Foi significativo que larvas desta espécie só tenham sido encontradas parasitando aves do sub-bosque. Apenas três ninfas de *A. aureolatum* foram encontradas parasitando aves, nos meses de abril, maio e agosto.

A presença de larvas de *A. longirostre* não mostrou relação com a espécie das aves, já que quando os dados das aves que vivem entre o sub-bosque e o dossel da floresta foram comparados, não houve diferença estatística ($p = 0,251$), uma vez que as larvas desta espécie de carrapato foram encontradas em 10 das 20 espécies de ave que habitam estes estratos verticais da floresta. Os mesmos resultados foram obtidos para as larvas de *A. parkeri* ($p = 0,629$), ninfa de *A. parkeri* ($p = 1$) e ninfas de *A. longirostre* ($p = 0,870$). Quando o mesmo tipo de comparação foi realizado para os estádios imaturos de *A. aureolatum*, foi observado que houve diferença estatística entre as espécies de aves capturadas ($p = 0,030$). Isto se deveu ao fato de todas as 29 larvas e três ninfas de *A. aureolatum* foram colhidas parasitando aves de uma única espécie, *P. leucoptera*. Os dados demonstram que carrapatos imaturos da espécie *A. longirostre* e *A. parkeri* tem preferência por aves que utilizam estratos mais altos da floresta como habitat, independente da espécie da ave, enquanto que imaturos de *A. aureolatum* têm

preferência pela espécie *P. leucoptera* que habita os estratos mais baixos da floresta (Figura 16).

Duas outras espécies de carrapatos foram encontradas parasitando duas das aves capturadas. Uma larva de *Ixodes* sp foi encontrada parasitando *Trichothraupis melanops*, embora sua identificação tenha sido impossibilitada, pois a larva teve parte do rostro destruído durante a colheita de material. Morfologicamente esta larva não se aproxima de *I. aragaoi* ou *I. loricatus*. Uma larva de *H. kuxtakochi* foi encontrada em *P. leucoptera*. Este achado não foi repetido para nenhuma outra espécie de ave, sendo apenas encontrado uma única outra larva desta espécie em um didelfídeo da espécie *D. aurita* (dados abaixo).

Figura 14 – Parasitismo de larvas de *A. longirostre* em aves durante o ano de 2005

Figura 15 – Parasitismo de larvas de *A. longirostre* em aves de acordo com o estrato vertical da floresta

Figura 16 – Distribuição dos carrapatos de acordo com o estrato vertical da ave parasitada

Quatro gêneros de dideídeos foram capturados. Apenas a espécie *Gracilianus microtarsus*, com apenas um único exemplar capturado, não apresentou parasitismo por carrapatos. Houve diferença estatística para o parasitismo de adultos de *I. loricatus* nas espécies capturadas ($p=0,001$). Entre os didelfídeos, o estágio adulto desta espécie de carrapato somente foi encontrada em *Didelphis aurita*, ao passo que as larvas de *I. loricatus* foram encontradas parasitando apenas *Monodelphis americana* e *Marmosops* sp, mas com uma abundância baixa de 0,5 e 0,25 larvas / animal, respectivamente, enquanto que ninfas desta espécie foram encontradas em *M. americana*. O único didelfídeo encontrado parasitado por imaturos de *I. aragaoi* foi a espécie *M. americana*, havendo diferença estatística entre esta espécie de didelfídeo com as demais abordadas neste estudo em relação ao parasitismo por *I. aragaoi* ($p = 0,015$). Não houve diferenças estatísticas entre as espécies de carrapatos do gênero *Ixodes* em didelfídeos e os meses do ano ($P > 0,05$), embora o pequeno número de amostras pode ter influenciando esta análise.

Três larvas de *A. dubitatum* foram colhidas em *D. aurita*. Duas estavam em um exemplar capturado em fevereiro e outra estava em outro exemplar capturado em outubro. Uma larva de *H. juxtakochi* foi encontrada parasitando um gambá no mês de março, não havendo repetição deste achado em nenhuma outra espécie de mamífero.

Oito espécies diferentes de roedores foram capturadas durante o estudo. Larvas de *I. aragaoi* foram encontradas nos roedores sem apresentar diferenças estatísticas durante o ano ($p = 0,301$). Apenas cinco ninfas de *I. aragaoi* foram colhidas durante o estudo, havendo diferença estatística na distribuição do parasitismo por esses carrapatos durante o ano ($p = 0,044$). Ninfas foram encontradas nos meses de fevereiro, março, maio e agosto. Não houve diferença estatística entre as espécies de roedores e o parasitismo por larvas de *I. aragaoi* ($p = 0,158$). Larvas deste carrapato foram encontradas em quatro das oito espécies de roedores capturados. Também não houve diferença entre as espécies de roedores e o parasitismo por ninfas desta espécie. Os cinco exemplares colhidos foram encontrados em quatro indivíduos de roedores identificados com *Akodon* sp (3 carrapatos / 2 animais) e *Oligorysomys* sp (2/2).

Não houve diferença estatística entre o parasitismo por larvas ($p = 0,405$) ou ninfas ($p = 0,845$) de carrapatos *I. loricatus* ao longo dos meses do ano. Larvas foram encontradas parasitando os roedores nos meses de janeiro, março e dezembro. As ninfas foram encontradas parasitando roedores nos meses de março, abril, maio, novembro e dezembro. Não houve diferença estatística entre as espécies de roedores e o parasitismo por larvas de *I. loricatus* ($p = 0,154$). Larvas deste carrapato foram encontradas em três das oito espécies de

roedores capturados. Também não houve diferença entre as espécies de roedores e o parasitismo por ninfas desta espécie. As ninfas, assim como as larvas, foram encontradas parasitando os roedores identificados como *Akodon* sp, *Oligorysomys* sp e *Juliomys pictipis*.

Um único adulto macho de *I. loricatus* foi encontrado parasitando um roedor da espécie *J. pictipis*, sendo este o único achado de um adulto deste carrapato parasitando um hospedeiro sem ser *D. aurita*.

4.3 PESQUISA DE INFECÇÃO POR RIQUÉTSIAS NOS CARRAPATOS

Dos 247 carrapatos colhidos, 223 foram processados pelas técnicas de biologia molecular para detectar a presença de riquetsias. As espécies de carrapatos que tiveram o DNA extraído e submetido ao teste foram: *A. aureolatum* (n = 32), *A. dubitatum* (n=2), *A. longirostre* (n = 61), *A. parkeri* (n = 6), *Amblyomma* sp (n = 7), *H. kuxtakochi* (n = 2), *I. aragaoi* (n = 50) e *I. loricatus* (n = 63). Destes, 67 carrapatos se mostraram positivos para a PCR com alvo no fragmento de 147 pares de bases do gene *gltA*. Quando estas amostras foram submetidas a PCR com alvo no fragmento de 401 pares de base, 37 amostras se confirmaram como positivas. Destas, seis amostras também foram positivas para a PCR com alvo no gene *ompA*. Estas seis amostras se mostraram positivas também para a PCR com alvo no gene *ompB* e gene codificador da proteína 17 kDa. (Tabela 8). Todas as seis amostras positivas para o gene *ompA* foram submetidas ao seqüenciamento genômico, assim como as 31 amostras positivas apenas para o gene *gltA*. A reação de seqüenciamento foi bem sucedida para apenas duas das seis amostras positivas para o gene *ompA*. As demais quatro amostras apresentaram cromatogramas de baixa resolução e foram descartadas. As amostras seqüenciadas foram confrontadas com amostras do GenBank e foram obtidos os seguintes valores de similaridade:

-Uma das amostras foi originada do carrapato *A. longirostre* no estágio de larva. A seqüência apresentou 99,0% de similaridade (202/204) com a seqüência de *Rickettsia* sp – Cepa ARANHA e 98.0% de similaridade (200/204) com a seqüência de *R. amblyommii*.

-A outra amostra seqüenciada com sucesso foi originária de um carrapato *I. aragaoi* no estágio de larva e apresentou 94,0% de similaridade com uma bactéria endossimbionte do carrapato *Ixodes scapularis* (116/123) e obteve similaridade de 93% (115/123) com as seqüências de *Rickettsia cooleyi* e *Rickettsia* sp cepa - IRS3.

Dezenove das 31 amostras positivas para o gene *gltA* foram seqüenciadas com sucesso. Destas, seis pertencentes à espécie *I. loricatus* (3 larvas, 1 ninfa e 2 fêmea), uma pertencente à espécie *I. aragaoi* (ninfa) e uma pertencente a espécie *A. longirostre* (larva) apresentaram consenso entre si e quando confrontadas com o GenBank o programa retornou 99,4% de similaridade com a bactéria *R. bellii*. (180/181). Outras nove amostras, todas obtidas de carrapatos da espécie *I. aragaoi* (1 ninfa e 8 larvas) também apresentaram consenso entre si e obtiveram 99,3% de similaridade (293/295) com *Rickettsia* sp – Cepas IRS3 e IRS4. Duas amostras provenientes de carrapatos *A. longirostre* (VPS141-L2 e VPS141-L4) colhidos como larvas na mesma ave mostraram um consenso que foi 99,3% similar a *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia honei*, *R. rickettsii*, *R. conoori* (318/320), 99,0% similar a *R. parkeri* e *R. amblyommii* e *R. sibirica* (317/320). Esses resultados apontam para o encontro de três espécies diferentes de riquetsias nos carrapatos colhidos no presente estudo.

Uma espécie muito próxima da *Rickettsia* sp – Cepa Aranha foi encontrada infectando uma larva de *A. longirostre* (VPS161-L1). Este carrapato foi positivo para os quatro genes testados. Duas outras larvas de *A. longirostre* se mostraram positivas apenas para o gene *gltA*, no entanto o seqüenciamento deste gene mostrou que a riquetsia que infectava estas duas larvas pertencia ao grupo da febre maculosa (SFG), mas devido ao baixo polimorfismo deste gene, não foi possível definir com precisão a espécie de riquetsia, mas é muito provável que seja a mesma espécie que infectava a larva VPS161-L1. Neste caso, seria esperado que o material proveniente das duas larvas do animal VPS141 se mostrassem positivas à PCR para o gene *ompA*, o que não ocorreu.

O mesmo foi observado para a espécie de riquetsia que infectava a larva de *I. aragaoi* VPS032-L4, na qual foi possível amplificar pela PCR um fragmento do gene *ompA*. Este fragmento se mostrou próximo de riquetsias encontradas em carrapatos do gênero *Ixodes* na América do Norte e Europa. Outros nove carrapatos imaturos da espécie *I. aragaoi* se mostraram positivos apenas para o gene *gltA*, no entanto o seqüenciamento deste gene mostrou que a riquetsia que infectava estes nove carrapatos também é muito próxima das espécies que infectam carrapatos do gênero *Ixodes* em outros locais. É muito provável que a espécie de riquetsia encontrada nestes nove imaturos seja a mesma espécie que infectava a larva VPS032-L4. Neste caso, seria esperado que o material proveniente das nove larvas se mostrasse positivo à PCR para o gene *ompA*, o que não ocorreu. Assim, foi repetida a reação de PCR com alvo no gene *ompA* para os nove exemplares da espécie *I. aragaoi* e para os dois exemplares da espécie *A. longirostre*. Entre os nove exemplares de *I. aragaoi* que haviam previamente se mostrado negativos, cinco foram considerados positivos em uma segunda repetição da reação, ao passo

que ambos exemplares de *A. longirostre* que se mostraram previamente negativos, foram considerados positivos em uma segunda repetição da reação.

O gene *ompA* apresenta alto polimorfismo, pois codifica uma proteína de membrana de alta variabilidade entre as espécies de riquétsias (REGNERY; SPRUILL; PLIKAYTIS, 1991). É provável que devido a este fato, os oligonucleotídeos iniciadores sejam menos sensíveis e não consigam detectar riquétsias em baixas concentrações. A terceira espécie de riquétsia detectada foi *R. bellii* em *I. aragaoi*, *I. loricatus* e *A. longirostre*. Portanto nenhum carrapato colhido sobre os animais silvestre capturados durante o estudo foi detectado infectado pela bactéria *R. rickettsii*.

Tabela 8 – Resultado da PCR e seqüenciamento realizados individualmente para os carrapatos objetivando diversos genes presentes em *Rickettsia* spp. Em azul estão marcados os genes submetidos ao seqüenciamento e em vermelho os resultados confirmados com a repetição da reação. (L= larva, N = ninfa, M = macho e F = fêmea, P = positivo e N = negativo)

Animal	Carrapato	Espécie	<i>gltA</i> (401)	<i>ompA</i>	<i>ompB</i>	<i>htrA</i>	Similaridade
VPS 044	M1	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	
VPS 030	L1	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	99,4% <i>R. bellii</i>
VPS 030	L3	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	99,4% <i>R. bellii</i>
VPS 030	L4	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	99,4% <i>R. bellii</i>
VPS 039	F2	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	99,4% <i>R. bellii</i>
VPS 189	N1	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	99,4% <i>R. bellii</i>
VPS 200	F3	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	99,4% <i>R. bellii</i>
VPS 092	N1	<i>I. aragaoi</i>	P	N	~	~	99,4% <i>R. bellii</i>
VPS 020	L2	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	
VPS 063	N1	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	
VPS 219	N8	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	
VPS 229	L1	<i>I. loricatus</i>	P	N	~	~	
VPS 032	L4	<i>I. aragaoi</i>	P	P	P	P	94,0% endossimbionte do carrapato <i>Ixodes</i> <i>sacapularis</i>
VPS 065	L1	<i>I. aragaoi</i>	P	P	P	P	
VPS 091	L1	<i>I. aragaoi</i>	P	N	~	~	
VPS 100	L2	<i>I. aragaoi</i>	P	N	~	~	
VPS 032	L1	<i>I. aragaoi</i>	P	N	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4

VPS 033	N1	<i>I. aragaoi</i>	P	N	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4
VPS 065	N1	<i>I. aragaoi</i>	P	N	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4
VPS 067	L1	<i>I. aragaoi</i>	P	P	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4
VPS 092	L1	<i>I. aragaoi</i>	P	P	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4
VPS 092	L2	<i>I. aragaoi</i>	P	P	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4
VPS 101	L1	<i>I. aragaoi</i>	P	P	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4
VPS 105	L1	<i>I. aragaoi</i>	P	P	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4
VPS 237	L4	<i>I. aragaoi</i>	P	N	~	~	99,3% <i>Rickettsia</i> sp – Cepas IRS3 e IRS4
VPS 042	N1	<i>I. aragaoi</i>	P	N	~	~	
VPS 142	L2	<i>Amblyomma</i> sp	P	N	~	~	
VPS 161	L1	<i>A. longirostre</i>	P	P	P	P	99,0% <i>Rickettsia</i> sp – Cepa ARANHA
VPS 163	L1	<i>A. longirostre</i>	P	P	P	P	
VPS 169	L1	<i>A. longirostre</i>	P	P	P	P	
VPS 170	L2	<i>A. longirostre</i>	P	P	P	P	
VPS 141	L4	<i>A. longirostre</i>	P	P	~	~	Diversas Ver texto
VPS 113	L1	<i>A. longirostre</i>	P	N	~	~	
VPS 141	L1	<i>A. longirostre</i>	P	N	~	~	99,4% <i>R. bellii</i>
VPS 141	L2	<i>A. longirostre</i>	P	P	~	~	Diversas Ver texto
VPS 186	L1	<i>A. longirostre</i>	P	N	~	~	
VPS 141	L5	<i>A. longirostre</i>	P	N	~	~	

4.4 ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE RIQUÉTSIAS EM TECIDOS DE ANIMAIS SILVESTRES

Foram armazenados e processados em laboratório, o baço de 227 animais. Destes, o material genético extraído de 24 indivíduos se mostrou positivo para a PCR com alvo em um fragmento de 147 pares de base do gene *gltA* de riquetsia. No entanto, os mesmos 24 animais, quando submetidos a PCR com alvo em um fragmento de 401 pares de bases do gene *gltA* e a PCR com alvo em um fragmento do gene *ompA*, se mostraram negativos. Como a PCR para o fragmento de 147 pares é considerado uma técnica de triagem, e a para o fragmento de 401 pares como técnica confirmatória, não foi possível confirmar a infecção por *Rickettsia* em

nenhum animal. Estes dados corroboram os achados pela técnica de isolamento. As cobaias inoculadas com fragmentos de baços dos animais silvestres capturados durante o estudo tiveram a temperatura corporal monitorada diariamente. Apenas em dois casos houve hipertermia por mais de três dias consecutivos. Duas cobaias inoculadas com o material de um roedor da espécie *Akodon* sp (VPS 019) apresentaram temperaturas superiores a 39,9° C por três dias, culminado na morte de ambos os animais após 10 dias da inoculação. O quadro mórbido e causa mortis das cobaias não foi confirmado como riquetsiose, pois além dos animais não apresentarem quadro clínico característico com edema e necrose de extremidades e escroto, o fragmento do baço proveniente do roedor silvestre capturado se mostrou negativo para a presença de riquetsias quando submetido à PCR, assim como o baço de uma das cobaias que evoluíram para o óbito. Não foi possível determinar a causa mortis das cobaias.

Em outra situação, uma das duas cobaias inoculadas com fragmentos de baço provenientes de cinco aves da espécie *L. verreaux* apresentou hipertermia durante quatro dias que evoluiu espontaneamente para a normalidade após este período. Como o quadro mórbido não foi compatível com o causado pela bactéria *R. rickettsii* e nenhuma das aves se mostrou infectada por riquetsias na PCR, o material foi considerado negativo. Portanto nenhum dos animais testados foi considerado naturalmente infectado pela bactéria *R. rickettsii*.

4.5 PESQUISA DE CARRAPATOS EM CÃES

Em todas campanhas mensais, foi encontrado pelo menos um cão naturalmente infestado por adultos de *A. aureolatum*, provando que este carrapato esteve presente na área do estudo durante todo o período de capturas de animais silvestres.

5 DISCUSSÃO

Durante o estudo foram capturados 243 animais silvestres de diversas espécies. Foram identificadas, parasitando estes animais, três espécies de carrapatos do gênero *Ixodes*. Dos espécimens de *I. loricatus*, 45 foram encontrados parasitando didelfídeos e 19 estavam parasitando roedores. Foi a única espécie de carrapatos capturada no estudo no estágio adulto. Com exceção de um exemplar colhido de roedor, todos os carrapatos adultos desta espécie estavam parasitando gambás (*D. aurita*), o que é esperado uma vez que o gambá (*D. aurita*) é o hospedeiro primário da fase adulta deste carrapato (SCHUMAKER et al., 2000). Um exemplar macho de *I. loricatus* foi encontrado parasitando um roedor da espécie *J. pictus*, tratando-se provavelmente de um parasitismo acidental já que esta espécie de roedor não é considerada um hospedeiro preferencial para a fase adulta deste carrapato.

Em contraste, nenhum imaturo desta espécie foi encontrado parasitando o gambá, mas foram colhidos em outras espécies de pequenos didelfídeos, como *Marmosops* sp e *Monodelphis americana*. Parece que os imaturos têm uma menor especificidade parasitária do que os adultos, pois também foram encontrados em três espécies de roedores, *Akodon* sp, *J. pictus* e *Oligoryzomys* sp. Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, que estabelece *Didelphis* spp como hospedeiros primários para adultos de *I. loricatus*, e pequenos marsupiais e roedores como hospedeiros para os estágios imaturos (SCHUMAKER et al., 2000; MARQUES et al., 2004).

A espécie *I. aragaoi* foi encontrada parasitando apenas mamíferos. Os estágios imaturos deste carrapato estão relacionados ao parasitismo de roedores, enquanto que o estágio adulto tem sido descrito parasitando de mamíferos da ordem Artiodactyla, principalmente do gênero *Mazama* (ARAGÃO E FONSECA, 1961). Este estudo corrobora os dados da literatura, pois os 31 exemplares desta espécie foram encontrados parasitando quatro espécies diferentes de roedores.

Uma larva de *Ixodes* sp colhida de ave não pôde ser identificada morfolologicamente, devido ao fato do espécime ter fraturado parte do rostro durante a retirada da pele da ave. No entanto, esta larva de *Ixodes* sp não foi similar às duas outras espécies deste gênero encontradas neste estudo, e possivelmente, pertença à espécie *Ixodes auritulus*, que é um carrapato que utiliza aves como hospedeiros primários. Arzua et al. (2003) relata o

parasitismo por *I. auritus* em *Turdus rufiventris* e *Synallaxis ruficapilla*. O exemplar capturado neste estudo estava parasitando uma ave da espécie *Trichothraupis melanops*.

Dois exemplares de larvas da espécie *H. juxtakochi* foram colhidos durante o experimento. Uma das larvas foi colhida parasitando *P. leucoptera*. O parasitismo de *H. juxtakochi* em aves já havia sido relatado, assim como a preferência da fase adulta deste carrapato por mamíferos do gênero *Mazama* (GUGLIELMONE; MANGOLD; AUFRANC, 1992). Venzal et al. (2005) atribuiu a espécie *Turdus rufiventris* a maior importância como hospedeiros das fases imaturas, sendo que o relato feito no estudo em Taiaçupeba foi o primeiro para esta espécie de carrapato parasitando uma ave da espécie *P. leucoptera*. Outra larva da espécie *H. juxtakochi* foi encontrada parasitando um gambá, mostrando que esta espécie de carrapato pode parasitar aves e mamíferos no estágio de larva.

Foram colhidos três exemplares da espécie *A. dubitatum* no estágio larval parasitando *D. aurita*. Acreditava-se que esta espécie de carrapato era específica de capivaras (hospedeiro primário), muito embora um trabalho recente reportou imaturos de *A. dubitatum* em outras espécies animais, incluindo mamíferos e aves (LABRUNA; PINTER; TEIXEIRA, 2004). Esta espécie de carrapato já foi encontrada parasitada por riquetsias do grupo da febre maculosa (LABRUNA et al., 2004a; LEMOS et al., 1996), embora nunca tenha sido apontada com vetor da *R. rickettsii*. Foi a única espécie de *Amblyomma* encontrada sobre os mamíferos capturados.

As espécies *A. longirostre*, *A. aureoaltum* e *A. parkeri* foram encontradas apenas sobre as aves. *A. parkeri* é uma espécie rara, existindo apenas poucos relatos do estágio adulto sobre ouriço-cacheiro (*Coendou* sp) no estado de São Paulo (ARAGÃO; FONSECA, 1961). Este estudo traz os primeiros relatos do estágio de larva deste carrapato, que foi encontrado sobre as aves *Xiphorhynchus fuscus*, *Chiroxiphia caudata* e *Dysithamnus mentalis*, assim como a infestação mista de imaturos desta espécie de carrapato com a espécie *A. longirostre*.

Por sua vez, *A. longirostre* tem sido relatado, nas fases larval e ninfal, em diversas espécies de aves (VENZAL et al., 2005) e sabe-se que o principal hospedeiro primário para a fase adulta é o ouriço-cacheiro. Este estudo reporta o parasitismo de 61 larvas e três ninfas desta espécie de carrapato, em 10 espécies diferentes de aves. Houve uma diferença estatística na abundância deste parasita durante o ano. As larvas foram encontradas apenas entre os meses de abril e setembro, com a picos de infestação nos meses de junho e julho. Como esses dados representam apenas um ano de coleta, não há como afirmar se foi um comportamento normal ou atípico. No entanto, vale salientar que esses meses de maior ocorrência de imaturos de *A. longirostre* coincidem com o padrão sazonal de *A. cajennense* na

região Sudeste, onde *A. cajennense* completa apenas uma geração por ano (Labruna et al., 2005b).

Houve uma diferença significativa entre os estratos verticais que as aves utilizam como habitat na floresta e o parasitismo por larvas de *A. longirostre*. A quase totalidade deste carrapato foi encontrada em aves que utilizam preferencialmente os estratos entre o bosque e o dossel da mata, independentemente da espécie de ave. Isto mostra que *A. longirostre* tem maior especificidade pelo habitat do que pela espécie de hospedeiro. O ciclo de vida deste carrapato na natureza é desconhecido, mas estes dados sugerem que a infestação das aves pelos carrapatos possa ocorrer em estratos verticais distantes do solo. Sabe-se que o hospedeiro da fase adulta deste carrapato (ouriço-caheiro) é um animal arborícola. Desta forma, talvez todo o ciclo de vida ocorra entre os estratos de bosque e dossel. Mais pesquisas se mostram necessárias para o melhor entendimento do ciclo biológico desta espécie de carrapato.

Com relatos em apenas uma espécie de ave (*P. leucoptera*), foram colhidas 32 imaturos da espécie *A. aureolatum*, com uma abundância média de 0,42 carrapatos por ave e uma intensidade média de parasitismo de 10,6 carrapatos por ave. Esses resultados sugerem que os imaturos de *A. aureolatum* parecem ter uma marcante preferência por esta espécie de ave, pelo menos na área do estudo no distrito de Taiçupeba. Embora não tenha havido amostras suficiente para determinar se há ou não sazonalidade do parasitismo de imaturos de *A. aureolatum* em aves, as três aves parasitadas foram capturadas nos meses de abril, maio e agosto, sendo que duas outras aves desta espécie foram capturadas nos meses de fevereiro e novembro, porém livres de carrapatos *A. aureolatum*. Estes dados estão de acordo com os encontrados por Arzua et al. (2003), que desenvolveram um estudo de dois anos capturando aves em um fragmento de mata e demonstraram a sazonalidade dos imaturos de *A. aureolatum* ocorrendo nas estações de outono e inverno.

Este estudo registra os primeiros relatos de parasitismo por *A. aureolatum* em *P. leucoptera*. Rojas et al. (1999), durante um estudo no estado de Minas Gerais, capturaram quatro aves da espécie *P. leucoptera*, sendo que duas estavam parasitadas por quatro carrapatos imaturos classificados pelos autores como *A. cajennense*. No entanto, a técnica utilizada pelos autores para a identificação dos ácaros foi exclusivamente morfológica, comparando os carrapatos colhidos com a descrição das fases imaturas do carrapato *A. cajennense*. Uma vez que as fases imaturas do carrapato *A. aureolatum* não foram descritas na literatura, portanto, não puderam ter sido comparadas com os carrapatos colhidos nas aves, não é possível excluir uma provável identificação equivocada.

Arzua et al. (2003) conduziram um estudo no Reinhard Maack Park (78 ha) localizado dentro do município de Curitiba, PA e capturaram 876 pássaros, dos quais 260 pertenciam à espécie *T. rufiventris* e 11 pertenciam à espécie *Troglodytes aedon*. Foram encontrados parasitados por larvas de *A. aureolatum*, 75 *T. rufiventris* e sete *T. aedon*, sendo que nenhuma ave da espécie *P. leucoptera* foi capturada.

Nenhum exemplar de *T. aedon* foi capturado durante o estudo nos fragmentos de mata em Taiapuê e apenas um exemplar de *T. rufiventris* foi capturado. É provável que *A. aureolatum* não tenha preferência por espécies de aves, mas por um grupo de aves que tenha o comportamento de freqüentar o solo. *P. leucoptera* exibe um comportamento de revirar o folhicho no solo da floresta a procura de insetos, o que coloca esta espécie em estreito contato com o local onde supostamente estariam as larvas de carrapatos. Em locais mais degradados onde *P. leucoptera* não ocorre e onde aves como o *T. rufiventris* são beneficiadas, estas devem desempenhar o papel de hospedeiro para os imaturos de *A. aureolatum*. Sabe-se que *T. rufiventris* e *T. aedon* são aves que freqüentemente visitam o solo e podem habitar o interior de áreas de mata ou bordas arbustivas (DOS-ANJOS, 1990), assim como *P. leucoptera* (RIDLEY; TUDOR, 1994).

O comportamento do hospedeiro vertebrado é um fenômeno imprescindível para o contato carrapato-hospedeiro e para o sucesso de uma espécie de carrapatos. Este fenômeno pode ser dividido em duas fases. A fase de sobrevivência e a fase do encontro com o hospedeiro (FLOYD, 1987). A fase de sobrevivência é regulada principalmente por fatores abióticos, enquanto que a fase de encontro está relacionada à densidade de hospedeiros, o estado energético do carrapato e a eficiência em se aderir ao hospedeiro. As estratégias de contato entre carrapatos e hospedeiros podem ser classificadas em três maneiras: (i) A busca ativa (*active hunting*), determinada por rápidos deslocamentos periódicos dos locais de abrigos na direção de um hospedeiro que está por perto; (ii) O comportamento nidícola (*nest waiting*), comportamento de carrapatos que tem todo o ciclo ou parte dele desenvolvido no ninho do hospedeiro; (iii) o comportamento de tocaia (*ambushing*), no qual carrapatos aguardam a passagem de um animal em um ponto de vantagem na vegetação (CROOKS; RANDOLPH, 2006). Apenas a estratégia de busca ativa requer deslocamento horizontal dos carrapatos, enquanto que o deslocamento vertical pode ser visto nas estratégias de comportamento de tocaia (ex.: larvas de *Amblyomma cajennense*) e no comportamento nidícola (ex.: adultos de *Rhipicephalus sanguineus*). A estratégia de tocaia é a que apresenta maior taxa de perda hídrica, pois os carrapatos se deslocam verticalmente na vegetação e se distanciam do microclima do solo onde a umidade relativa do ar é alta o suficiente para possibilitar a

reposição hídrica dos ácaros. Isto faz com que os carrapatos tenham que voltar ao solo repetidamente, o que ocasiona maior gasto energético (KNULLE; RUDOLPH, 1982).

A maioria das espécies de carrapatos, principalmente nos estádios imaturos, não apresenta padrão significativo de dispersão horizontal, assim dependem totalmente do hospedeiro para que ocorra o encontro e o parasitismo. Para o carrapato *Amblyomma hebraeum*, o movimento dos hospedeiros é um fator crítico para o encontro hospedeiro-carrapato (RECHAV, 1978). O padrão de uso do habitat pelo roedor *Peromyscus leucopus* é o determinante primário do encontro com o carrapato *Dermacentor variabilis* (SONENSHINE; STOUT, 1968), assim como os padrões de deslocamento de ovelhas são cruciais para o encontro destas com o carrapato *Ixodes ricinus* (RANDOLPH; STEELE, 1985). No entanto, para algumas espécies de carrapatos, sob certas circunstâncias, o deslocamento horizontal pode ocorrer. Carroll e Schmidtman (1996) mostraram que larvas de *Ixodes scapularis*, um carrapato diminuto, podem se deslocar horizontalmente na vegetação até 3 m do ponto de eclosão dos ovos, em condições naturais. Crooks e Randolph (2006) mostraram que carrapatos da espécie *I. ricinus* podem se deslocar horizontalmente e que este deslocamento não é randômico, e sim direcionado a alguns estímulos. Carrapatos desidratados são atraídos por áreas de maior umidade relativa do ar e podem se deslocar em sentido a um gradiente de saturação hídrica. Esta espécie de carrapato também pode se deslocar se estimulada com odores inerentes aos hospedeiros, mas somente se a umidade do ar estiver em altas concentrações. Carrapatos em déficit energético têm uma menor chance de se deslocarem.

Não há estudos que definam qual é a estratégia de deslocamento das larvas de *A. aureolatum*. Sabe-se que larvas de *A. aureolatum* necessitam de umidade relativa do ar muito alta para sobreviver (>95,0%) (PINTER et al., 2004), isto mostra que as larvas desta espécie não apresentam eficientes mecanismos de retenção/reabsorção hídrica, o que evolutivamente pode significar que as larvas desenvolveram o comportamento de não abandonar o microclima oferecido pelo folhíço da floresta, mostrando que a estratégia de deslocamento vertical na vegetação, como ocorre para *A. cajennense* poderia ser fatal aos imaturos de *A. aureolatum*. É provável que as larvas se desloquem horizontalmente no solo e se espalhem pelo folhíço da mata, nos primeiros dias após a eclosão, pois as reservas energéticas estão perto do máximo.

Esta hipótese se apóia nos achados de parasitismo em *P. leucoptera*. Entre os cinco exemplares capturados desta ave, três estavam parasitados por *A. aureolatum* e a intensidade média de parasitismo para as larvas foi de 9,6 larvas por ave. Se as larvas de *A. aureolatum* mantivessem o comportamento gregário e deslocamento vertical como ocorre para *A. cajennense*, seria esperado encontrar as aves parasitadas por centenas de carrapatos, uma vez

que a ave entraria em contato com praticamente todas as larvas provenientes de uma postura (~10.000 larvas). O fato de terem sido encontradas aves com intensidade parasitária máxima de 19 larvas mostra que após a eclosão é provável que as larvas se distribuam radialmente pelo folhíço. Como ocorre para *I. ricinus*, talvez as larvas sejam atraídas por sinais dos hospedeiros e áreas com maior umidade relativa do ar. Quanto maior for a capacidade de deslocamento das larvas no folhíço maior será a área ocupada pelos carrapatos em uma progressão exponencial quadrática. Se larvas de *A. aureolatum* tiverem capacidade para se movimentar pelo folhíço em uma distribuição radial de aproximadamente dois metros do local da eclosão, a área de cobertura das larvas passará de iniciais poucos centímetros para 12,5 m², com isto a densidade de larvas passará a ser aproximadamente 760 larvas por m², ou 7,6 larvas a cada 10 cm², considerando uma postura de 10.000 ovos e 95% de eclosão.

É provável que *P. leucoptera* adquira os carrapatos durante o processo de revirar o folhíço da floresta a procura de insetos para sua alimentação, como a densidade seria de poucas larvas por dm², a intensidade parasitária máxima esperada é baixa. Resultados semelhantes ao presente estudo foram encontrados por Arzua et al. (2004) e Venzal et al (2005), que determinaram a intensidade parasitária média em *T. rufiventris* em 3,7 e 1,25 larvas/ave, respectivamente.

A ave *P. leucoptera* deve representar outro importante papel no ciclo biológico do carrapato *A. aureolatum*. Esta ave pode fazer a dispersão da espécie carregando larvas e ninfas entre os fragmentos de mata.

Dario et al. (2002) observaram a presença de *P. leucoptera* em um fragmento de Mata Atlântica de apenas quatro ha que se situava contíguo a um fragmento maior de 47ha, formando um corredor de mata estrutural. Dos-Anjos (2001) mostrou que a abundância relativa de *P. leucoptera* foi maior em fragmentos de mata menores, enquanto que em um fragmento de 70 ha a abundância relativa foi de 0,52, e em um fragmento de 26 ha a abundância relativa foi de 0,9, mostrando que esta espécie de Passeriforme tem boa capacidade de adaptação à fragmentação da mata. O autor sugeriu que *P. leucoptera* faça uso de corredores ecológicos entre os fragmentos, o que possibilitaria seu encontro em fragmentos menores. Uezo, Metzger e Vielliard (2005) mostraram que *P. leucoptera* pode utilizar áreas de mata secundária como corredores estruturais e funcionais de deslocamento e em alguns casos pode inclusive se movimentar em áreas abertas, utilizando-as como corredores funcionais, com relatos de até 60 metros de distância. Também relataram que *P. leucoptera* pode povoar fragmentos tão pequenos quanto 14 ha e que a diminuição da abundância desta ave está mais relacionada ao isolamento da área do que ao tamanho.

Com base nesta capacidade de *P. leucoptera* em usar corredores e mesmo de se deslocar em áreas abertas por pequenas distâncias, está proposto na Figura 17 os possíveis corredores funcionais para esta espécie de ave no local de estudo. Este comportamento deve ser muito importante, pois aves podem carrear carrapatos infectados com *R. rickettsii*, o que disseminaria o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira entre os fragmentos de mata da região. Quando há a fragmentação de uma floresta, aves insetívoras e leves são mais resistentes às mudanças ambientais (UEZO; METZGER; VIELLIARD, 2005).

Os resultados de captura para *P. leucoptera* em Taiaçupeba mostraram uma densidade de 0,12 aves por ha. Como apenas parte da população foi acessada, a densidade desta espécie de ave encontrada nos fragmentos estudados deve estar subestimada. Duca, Guerra e Marini (2006) estudaram o território mínimo ocupado por aves desta espécie e obtiveram a marca de 0,2 pares de ave/ha, enquanto que Willis e Oniki (2001) concluíram que o território seria de 0,3 pares de ave/ha. Estes dados, aplicados a região deste estudo, mostram que os dois fragmentos de mata em Taiaçupeba podem suportar cerca de 24 aves da espécie *P. leucoptera*. Não é possível afirmar se esta população seria suficiente para manter a população de *A. aureolatum* na região.

Em estudos de laboratório, Pinter et al. (2004) mostraram que imaturos de *A. aureolatum* foram incapazes de se alimentar com sucesso em roedores das espécies *Calomys callosus* e *Rattus norvegicus*, no entanto se alimentaram eficientemente em roedores da espécie *Cavia aperea porcellus*.

Durante os 12 meses de estudo, nenhum dos 121 roedores capturados estava parasitado por imaturos de *A. aureolatum*. Este relato mostra que os resultados de laboratório podem ser projetados para situações reais, o que excluiria os roedores da família Cricetidae na qual se inclui a subfamília Sigmodontinae (onde estão agrupadas as espécies de ratos e camundongos da América do Sul) do grupo de possíveis hospedeiros para esta espécie de carrapato.

Figura 17 – Área de estudo em Taiaçupeba com referência aos prováveis corredores funcionais (linha branca pontilhada) utilizados por alguns Passeriformes

O fato de que imaturos de *A. aureolatum* se alimentaram com sucesso em cabaia de laboratório poderia apontar que *Cavia aperea aperea* (preá) poderia ser um importante hospedeiro deste carrapato na natureza. Durante o estudo em Taiacupeba nenhum exemplar de *C. aperea* foi capturado, provavelmente, porque a armadilha *pitfall* com baldes de 35 l não é a melhor metodologia para captura desta espécie de mamífero. No entanto, esta espécie de roedor ocupa um nicho ecológico bem distinto do ocupado por *A. aureolatum*. Preás habitam áreas abertas compostas por gramíneas onde fazem túneis para o deslocamento sob a vegetação dentro de uma área bem delimitada, uma vez que estes animais não forrageiam em locais distantes de seu abrigo (CASSINE; GALANTE, 1992), enquanto que *A. aureolatum* necessita da alta umidade e temperaturas mais amenas, encontradas dentro da área de mata.

A interação parasita-hospedeiro pode ser classificada em dois fenômenos, sendo aqueles dependentes do parasita e aqueles dependentes do hospedeiro. A especificidade parasitária, aspectos biológicos, sazonalidade e oportunismo são exemplos de fatores ligados ao parasita, enquanto que como exemplos de fatores ligados ao hospedeiro, podem ser citados a densidade animal, área de ocupação, ciclos de atividade, padrões de comportamento no uso do ambiente, idade, sexo, tamanho, peso, estado nutricional e a habilidade de adquirir imunidade protetora ao carrapato (BARNARD, 1975). Pode-se concluir que embora exista uma afinidade biológica entre o carrapato *A. aureolatum* e roedores do gênero *Cavia*, em condições naturais a área de ocupação destes roedores pode impossibilitar o encontro entre hospedeiro e carrapato.

Fonsceca (1935) relata o parasitismo de ninfas e larvas de *A. aureolatum* no roedor *Euryzygomatomys spinosus*, fato também observado em um roedor desta espécie capturado na cidade de Biritiba-Mirim em 2002, local muito próximo a Taiacupeba, onde um exemplar de *E. spinosus* estava parasitado por uma ninfa de *A. aureolatum* (LABRUNA, comunicação pessoal). Guglielmone et al. (2003) relataram o parasitismo de larvas de *A. aureolatum* no roedor *Ctenomys* sp na Argentina.

Nenhum exemplar da espécie *E. spinosus* foi capturado neste estudo. Embora não seja possível afirmar que esta espécie não ocorra nos fragmentos de mata em Taiacupeba. Os relatos de parasitismo por imaturos de *A. aureolatum* nesta espécie de roedor, assim como em *Ctenomys* spp, e o fato de que estas espécies de roedores formam um grupo monofilético pertencendo à sub-ordem Hystricognathi, juntamente com os cavídeos (Figura 18), podem sugerir que a susceptibilidade de *C. aperea porcellus* aos imaturos de *A. aureolatum* seja uma característica biológica inerente a esta sub-ordem, e que em condições naturais, apenas os roedores deste grupo que freqüentem o mesmo habitat do carrapato *A. aureolatum* têm potencial para desempenhar o papel de hospedeiro primário.

O carrapato da América do Norte, *Ixodes pacificus*, pode, em condições de laboratório, se alimentar com a mesma eficiência em roedores e lagartos, mas em condições naturais, roedores são raramente capturados parasitados enquanto que freqüentemente imaturos desta espécie de carrapato são encontrados sobre lagartos. A hipótese mais provável é que características inerentes ao comportamento de lagartos e roedores facilitem ou dificultem o encontro entre parasita e hospedeiro (LANE; KLEINJAN; SHOELER, 1995). Assim como o exemplo de *I. pacificus*, é provável que as fases imaturas de *A. aureolatum* sejam capazes de parasitar ambos aves e roedores histicognateos, dependendo das condições ambientais para o encontro parasita-hospedeiro.

Nenhum dos 46 didelfídeos capturados estava parasitado por *A. aureolatum* e dados da literatura não indicam nenhum relato de parasitismo por imaturos desta espécie de carrapato em didelfídeos (GUGLIELMONE et al., 2003). É possível concluir que os animais

Figura 18 - Esquema da classificação taxonômica de alguns gêneros de roedores da América do Sul (fonte: NCBI – Taxonomy Browser)

silvestres que mantêm a população de imaturos do carrapato *A. aureolatum* no local estudado sejam espécies de aves que habitam o sub-bosque e que se alimentem no folhicho da mata, com especial atenção à família *Thamnophilidae* e de roedores da sub-ordem *Hystricognathi* que utilizam o interior da mata como habitat. Os roedores da família *Cricetidae* e os didelfídeos devem ser excluídos do grupo de potenciais hospedeiros primários para as fases imaturas de *A. aureolatum*, pelo menos no Distrito de Taiaçupeba, local do presente estudo.

Entre os carrapatos colhidos sobre os animais, 223 exemplares foram testados para a presença de riquetsias pela técnica de PCR. Trinta e sete carrapatos se mostraram positivos. O seqüenciamento genético demonstrou a provável presença de três espécies de riquetsias. Em carrapatos *I. aragaoi* foi encontrada uma espécie de riquetsia próxima de outras espécies descritas infectando carrapatos deste gênero na América do Norte e Europa. O resultado do seqüenciamento do fragmento do gene *gltA* indica similaridade de 99,3% com *Rickettsia* sp – Cepas IR3 e IR4 descritas por Sekeyová et al. (2000) na Eslováquia infectando *I. ricinus*. Estas duas cepas foram um grupo filogeneticamente distinto das demais espécies de riquetsias do grupo da febre maculosa. O seqüenciamento de um fragmento do gene *ompA* de um dos carrapatos *I. aragaoi* obteve 94% de similaridade com uma riquetsia considerada simbiote do carrapato *I. scapularis* descrita por Weller et al. (1998) e 93 % de similaridade com as espécies *Rickettsia* sp – Cepa IRS3 e *R. cooleyi* descrita por Billings et al. (1998) em carrapatos da espécie *I. scapularis*. Os resultados não permitem determinar se esta *Rickettsia* sp encontrada em *I. aragaoi* é de fato uma das espécies de riquetsia já descritas ou se trata de um novo genótipo ou mesmo uma nova espécie. No entanto, fica claro que faz parte de um genogrupo de riquetsias encontradas em carrapatos do gênero *Ixodes*.

Mais estudos mostram-se necessários para a correta classificação desta bactéria encontrada em *I. aragaoi*, mas aparentemente se trata de um novo registro de uma espécie de riquetsia na América do Sul. Este achado recebe especial atenção uma vez que o carrapato *I. aragaoi* é filogeneticamente próximo dos carrapatos *I. scapularis* e *I. ricinus* (todos pertencem ao complexo *ricinus*) e a melhor caracterização desta espécie de riquetsia pode ser um importante ponto no melhor entendimento da biogeografia das bactérias do gênero *Rickettsia*.

Em carrapatos *A. longirostre* foi encontrada uma espécie de riquetsia com a seqüência de uma fragmento do gene *ompA* apresentando 99,0% de similaridade à seqüência de *Rickettsia* sp – Cepa ARANHA descrita por Labruna et al. (2004b). Em outras duas larvas da mesma espécie de carrapato foram seqüenciados fragmentos do gene *gltA* e foram obtidos similaridades entre 90% e 93% com diversas espécies de riquetsia do grupo de febre maculosa. O valor de similaridade esperado para estes genes deve ser próximo de 100%, pois se trata de

gene codificador de uma proteína utilizada na respiração celular da bactéria, portanto apresenta baixo polimorfismo genético (ROUX et al., 1997). Os baixos valores encontrados podem estar relacionados a problemas na metodologia de sequenciamento genômico e baixa qualidade dos cromatogramas gerados para a análise.

A *Rickettsia* sp – Cepa ARANHA foi diagnosticada infectando carrapatos *A. longirostre* no Estado de Rondônia. Esta cepa de riquetsia é filogeneticamente próxima a *R. amblyommii*. Atualmente ainda não é possível dizer se a Cepa ARANHA é uma nova espécie de riquetsia ou se é uma variação genotípica da *R. amblyommii* (LABRUNA et al., 2004b).

Outras três larvas de *A. longirostre* se mostraram positivas para o genes *ompA*, *ompB* e 17kDa, o que significa que também estavam infectadas por uma riquetsia do grupo da febre maculosa, embora não seja possível determinar a espécie. Uma larva de *A. longirostre* que se mostrou positiva apenas para a PCR com alvo no gene *gltA* teve o fragmento amplificado e sequenciado com 99,4% de similaridade com *R. bellii*. Esta espécie de riquetsia também foi encontrada em um exemplar de *I. aragaoi* e em seis amostras de *I. loricatus*.

No Brasil, a bactéria *R. bellii* já foi diagnosticada infectando diversas espécies de carrapatos, como: *A. sculpturatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma rotundatum*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma humerale* (LABRUNA et al., 2004c), *A. dubitatum*, (LABRUNA et al., 2004a) e *H. juxtakochi* (LABRUNA et al., 2007). Na área do estudo em Taiacupeba, a bactéria *R. bellii* já foi detectada em *A. aureolatum* (PINTER; LABRUNA, 2006) e em *I. loricatus* (HORTA et al., 2006). Os relatos deste estudo são os primeiros de infecção por *R. bellii* em *I. aragaoi* e *A. longirostre*.

Nenhum dos carrapatos testados se mostrou infectado pelo agente da Febre Maculosa Brasileira. Entre as espécies de carrapatos encontradas parasitando os animais silvestres na região apenas a espécie *A. aureolatum* é reconhecida como vetor da bactéria *R. rickettsii* e apenas 32 imaturos desta espécie de carrapato foram encontrados, todos parasitando uma única espécie de ave. Um estudo recente revelou uma prevalência da infecção por *R. rickettsii* em *A. aureolatum* de apenas 0,89% (PINTER; LABRUNA, 2006). Portanto, o fato de que nenhum dos imaturos de *A. aureolatum*, encontrados no presente trabalho, estiver infectado por *R. rickettsii*, é um resultado aceitável dada à pequena amostra colhida.

Não foi possível provar o envolvimento de nenhum dos animais silvestres capturados com o ciclo natural da bactéria *R. rickettsii*. Nenhum dos 227 animais silvestres capturados que foram testados para a presença de riquetsias se mostrou positivo às técnicas utilizadas neste estudo. Em estudo similar feito nos EUA na década de 1960 (BOZEMAN et al., 1964), foram examinados roedores da espécie *M. pensilvanicus*, importante hospedeiros do

carrapato *D. variabilis*. Em 185 animais examinados, apenas dois foram encontrados infectados pela bactéria causadora da Febre Maculosa. Estas observações vão de encontro com o que é aceito hoje para a história natural da doença, na qual o reservatório da bactéria na natureza é o próprio carrapato e alguns hospedeiros vertebrados podem ser susceptíveis à infecção por *R. rickettsii*. Esses hospedeiros susceptíveis, quando parasitados por um carrapato que alberga a bactéria *R. rickettsii*, podem se tornar infectados e podem evoluir para um quadro riquetsêmico durante o qual o animal se torna fonte de infecção para os carrapatos livre da bactéria. Após este período, o animal, se não evoluir para o óbito, desenvolve resposta imunológica que o torna refratário a uma segunda infecção (McDADE; NEWHOUSE, 1986).

O curto período de riquetsemia para cada espécie animal tem sido alvo de estudo de muitos pesquisadores na América do Norte. Burgdorfer, Friedhoff e Lancaster (1966) reportaram o período de riquetsemia para diversos roedores. Para *M. pensilvanicus*, o período foi de 10 dias e para o esquilo (*Citellus lateralis*) o período foi de seis dias. Para outros mamíferos, como a lebre americana (*Lepus americanus*), o período foi de cinco dias.

Travassos e Vallejo (1942a) desenvolveram um dos raros estudos sobre hospedeiros vertebrados da pesquisa brasileira. Os autores mostraram que a capivara pode apresentar um quadro riquetsêmico de pelo menos 10 dias. Estes estudos mostram a dificuldade em se encontrar um animal naturalmente infectado, uma vez que durante todo o período de vida, espera-se que um animal só esteja infectado pela *R. rickettsii* alguns poucos dias. Um fato que aumenta esta dificuldade nos estudos da Febre Maculosa Brasileira é a raridade de trabalhos sobre a susceptibilidade e capacidade das espécies de hospedeiros vertebrados em se comportar como fonte de infecção para os carrapatos da América do Sul.

McDade e Newhouse (1986) afirmam que nem todos os hospedeiros conhecidos para os carrapatos vetores da Febre Maculosa são capazes de desenvolver níveis de riquetsemia suficientes para desempenharem o papel de fonte de infecção para os carrapatos susceptíveis. A quantidade de informações é deveras deficiente, especialmente para a importância das aves no ciclo enzoótico do agente. Poucos experimentos na literatura apontam que aves poderiam representar o papel de amplificadores para a bactéria *R. rickettsii*. Lundgren et al. (1966) mostraram que aves domésticas, quando inoculadas com o agente etiológico da *R. rickettsii*, não desenvolvem sinais clínicos da doença, no entanto, apresentaram um quadro de riquetsemia por cerca de 10 dias, mas não há qualquer resultado sobre a capacidade das aves como fonte de infecção de riquetsias para carrapatos. Embora pareça que *P. leucoptera* seja um importante hospedeiro para imaturos de *A. aureolatum*, não é possível concluir se esta espécie de ave

desempenha um importante papel de amplificador horizontal para a bactéria *R. rickettsii* entre os carrapatos.

Um modelo do ciclo enzoótico da bactéria *R. rickettsii* no local de estudo em Taiaçupeba, deve observar duas hipóteses. Se as espécies de aves hospedeiras das fases imaturas de *A. aureolatum* podem ou não amplificar a bactéria e se tornar fonte de infecção para o carrapato. Se a hipótese aceita for a que aves não desempenham o papel de amplificador, é imperativo que uma espécie de mamífero desempenhe este papel, ou a bactéria *R. rickettsii* deixaria de existir na população de carrapatos, segundo o modelo de Cooksey et al. (1990). Neste caso, é provável que o roedor *E. spinosus* desempenhe este papel e apenas os carrapatos imaturos que se alimentassem neste roedor estariam sujeitos a transmissão horizontal do agente. Talvez esta seja a diferença entre áreas endêmicas e não endêmicas para a febre maculosa brasileira transmitida por *A. aureolatum*. Áreas não endêmicas seriam aquelas onde aves seriam exclusivamente os hospedeiros das fases imaturas, enquanto que áreas endêmicas seriam aquelas onde parte das larvas se alimentam em roedores histicognateos. Neste modelo, estaria reservado às aves o importante papel de disseminar os carrapatos para outros fragmentos de mata, devido a maior mobilidade destes animais. No entanto, se a hipótese aceita for a de que aves podem desempenhar o papel de amplificador horizontal, estas seriam competentes para sustentar a população de carrapatos e disseminar a bactéria entre os ácaros, reservando aos roedores histicognateos um papel secundário. Neste caso, o que regularia a prevalência de *R. rickettsii* na população de carrapatos seria a taxa e a frequência de natalidade, uma vez que seria essencial que animais susceptíveis sejam inseridos na população frequentemente. A longevidade das aves também seria um fator importante, pois aves que já sofreram a primoinfecção e se tornaram refratárias devem ser subtraídas da população, para que haja um equilíbrio constante entre susceptíveis e imunes.

Pode-se concluir que futuros estudos devam almejar o melhor esclarecimento do papel das aves, em especial às espécies *P. leucoptera* e *T. rufiventris*, como hospedeiros da bactéria *R. rickettsii* e como fonte de infecção para o carrapato *A. aureolatum*.

6 CONCLUSÕES

-No Distrito de Taiaçupeba, a espécie de Passeriforme *P. leucoptera*, habitante do estrato sub-bosque, apresenta-se como um importante hospedeiro para os estágios de larva e ninfa de *A. aureolatum*. Por outro lado, aves de estratos mais altos (sub-bosque-bosque, bosque-dossel, dossel) não são importantes para este carrapato.

-Roedores cricetídeos e didelfídeos não são hospedeiros importantes para nenhum estágio do carrapato *A. aureolatum*, no Distrito de Taiaçupeba.

-Não foi possível demonstrar o papel de hospedeiro amplificador de riquetsias para nenhuma espécie de vertebrado estudada.

-Os vertebrados silvestres avaliados no estudo (aves, roedores e didelfídeos) estão expostos a carrapatos infectados por diferentes espécies de riquetsias.

REFERÊNCIAS

- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215, p. 403-410, 1990.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 59, p. 115-129, 1961a.
- ARZUA, M.; NAVARRO DA SILVA, M. A.; FAMADAS, K.M.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. **Exp Appl Acarol**, v. 31, n. 3-4, p. 283-96, 2003.
- BARNARD, D. R. Mechanisms of host-tick contact with special reference to *Amblyomma americanum* (Acari:Ixodidae) in beef cattle forage areas. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 28, n. 5, p. 557-564, 1991.
- BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard and soft ticks taxa (Acari:Ixodidae) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 91, p. 10034-10038, 1994.
- BOZEMAN, F. M.; SHIRAI, A.; HUMPHRIES, J. W.; FULLER, H. S. Ecology of Rocky Mountain spotted fever. II. Natural infection of wild mammals and birds in Virginia and Maryland. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 16, p. 48-59, 1967.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revised. **J. Parasitol.** v. 83, n. 4, p. 575-583, 1997.
- BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias en Mexico. **Revista Inst. Salub. y Enf. Trop.**, v. 8, p. 3-14, 1947.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: Walker, D. H., **Biology of rickettsial diseases**. Boca Raton, FL: CRC, 1998. p.33-50
- BURGDORFER W.; FRIEDHOFF, K. T.; LANCASTER, J. L. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. **Bull. World Health Org.**, v. 35, p. 149-153, 1966.
- CARROLL, J. F.; SCHMIDTMANN, E. T. Dispersal of blacklegged tick (Acari:Ixodidae) nymphs and adults at the woods-pasture interface. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, p. 554-558, 1996

CASSINI, M. H.; GALANTE, M. L. Foraging under predation risk in the wild guinea pig : the effect of vegetation on habitat utilization. **Ann. Zool. Fennici**, v. 29, p. 285-290, 1992.

COOKSEY, L. M.; HAILE, D. G.; MOUNT, G. A. Computer Simulation of Rocky Mountain Spotted Fever Transmission by the American Dog Tick (Acari:Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 27, p. 671-680, 1990.

COOLEY, R. A. **The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus* and *Haemaphysalis* (Ixodidae) of the New World.** Washington D.C.: National Institute of Health, 1946. p. 54.

CROOKS, E.; RANDOLPH, S. E. Walking by *Ixodes ricinus* ticks: intrinsic and extrinsic factors determine the attraction of moisture of host odour. **The Journal of Experimental Biology**, v. 209, p. 2138-2142, 2006

DÁRIO, F. R.; VINCENZO, M. C. V.; ALMEIDA, A. F. Avifauna in Atlantic Forest fragments. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 989-996, 2002.

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

DOS-ANJOS, L. Distribuição de aves em uma floresta de araucária da Cidade de Curitiba (Sul do Brasil), **Acta Biol. Paranaense**, v. 19, n. 1-4, p. 51-63, 1990.

DOS-ANJOS, L. Bird communities in five atlantic Forest fragments in Southern Brasil. **Ornitologia Neotropical**, v. 12, p. 11-27, 2001.

DUCA, C.; GUERRA, T. J.; MARINI, M. Â. Territory size of three Antbirds (Aves, Passeriformes) in a Atlantic Forest fragment in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 23, n. 3, p. 692-698, 2006.

EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. **J. Clin. Microbiol.**, v. 32, p. 803-810, 1994.

FONTES, L. R., GOMES, S. M. A.; ANJOS, E. D.; ANDRADE, J. C. R. Brazilian Spotted Fever Transmitted by *Amblyomma aureolatum* (Acari) in Mogi da Cruzes, Brazil: Reported of four human cases and environmental control measures. In: International Congress of Entomology, 21., 2000, Foz do Iguaçu, PA. **Abstract Book**, 2000. p. 749.

GALVÃO, M. A. M.; LAMOUNIER, J. A.; BONOMO, E.; TROPIA, M. S.; REZENDE, E. G.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MACHADO, M. C.; OTONI, M. E. A.; LEITE, R. C.; CARAM, C.; MAFRA, C. L.; WALKER, D. H. Emerging and reemerging rickettsiosis in an endemic area of Minas Gerais State, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1593-1597, 2002.

GIMÉNEZ, D. F. Staining Rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, n. 3, p. 135-140, 1964.

GOMES, L. S. Thypho exanthematico de São Paulo. **Brasil-Médico**, v. 17, n. 52, p. 919-921, 1933.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of Rickettsia rickettsii in the tick Amblyomma cajennense in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; AUFRANC, C. R. Haemaphysalis juxtakochi, Ixodes parvicornis and Otobius megnini in relation to the phytogeography of Argentina. **Ann. Parasitol. Hum. Comp.**, v. 67, p. 91-93, 1992.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENÑA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROS-BATESTI, 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, p. 273-288, 2003.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitas de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001. 218 p.

HOOGSTRAAL, H. Ticks in relation to human diseases caused by rickettsia species. Annual Review of Entomology, v. 12, p. 377-420, 1967.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. Advances in Parasitology, v. 24, n. 1, p. 135-238, 1985.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; SCHUMAKER, T. T.; LABRUNA, M. B. Natural infection, transovarial transmission, and transstadial survival of Rickettsia bellii in the tick Ixodes loricatus (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Ann New York Acad Sci.**, v. 1078, p. 285-290, 2006.

KNULLE, W.; RUDOLPH, D. Humidity relationships and water balance of ticks. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUM, R. **Physiology of ticks**. Oxford: Pergamon Press, 1980. p. 43-70.

LABRUNA, M. B.; PAULA, C. D.; LIMA, T. F.; SANA, D. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on Wild Animals from the Porto-Primavera Hydroelectric Power Station Area, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1133-1136, 2002.

LABRUNA, M. B.; PINER, A.; TEIXEIRA, R.H Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. **Exp Appl Acarol**, v. 32, n. 1-2, p. 79-88, 2004.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MACBRIDGE, J.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an endemic area for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004a.

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MACBRIDGE, J.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 41, n. 6, 2004c

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

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T. S.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the State of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Syst. Appl. Acarol.**, v. 10, p. 17-32, 2005b

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

LANE, R. S.; KLEINJAN, J. E.; SCHOELER, G. B. Diel activity of nymphal *Dermacentor occidentalis* and *Ixodes pacificus* (Acari:Ixodae) in Relation to Meteorological Factors and Host Activity Periods. **J. Med. Entomology**, v. 32, n. 3, p. 290-299, 1995.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R. Rocky Mountain Spotted Fever in an endemic area in Minas Gerais, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 89, n. 4, p. 497-501, 1994.

LEMOS, E. R.; MELLES, H. H.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARAES, M. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted fever group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 273-5, 1996.

LEMOS, E. R.; ALVARENGA, F. B.; CINTRA, M. L.; RAMOS, M.C.; PADDOCK, C. D.; FEREBEE, T. L.; ZAKI, S. R.; FERREIRA, F. C.; RAVAGNANI, R. C.; MACHADO, R. D.; GUIMARÃES, M. A.; COURA, J. R. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, p. 329-334, 2001.

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA A. Typho Exantemático de São Paulo – Novas experiencias sobre a transmissão experimental por carrapatos. **Brasil-Médico**, v. 16, n. 48, p. 993-995, 1932.

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho Exantemático de São Paulo – Pesquisa sobre a possibilidade da transmissão experimental do virus oir <Ixodidae>. **Brasil-Médico**, v. 16, n. 3, p. 49-53, 1932a.

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho Exantemático de São Paulo – Pesquisa do virus em alguns arthropodos sob condições naturaes. **Brasil-Médico**, v. 16, n. 8, P. 170-172, 1932b.

LEMOS-MONTEIRO, J. Comportamento Experimental do Coelho aos virus do Typho Exanthemático de São Paulo e da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 8, n. 21, p. 3-80, 1933.

LOPES, O. S.; SACCHETTA, A.; DENTE, E. Longevity of wild birds obtained during a banding program in São Paulo, Brasil. **Journal of Field Ornithology**, v. 51, n. 2, p. 144-148, 1980.

LUNDGREN, D. L.; THORPE, B. D.; HASKELL, C. D. Infectious Diseases in Wild Animals in Utah: Experimental Infection of Birds with *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Bacteriology**, v. 91, n. 3, p. 963-966, 1966.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second Rickettsia. **J. Med. Entomol**, v. 39, p. 808-813, 2002.

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

MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari:Ixodidae), **Parasitol. Res.**, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1988.

MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 40, p. 197-199, 1989.

McDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual Reviews Microbiology**, v. 40, p. 287-309, 1986.

MEYER, J. R.; SABORIDO, J.; PRADO, A. Typho Exanthematico. **Brasil-Medico**, v. 17, n. 10, p. 167, 1932.

MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; SILVA, M. V. Spotted fever: Rickettsia isolation in a skin biopsy sample, **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 1992.

MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; LEMOS, E. R. S. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células vero. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 469-473, 1999.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil-Medico**, v. 19, n. 21, p. 465-470, 1935.

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

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 773-778, 1999.

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

PARKER III, T. A.; STOTZ, D. F.; FITZPATRICK J. W. Ecological and distributional databases, 111-410. In: STOTZ, D. F.; FITZPATRICK, J. W.; PARKER III, T. A.; MOSKOVITS, D. K. **Neotropical birds: ecology and conservation ed.** Chicago: The University of Chicago Press., 1996. p. 118-291.

PATINO, L.; AFAFANADOR, A.; PAUL., J. H. A spotted fever in Tobia, Colombia. Preliminary report. **Am. J. Trop. Med.**, v. 17, p. 639-653, 1937.

PHILIP R. N.; CASPER, E. A. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in Western Montana. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 30, p. 230-238, 1981.

PHILIP R. N.; CASPER, E. A.; BURGDORFER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, L. E.; BELL, E. J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **J. Immunol.**, v. 121, p. 1961-1968, 1978.

PINTER, A. **Aspectos epidemiológicos da Febre Maculosa em uma área endêmica no município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do ciclo de vida do vetor *Amblyomma aureolatum* (Acari:Ixodidae).** 2003. 100 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

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

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the Seasonal Dynamics, Life Cycle, and Host Specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari:Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 324-332, 2004.

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

RANDOLPH, S. E. Ticks are not insects: Consequences of Contrasting Vector biology for Transmission potential. **Parasitol. Today**, v. 14, p. 186-192, 1998.

RANDOLPH, S. E.; STEELE, G. M. An experimental evaluation of conventional control measures against the ship tick, *Ixodes ricinus* (L.) (Acari: Ixodidae). II. The dynamic of the host-tick interaction. **Bulletins Entomology Research**, v. 75, p. 501-518, 1985.

RECHAV, Y. Drop off rhythms of engorged larvae and nymphs of the bond tick, *Amblyomma hebraeum* (Acari:Ixodidae), and the factors that regulate them. **Journal of Medical Entomology**, v. 14, p. 677-687, 1978.

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

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, n. 76, p. 843-855, 1909.

RIDLEY, R. S.; TUDOR, G. **The birds of South America: the suboscine passerines**. Austin: University of Texas Press, 1994. vol. 2, p. 814

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

ROUX, V.; RYDKINA, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis and its application for the rickettsiae. **Int. J. Sys. Bacteriol.** v. 47, p. 252-261.

ROZENTAL, T., BUSTAMANTE, M. C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M; LEMOS, E. R. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, v. 44, p. 155-158, 2002.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B. C.; DUMLER, S.; WALKER, D. H.; PECANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espirito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, p. 222-226, 1993.

SCHUMAKER, T. T.; LABRUNA, M. B.; ABEL-IDOS, S.; CLERICI, P. T. Life cycle of *Ixodes (Ixodes) loricatus* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **J. Med. Entomol.**, v. 37, n. 5, p. 714-720, 2000.

SEKEYOVÁ, Z.; FOURNIER, P. E.; ŘEHÁČEK, J. ; RAOULT, D. Characterization of a New Spotted Fever Rickettsia Detected in *Ixodes ricinus* (Acari:Ixodidae) Collected in Slovakia. **J. Med. Entomol.**, v. 37, n. 5, p. 707-713, 2000.

SILVEIRA, I. **Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria.** 2006, 98 f. Dissertação (Mestrado)-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks.** New York: Oxford University Press, 1993. v. 2. p. 465.

SONENSHINE, D. E.; STOUT, I. J. Use of old-field habitats by the American dog tick *Dermacentor variabilis*. **Ann. Entomology Society of America**, v. 61, p. 679-686, 1968.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavideos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. **Mem. Inst. Butantan**, v. 15, p. 73-86, 1942a.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 16, p. 87-90, 1942b.

THRUSFIELD, M. V. **Veterinary epidemiology.** 2nd. ed. Oxford: Blackwell, 1995. 479 p.

VALLEJO-FREIRE, A. Transmissão do vírus da febre maculosa mexicana por *Amblyomma striatum* Koch, 1944. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 107-112, 1947.

UEZO, A.; METZGER, J. P.; VIELLIARD, M. E. Effects of structural and functional connectivity and patch size on the abundance of seven Atlantic Forest bird species. **Biological Conservation**, v. 123, p. 507-519, 2005.

VENZAL, J. M.; FÉLIX, M. L.; OLMOS, A.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. A collection of ticks (Ixodidae) from wild birds in Uruguai. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, p. 325-331, 2005.

WEBB, L.; MITCHELL, C.; MALLOY, D. C.; DASCH, G. A.; AZAD, A. F. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.**, v. 26, p. 530-534, 1990.

WELLER, S. J.; BALDRIDGE, G. D.; MUNDERLOH, H. N.; SIMSER, J.; KURTTI, T. J. Phylogenetic placement of Rickettsiae from ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, n. 5, 1998.

WILLIS, E. O.; ONIKI, Y.. 2001. Birds of a Central São Paulo Woodlot: banded species. In: ALBUQUERQUE, J. L. B.; CÂNDIDO JR, J. F.; STRAUBE, F. C.; ROOS, A. L. (Ed). **Ornitologia e conservação da ciência as estratégias**. Tubarão: Editora Unisul, 2001. 341 p.

YU, X. J.; WALKER, D. H. The Order Rickettsiales. In: Dworkinm, M. (Ed.) **The prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community**. 3 ed. New York: Springer-Verlag. Disponível em <<http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>> Acesso em: 2003.