DIEGO GARCIA RAMIREZ

Pesquisa de agentes infecciosos associados aos carrapatos de pequenos mamíferos, em área de Mata Atlântica no município de Cotia, São Paulo

São Paulo

2017

DIEGO GARCIA RAMIREZ

Pesquisa de agentes infecciosos associados aos carrapatos de pequenos mamíferos, em área de Mata Atlântica no município de Cotia, São Paulo

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dra. Darci Moraes Barros Battesti

São Paulo

2017

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T. 3467
FMVZ

Ramirez, Diego Garcia

Pesquisa de agentes infecciosos associados aos carrapatos de pequenos mamíferos, em área de Mata Atlântica no município de Cotia, São Paulo / Diego Garcia Ramirez. -- 2017.

65 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2017.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti.

1. Ixodidae. 2. Mata Atlântica. 3. Pequenos mamíferos. 4. Microrganismos I. Título.

Parecer da Comissão de Ética (obrigatório)

Incluir a imagem do parecer.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA		
<i>Comissão de Ética no Uso de Animais</i>		
CERTIFICADO		
<p>Certificamos que o Projeto intitulado "Investigação de agentes infecciosos associados a carrapatos de pequenos mamíferos em área de Mata Atlântica", protocolado sob o nº 2957/2013, utilizando nº indefinido de mamíferos silvestres (roedores e marsupiais), sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, foi aprovado em reunião de 26/6/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.</p>		
<p>We certify that the Research "Research of infectious agents associated to the ticks of small mammals in the Atlantic Forest area in the municipality of Cotia, São Paulo", protocol number 2957/2013, utilizing indefinite number of wild mammals (rodents and marsupials), under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, was approved in the meeting of day 6/26/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.</p>		
<p>São Paulo, 27 de junho de 2013.</p>

<p>Denise Tabacchi Fantoni Presidente</p>		
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"><div><p>Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87 Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" São Paulo/SP – Brasil 05508-270</p></div><div><p>Fone: + 55 11 3091-7671/7676/0904 Fax: +55 11 3032-2224 E-mail: fmvz@usp.br http://www.fmvz.usp.br</p></div></div>		

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: RAMIREZ, Diego Garcia

Título: **Pesquisa de agentes infecciosos associados aos carrapatos de pequenos mamíferos, em área de Mata Atlântica no município de Cotia, São Paulo**

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo aos meus pais e família, por todo o apoio, incentivo e estrutura que me deram e dão, sempre.

A Fernanda, minha companheira de todas as horas. Quantas ideias e sonhos nos acompanharam ao longo destes últimos anos, e espero que muitos ainda mais venham.

À minha orientadora Darci Moraes Barros Battesti, pela confiança, honestidade e ensinamentos, que vão muito além da vida acadêmica. É um grande privilégio ter sido seu aluno.

Ao professor Marcelo Bahia Labruna, que sempre deixou as portas abertas do laboratório para toda a equipe da Darci, e particularmente a mim. Sou muito grato por tudo. Menos as caneladas no futebol.

Deixo aqui o meu agradecimento especial às pessoas que participaram direta ou indiretamente deste projeto. Ao Jairo, que além das muitas idas ao campo, foi um grande parceiro na edição das sequências. A Valéria e o Thiaguinho nas identificações de carrapatos. Ao Xico e Amanda com as RIFI. À Dra. Érika Zaher e ao Dr. Arlei nas identificações dos roedores. Só foi possível aprender, porque vocês tiveram muita disposição em compartilhar.

A todos aqueles que compartilharam as muitas refeições de pão com frios e refrigerante quente na RFMG. Com especial participação dos amigos Felipe, Gabriel e Juliana, que estiveram presentes na maioria das vezes.

Aos amigos do Instituto Butantan Simone, Mercedes, Fernando, Ricardo, Leidi, Gabi, Lívia, Leonor, Hamilton, Rafael, Arlete. A lista é imensa e vou esquecer de vários nomes, então deixo aqui meus agradecimentos a todos.

No VPS os amigos Igor, Sebastian, Ricardo, Felipe, Monize, Fernanda, Alejandro, Vanessa, Renatinho, Pedro, Hilda. A lista aqui também é grande, vou me esquecer de muitos.

Aos secretários, professores e demais funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva.

A subfrota do IBU e toda a sua equipe de motoristas, por fornecer o transporte para as viagens ao campo.

A Sabesp pela permissão de acesso a RFMG e ICMBio pela licença para coletas.

As duas Instituições envolvidas (IBu e FMVZ) por toda a estrutura que nos fornecem. Especialmente a coordenação do VPS e a Capes pelo fornecimento da bolsa e apoio financeiro em viagens.

Eu gostaria muito de agradecer meu amado São Paulo Futebol Clube pelas alegrias e títulos, só que estes anos só colecionei despesas com jogos.

E por último, mas não menos importante: agradecer a Deus por ter permitido desfrutar de alguns curtos, porém marcantes momentos com o amigo Danilo Saraiva. O mundo e a Ciência perderam um grande ser humano, que é modelo de humildade, carisma e paixão pela vida pra todos que tiveram o prazer de conhecê-lo.

Deixo aqui meu agradecimento à FAPESP (Processo No. 2010/51875-9), porque boa parte deste trabalho foi financiado por essa Agência de Fomento.

RESUMO

RAMIREZ, D.G. **Pesquisa de agentes infecciosos associados aos carrapatos de pequenos mamíferos, em área de Mata Atlântica no município de Cotia, São Paulo.** 2016. 65 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A fauna de pequenos mamíferos e de carrapatos da Reserva Florestal do Morro Grande, Cotia, SP, foi investigada assim como microrganismos associados a eles. Coletas foram realizadas bimestralmente, e resultaram na captura de 158 pequenos mamíferos silvestres e cães, distribuídos em 126 roedores de 10 espécies, 26 marsupiais de 3 espécies, um tapiti, além de 6 cães domésticos inspecionados. Destes hospedeiros foram recolhidos 327 carrapatos de 9 espécies de 4 gêneros, e larvas de *Amblyomma* sp. Novos registros de hospedeiros foram acrescentados para as espécies *I. aragaoi*, *I. loricatus*, *I. schulzei* e de espécie morfológicamente semelhante a *I. fuscipes*. Simultaneamente, fizemos a pesquisa de exemplares em vida livre na vegetação por arraste e busca visual. Um total de 597 exemplares foram recolhidos e identificados, representando 9 espécies de 3 gêneros, além de larvas do gênero *Amblyomma*. Na sorologia por RIFI, com exceção dos cães domésticos que foram todos negativos, a soro reatividade apresentada para pequenos mamíferos silvestres sugere a circulação de cepas de *Rickettsia* naquela região. Dos 102 animais testados, 39 foram soro positivos e em 6 amostras nós sugerimos provável antígeno homólogo para *R. bellii* (3), *R. rickettsii* (2) e *R. rhipicephali* (1). Encontramos na quase totalidade dos espécimes adultos de *I. aragaoi* uma *Rickettsia* próxima à cepa endossimbionte de *I. scapularis*, e em uma fêmea de *A. sculptum*, sequências parciais do gene *ompA* foram similares a *R. parkeri* isoladas de *A. triste* no Brasil e na Argentina. Sequências geradas a partir de um fragmento do gene 18S rRNA de *Hepatozoon* sp. foram obtidas de amostras dos carrapatos l.c.f. *fuscipes* e *I. schulzei*, coletados sobre o roedor *A. montensis*. Outro hemoprotozoário encontrado foi um genótipo de *Babesia* sp. proveniente de pools de larvas e de ninfas de *A. incisum*, coletados em vida livre. Na investigação da presença de bactérias do gênero *Coxiella*, 14 amostras de diferentes espécies do gênero *Amblyomma* (*A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. incisum*, *A. naponense* e *A. sculptum*) foram positivas, e as análises de homologia utilizando o marcador molecular 16S rDNA foram compatíveis com *Coxiella* endossimbiontes de carrapatos.

Palavras-chave: Ixodidae. Mata Atlântica. Pequenos Mamíferos. Microrganismos.

ABSTRACT

RAMIREZ, D.G. **Research of infectious agents associated with ticks of small mammals, in an area of Atlantic Forest of the Cotia municipality, São Paulo.** 2017. 65 p. Thesis (Doctorate in sciences) – Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, São Paulo University, São Paulo, 2017

The fauna of small mammals and ticks of the reserved forest of Morro Grande (RFMG) was assessed and investigated, as well as associated infectious microorganisms. Sample collections were performed bimonthly, and resulted in 158 wild small mammals and dogs inspected, distributed in 126 rodents of 10 different species, 26 marsupials of 3 different species, a Tapiti, and also 6 domestic dogs. 327 ticks were collected from the mentioned hosts; these ticks were representatives of 9 species of 4 different genera, and *Amblyomma* sp. larvae. New hosts records were appended for 4 species of the genus *Ixodes*; *I. aragaoi*, *I. loricatus*, *I. schulzei* and a *I. fuscipes* simile species. Simultaneously, free roaming ticks were collected from the vegetation by dragging a flannel through the forest and visual search. A total of 597 ticks were collected and identified belonging to 9 species of 3 genera, as well as *Amblyomma* genus larvae. Serology arrays using RIFI technique were performed, and with exception of the domestic dogs that all were negative, the serum reactivity showed in the wild small mammals demonstrated the circulation of *Rickettsia* strains in the studied region. 39 animals of the 102 tested were positive and 6 samples had strong evidences of being homologous antigens for *R. bellii* (3), *R. rickettsii* (2), and *R. rhipicephali* (1). Molecular research of microorganisms in ticks showed that almost all the adult individuals of *I. aragaoi* were positive for a *Rickettsia* similar to an endosymbiont strain of *I. scapularis*, and in a female of *A. sculptum* partial sequences the gene of *ompA* were similar to *R. parkeri* isolated from *A. triste* in Brasil and Argentina. Sequences obtained from a fragment of the gene 18S rRNA of *Hepatozoon* sp. amplified from samples of the tick species l.c.f. *fuscipes* and *I. schulzei*, collected from a rodent *A. montensis*. Another Hemo-protozoon found was a genotype of *Babesia* sp. from pools of *A. incisum* larvae and nymphs, collected in the vegetation. For the bacteria of the genus *Coxiella*, 14 samples of different species of the genus *Amblyomma* (*A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. incisum*, *A. naponense* and *A. sculptum*) were positive, and the similarity analyses using the 16S rDNA molecular marker were compatible with *Coxiella* endosymbiont of ticks.

Key words: Ixodidae. Atlantic Forest. Small Mammals. Microorganisms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização geográfica da Reserva Florestal do Morro Grande, município de Cotia, Grande São Paulo.....	20
Figura 2 - Locais de instalação das armadilhas para captura de pequenos mamíferos silvestres.....	21
Figura 3 - Identificação dos animais silvestres, e arraste de flanela para coleta de carrapatos na vegetação.....	24
Figura 4 - Adultos de <i>A. sculptum</i> utilizando paredes de alvenaria como abrigo.....	31
Figura 5 - Sinais de atividades de caça e pesca ilegais na RFMG.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos <i>primers</i> utilizados nas amplificações pela técnica da PCR (Reação em Cadeia Pela Polimerase).....	26
Tabela 2 - Número de machos (M), fêmeas (F), ninfas (N) e larvas (L) de carrapatos coletados em pequenos mamíferos silvestres e cães da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), no município de Cotia, São Paulo.....	29
Tabela 3 - Índices de infestação de hospedeiros por carrapatos.....	30
Tabela 4 - Número de machos (M), fêmeas (F), ninfas (N) e larvas (L) coletados no ambiente.....	32
Tabela 5 - Pequenos mamíferos silvestres com presença de anticorpos anti <i>Rickettsia</i> spp. testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), coletados na RFMG.....	34
Tabela 6 - Títulos sorológicos frente a 5 antígenos de <i>Rickettsia</i> spp. em pequenos mamíferos silvestres coletados na RFMG, testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	35

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3	OBJETIVOS.....	19
3.1	Geral.....	19
3.2	Objetivos específicos.....	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1	Área de Estudos.....	20
4.2	Coletas de Roedores e Marsupiais.....	21
4.3	Coleta de cães domésticos.....	22
4.4	Coleta de carrapatos na vegetação.....	23
4.5	Identificação dos carrapatos.....	23
4.6	Extração de DNA.....	24
4.7	Amplificação de DNA pela técnica da PCR.....	25
4.8	Sequenciamento dos produtos da PCR.....	26
4.9	Sorologia para pesquisa de anticorpos para <i>Rickettsia</i> spp.....	27
5	RESULTADOS.....	27
5.1	Hospedeiros e carrapatos.....	27
5.2	Sorologia.....	33
5.3	Pesquisa de patógenos pela técnica de PCR.....	36
6	DISCUSSÃO.....	38
6.1	Hospedeiros e carrapatos em parasitismo.....	38
6.2	Carrapatos coletados do ambiente.....	41
6.3	Sorologia.....	43
6.4	Pesquisa de microrganismos em carrapatos.....	46
7	CONCLUSÕES.....	48
	REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos obrigatórios altamente especializados, constituindo o segundo táxon em importância na transmissão de doenças transmitidas por vetores ao homem e aos animais domésticos, após os mosquitos. São encontrados em parasitismo em uma grande variedade de animais vertebrados terrestres, incluindo-se anfíbios, répteis, aves e mamíferos silvestres e domésticos, além do homem (SONENSHINE; ROE, 2014).

Podem atuar como transmissores de diversos agentes infecciosos aos seus hospedeiros, desde vírus, bactérias, protozoários e fungos, além de excretarem/secretarem substâncias farmacologicamente ativas e/ou tóxicas (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

No Brasil, atualmente são reconhecidas 69 espécies pertencentes a duas famílias: Argasidae com 26, e Ixodidae representada por 46 espécies (GUGLIELMONE et al., 2010; KRAWCZAK, 2016; WOLF et al., 2016).

Das mais de 900 espécies de carrapatos descritas no mundo, cerca de 10% são consideradas importantes para a saúde pública, por sua habilidade em parasitar humanos. Todavia, mesmo as espécies nunca relatadas em humanos, podem assumir importância indireta na saúde pública, por participarem na manutenção enzoótica de agentes infecciosos na natureza (OLIVER, 1989).

A Ordem Rodentia é a mais abundante e mais rica em espécies entre todos os mamíferos, e apresenta relevante papel como reservatórios de doenças zoonóticas. Aproximadamente 10% das espécies são consideradas reservatórios para pelo menos 85 doenças zoonóticas conhecidas (HAN et al., 2015; HAN; KRAMER; DRAKE, 2016)

De forma geral, pequenos mamíferos albergam preferencialmente as fases imaturas de carrapatos, isto é, as larvas e ninfas. Várias espécies de roedores, marsupiais e morcegos são encontrados em íntimo contato com o homem, adaptando-se aos ambientes antropizados, sejam eles urbanos ou rurais. Evidentemente, isto significa também uma maior exposição do homem e dos animais domésticos ao parasitismo por seus ectoparasitos (GUGLIELMONE; NAVA, 2011; SARAIVA et al., 2012).

No Brasil, estudos recentes relatam a participação dos roedores e também dos marsupiais como reservatórios de agentes zoonóticos transmissíveis por carrapatos, ou como importantes hospedeiros para populações de espécies potencialmente vetores de doenças (GAZETA et al., 2004; HORTA et al., 2007, 2009; SARAIVA et al., 2012; SZABÓ et al., 2013; COELHO et al., 2016; WOLF et al., 2016).

2 REVISÃO DA LITERATURA

A Mata Atlântica, como o próprio nome sugere, se estende em grande parte da Costa Atlântica Brasileira. É uma das maiores florestas tropicais úmidas das Américas, com grande heterogeneidade de ambientes. A sua grande extensão longitudinal implica na produção de gradientes climáticos importantes, ocorrendo diferentes regimes de chuvas e temperaturas médias na sua extensão territorial (RIBEIRO et al., 2009). A combinação com grandes diferenças de altitude, favorece uma alta diversidade e endemismo de espécies (COLOMBO; JOLY, 2010). Atualmente, não resta mais do que 8% da sua cobertura original (IBGE, 2012).

O estado de São Paulo concentra o maior adensamento populacional do Brasil, e as áreas remanescentes do bioma Mata Atlântica sofrem grande impacto da expansão das cidades. Os fragmentos remanescentes vêm perdendo espaço, e muitas vezes se tornam verdadeiras ilhas verdes, com a diminuição dos grandes contínuos de florestas e, por consequência, o isolamento e declínio da biodiversidade (HADDAD et al., 2015).

Um estudo que avaliou o efeito da fragmentação do habitat na ocorrência de espécies de carrapatos em aves encontradas em fragmentos de Mata Atlântica de diferentes extensões, apontou a perda na riqueza de espécies de aves e também de seus ectoparasitos nas áreas menores, e maior abundância de algumas espécies oportunistas (OGRZEWALSKA et al., 2011). Esse desequilíbrio pode alterar também a dinâmica de circulação de microrganismos nas espécies vetores, oferecendo condições até então inexistentes, como a concentração geográfica de populações susceptíveis a uma infecção.

A dinâmica de transmissão da Febre Maculosa Brasileira no Sudeste do

Brasil, causada por *Rickettsia rickettsii* e transmitida pelo carrapato *Amblyomma sculptum*, é um bom modelo de comparação com estas condições de fragmentação e modificação de habitat. Capivaras são os hospedeiros primários dos estágios adultos de *A. sculptum*, e os marsupiais do gênero *Didelphis* hospedeiros frequentes para os estágios imaturos. Ambos são susceptíveis a infecção por *R. rickettsii* quando picados por um carrapato infectado e, após o contágio, desenvolvem rickettsemia (multiplicação de riquétsias no sangue) por um período de alguns dias a semanas, servindo como hospedeiro amplificador e fonte de infecção para novos carrapatos neste período (HORTA et al., 2007, 2009; LABRUNA, 2009; SZABO et al., 2013; KRAWCZAK et al., 2014). A concentração geográfica e expansão populacional destas espécies oportunistas em ambientes modificados pela ação do homem, podem gerar cenários de maior exposição a esses agentes zoonóticos (HORTA et al., 2007; MOREIRA et al., 2013).

Outras espécies de carrapatos e hospedeiros vertebrados estão envolvidos na epidemiologia da FMB causada por *R. rickettsii*, e de uma rickettsiose emergente causada por *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. Os vetores comprovados são *A. aureolatum* e *A. ovale*, respectivamente. (PINTER; LABRUNA, 2006; SABATINI et al., 2010; OGRZEWALSKA et al., 2012; SZABO et al., 2013). Ainda segundo esses autores, a dinâmica de transmissão e distribuição geográfica dos casos humanos e achados moleculares e sorológicos em carrapatos e animais está relacionada sobretudo a fragmentos florestais próximos as cidades, com predomínio e ocorrência no bioma Mata Atlântica. As duas espécies de carrapatos vetores envolvidos tem os carnívoros silvestres e cães domésticos como hospedeiros preferenciais nos estágios adultos, e as aves e roedores atuam como hospedeiros frequentes para os estágios imaturos (SPOLIDORIO et al., 2010; OGRZEWALSKA et al., 2013; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014; OGRZEWALSKA; PINTER, 2016).

A investigação da circulação de cepas de *Rickettsia* sp. em pequenos mamíferos silvestres vem sendo objeto de estudos recentes no Brasil, através da pesquisa de anticorpos nos animais e do DNA das bactérias em tecido e sangue. Os resultados de sorologia em diferentes localidades e biomas brasileiros apontam prevalência de animais positivos em áreas endêmicas e não endêmicas, e o entendimento do seu papel na epidemiologia das

rickettsioses ainda não é um consenso. (PENA et al., 2009; DANTAS-TORRES et al., 2012; SZABÓ et al., 2013; KRAWCZAK, 2016; MELO et al., 2016).

Além das riquetsioses, uma outra enfermidade humana associada a carrapatos no Brasil é a Doença de Lyme-Símile, denominada SBY (Síndrome de Baggio-Yoshinari). Recebeu inicialmente a denominação Lyme-Símile por ser uma doença semelhante a borreliose causada pela espiroqueta *Borrelia burgdorferi* sensu latu (BASILE et al., 2016). Apresenta ampla distribuição em regiões temperadas da Europa e América do Norte, onde espécies de carrapatos do complexo *Ixodes ricinus* são seus vetores naturais. No Brasil, as espécies morfológicamente próximas a esse grupo são *Ixodes aragaoi* e *Ixodes fuscipes*. (NAVA et al., 2014; ONOFRIO et al., 2014). Recentemente, surgiram os primeiros achados para a América do Sul de genótipos relacionados a *B. burgdorferi* s.l. em *I. aragaoi* no Uruguai e *I. pararicinus* na Argentina (BARBIERI et al., 2013; NAVA et al., 2014). Os diagnósticos no Brasil são descritos desde o início dos anos 90, com registros para os estados de São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Amazonas. É baseado na sintomatologia clínica, na sorologia positiva para os antígenos de *B. burgdorferi* (cepa americana G39/40) e no histórico de infestação por carrapatos, não havendo, porém, o isolamento do agente etiológico e confirmação de espécie vetora (Yoshinari et al., 1997; 1999; OLIVEIRA, 2004; Bonoldi, 2010).

Na família Anaplasmataceae, encontram-se espécies de bactérias intracelulares obrigatórias causadoras de doenças que acometem os animais e humanos, com transmissão por picada de carrapatos da família Ixodidae, distribuídas nos gêneros *Anaplasma* e *Ehrlichia*.

O gênero *Anaplasma*, agrupa espécies com grande importância veterinária, como *A. bovis* e *A. marginale*, que infectam bovinos, *A. platys* que infecta cães, e *A. phagocytophilum*, espécie de caráter zoonótico, causador da anaplasmoze humana no hemisfério norte (DUMLER et al., 2001; DANTAS-TORRES, 2008). *Ehrlichia canis* é o agente etiológico da erliquiose canina, uma doença transmitida por carrapatos, com a maior repercussão na clínica de cães no Brasil (DAGNONE et al., 2003; MACHADO et al., 2006; VIEIRA et al., 2011; GOTTLIEB et al., 2016). Na erliquiose humana, as espécies incriminadas são *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* (DUMLER et al., 2001) e no Brasil,

casos humanos suspeitos foram relatados através de diagnóstico clínico e pesquisa sorológica (CALIC et al., 2004; LABRUNA et al., 2007)

No Brasil, espécies de *Babesia* são frequentemente reportadas infectando cães domésticos e canídeos silvestres, e *B. canis vogeli* é predominantemente o agente causador da babesiose canina, doença de ampla distribuição e alta prevalência. O vetor conhecido no Brasil é o carrapato *R. sanguineus*, espécie comum em áreas urbanas.(SPOLIDORIO et al., 2011; ARAUJO et al., 2015; ROTONDANO et al., 2015) Nos ambientes naturais, pouco se conhece sobre a presença de *Babesia* sp. na fauna silvestre e nos carrapatos.

O gênero *Coxiella* compreende pequenas bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias, e *Coxiella burnettii* é a espécie causadora de uma doença zoonótica denominada “febre Q”, que acomete os humanos, animais domésticos e silvestres (RAOULT; BROUQUI, 1999; RAOULT; MARRIE; MEGE, 2005). Embora não se conheça o papel dos carrapatos na cadeia epidemiológica desta doença, grande número de espécies foram relatadas infectadas, sugerindo uma possível via alternativa para a já conhecida transmissão via aerossóis e fluidos animais contaminados (PAROLA; RAOULT, 2001; DURON; JOURDAIN; MCCOY, 2014). No Brasil, estudos recentes apontam alta prevalência de diferentes genótipos de *Coxiella* endosimbiontes em algumas espécies de carrapatos, incluindo os gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *argasídeos* do gênero *Ornithodoros* (ALMEIDA et al., 2012; MACHADO-FERREIRA et al., 2016).

O gênero *Hepatozoon* é representado por mais de 300 espécies de protozoários, que acometem uma variedade de animais domésticos e silvestres, podendo ser encontrada nos cães, gatos e em carnívoros silvestres. Por acometerem cães domésticos, no Brasil os estudos envolvem principalmente *H. canis* e a fauna de carrapatos associada aos cães. Não se trata de uma zoonose, já que os cães adquirem o protozoário através da ingestão acidental de carrapatos ou presas infectadas (ANDRÉ et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; DEMONER et al., 2013; BRAGA et al., 2016; WOLF et al., 2016).

Os animais silvestres de vida livre representam uma valiosa fonte de informação. Podem ser considerados indicadores de qualidade ambiental, já

que podem demonstrar, através de doenças, desequilíbrios no ambiente no qual estão inseridos. Sua saúde e o bom estado nutricional sugerem boa capacidade de suporte e qualidade ambiental.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar a fauna de carrapatos e pequenos mamíferos hospedeiros na Reserva Florestal do Morro Grande, e a circulação de microrganismos infecciosos a eles associados.

3.2 Objetivos específicos

- Investigar a fauna de pequenos mamíferos silvestres hospedeiros e os carrapatos em parasitismo;
- Vistoriar os cães domésticos errantes no interior da RFMG para a busca de carrapatos em parasitismo;
- Identificar os carrapatos em fase não parasitária obtidos da vegetação, em duas áreas da RFMG;
- Pesquisar a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. nos animais, frente a cinco diferentes antígenos;
- Investigar a presença dos microrganismos *Rickettsia* sp., *Ehrlichia* sp., *Anaplasma* sp., *Hepatozoon* sp, *Babesia* sp., *Coxiella* sp. e *Borrelia* sp. nos carrapatos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Área de Estudo

A Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG) abrange uma área de 10.870 hectares ($23^{\circ}39'-23^{\circ}48'S$, $47^{\circ}01'-46^{\circ}55'W$) no Planalto Atlântico, em altitudes que variam de 860 a 1075 metros. Representa uma das maiores extensões de florestas contínuas remanescentes no Planalto Paulistano, uma região de transição climática, geomorfológica e fitofisionômicas entre os regimes pluviais tropicais de litoral e de encosta Atlântica, em contraste com o clima estacional do interior do estado de São Paulo (METZGER et al., 2006; IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2012).

Figura 1 - Localização geográfica da Reserva Florestal do Morro Grande, município de Cotia, Grande São Paulo. Os círculos brancos representam o Reservatório da Graça e a Represa Pedro Beicht.

Fonte: <http://maps.google.com.br>

A cobertura florestal predominante é a Floresta Ombrófila Densa, com contribuições da Floresta Estacional Semidecidual e das florestas mistas com Araucária, todas pertencentes ao domínio da Mata Atlântica. Sua criação data de 1979, com a destinação de preservar a fauna e flora locais, com vistas a

proteção de seus mananciais. É uma área particular gerenciada pela Sabesp e abriga o sistema produtor de água denominada Alto-Cotia, composto por duas barragens (Represa Pedro Beicht e Represa da Graça) e o aparato de tratamento e distribuição para cerca de 500.000 habitantes da Grande São Paulo.

O entorno da Reserva é altamente antropizado, e sofre grande pressão pela expansão imobiliária, além de ser um importante ponto de visitação para atividades de educação ambiental. Eventualmente, é utilizada para atividades de lazer pelos funcionários da empresa, além de ser constantemente invadida para atividades de pesca e caça ilegais.

Para as coletas de carrapatos e instalação de armadilhas de captura de pequenos mamíferos, foram amostradas duas áreas, adjacentes às barragens (Reservatório Pedro Beicht – coordenadas: -23.715611, -46.958111) e Reservatório da Graça (coordenadas: -23.653201, -46.966179), que possuem acesso por estradas de terra e trilhas de uso local.

Figura 2 – Locais de instalação das armadilhas para captura de pequenos mamíferos silvestres.

Legenda: A - Represa Pedro Beicht; B - Reservatório da Graça.

Fonte: RAMIREZ, D.G, (2015)

4.2 Coleta de Roedores e Marsupiais

As etapas de campo foram conduzidas bimestralmente, cada uma delas somando 4 noites de armadilhamento, entre os meses de março de 2013 e dezembro de 2015. Foram utilizadas um total de 70 armadilhas de captura,

sendo 40 do tipo Sherman e 30 do tipo Tomahawk, que foram divididas em 35 para cada área. Os transectos utilizados para instalação das armadilhas localizam-se próximos a cursos de água, recurso que atrai grande diversidade de animais, incluindo roedores e marsupiais. As armadilhas Sherman foram iscadas com um preparado composto de fubá, frutas (banana ou manga) e sardinhas em conserva em óleo comestível. As armadilhas Tomahawk foram iscadas com bacon e mortadela industrializada. Foram então instaladas dispostas no chão da mata, intercalando tipo Sherman e Tomahawk e, sempre que possível, colocadas também suspensas em galhos, para a captura de animais arborícolas.

As armadilhas foram checadas diariamente e os animais então anestesiados, fotografados, medidos e pesados para identificação (Figura 3). Os indivíduos impossibilitados de identificação no campo, aqueles que eventualmente vieram a óbito na armadilha ou durante a manipulação, além de exemplares escolhidos como material-testemunho, foram encaminhados para identificação taxonômica a cargo da mastozoóloga Dra. Erika Hingst Zaher, e tombados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo.

Os animais foram individualmente vistoriados a procura de ectoparasitos aderidos na pelagem, e uma parte foi coletada amostra de sangue, ainda sob anestesia, para a pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* spp., pela técnica da RIFI.

O sangue dos marsupiais e roedores de médio porte foi colhido pela veia caudal, e roedores de pequeno porte, via punção intracardíaca. Após os procedimentos, foi feita marcação dos animais para evitar recapturas, através de cortes na pelagem e picote na orelha, e então devolvidos ao ambiente.

Os carrapatos foram removidos por torção utilizando-se pinças anatômicas, e trazidos vivos ao laboratório para congelamento. Larvas, quando em grande número ou de tamanho muito reduzido, foram dispostas em microtubos com álcool 100%, para evitar fugas e perdas de carrapatos.

4.3 Coleta de cães domésticos

Quando do encontro casual de cães errantes no interior e cercanias da RFMG e/ou aqueles domiciliados próximos aos acessos, estes foram

vistoriados à procura de carrapatos e, quando possível, foi colhida amostra de sangue. No caso de cães domiciliados, somente aqueles cujo proprietário relatou haver exposição regular à mata foram inspecionados, descartando-se os indivíduos que permanecem apenas no interior da residência. Os procedimentos para retirada dos carrapatos e sangue foram realizados apenas com a contenção mecânica dos animais, sem a necessidade de anestesia.

4.4 Coleta de carrapatos na vegetação

Para as capturas de carrapatos em fase não parasitária, foram empregadas a busca visual de adultos e a técnica conhecida como arraste de flanela, que consiste na busca de carrapatos distribuídos na vegetação, com o auxílio de um tecido, conforme Terassini et al. (2010). Os carrapatos se aderem ao pano, que mimetiza a passagem de um hospedeiro, sendo então coletados manualmente. Utilizamos tecidos flanelados de cor clara com medidas de 50 por 100cm, inspecionados a cada 15 a 20 metros percorridos na trilha (Figura 3). Os espécimes foram alojados em tubos plásticos do tipo Falcon, e transportados ao laboratório para identificação taxonômica e posterior processamento.

Foram escolhidas 4 grandes trilhas pré-existentes na RFMG, sendo 2 em cada uma das áreas (Represa da Graça e Represa Pedro Beicht), preferencialmente aquelas que apresentavam vestígios de passagem frequente de fauna (fezes e pegadas) de animais. As trilhas foram percorridas em duplas, e o tempo de caminhada estipulado foi de aproximadamente 70 minutos por trilha, em todas as etapas de arraste.

4.5. Identificação dos carrapatos

Os carrapatos em estágio adulto dos gêneros *Ixodes* e *Amblyomma*, foram identificados por meio de chaves dicotômicas, respectivamente (ONOFRIO et al. 2006; ONOFRIO et al., 2009). Espécimes imaturos de *Ixodes* foram identificados por meio de descrições originais (BARROS-BATTESTI et al., 2003, 2007; MARQUES et al., 2004; ONOFRIO et al., 2010). Ninfas de *Amblyomma* foram identificadas pela chave dicotômica de (MARTINS et al.,

2010). Larvas de *Amblyomma*, entretanto, são identificadas por meio de sequenciamento gênico.

Figura 3 – Identificação dos animais silvestres, e arraste de flanela para coleta de carrapatos na vegetação.

Legenda: A, B – Identificação e processamento de pequenos mamíferos; C – Coleta de carrapatos na vegetação, pela técnica de arraste; D – Pegada de *Tapirus terrestris*

Fonte: RAMIREZ, D.G, (2015).

4.6 Extração de DNA

A extração de DNA dos carrapatos foi realizada pelo protocolo de Isotiocianato de Guanidina, conforme descrito previamente por SANGIONI et al., 2005.

Os carrapatos adultos foram processados individualmente, e os estágios imaturos individualmente ou em “pools”, quando em grande quantidade (ninfas e larvas de *Amblyomma* sp.). Ninfas e larvas oriundas de um mesmo hospedeiro, e também aquelas coletadas na vegetação, foram processadas em grupos de até 5 ninfas e até 10 larvas. Cada “pool” recebeu número de identificação individual. Para verificar a quantidade de DNA obtido para cada

amostra, foi feita a quantificação em Espectofotômetro com comprimento de onda de 260 nm (Nanodrop 2000 Spectrophotometer® UV-vis, ThermoScientific, USA).

4.7 Amplificação de DNA pela técnica da PCR

As amostras de DNA foram testadas para a presença dos microrganismos *Rickettsia spp.*, *Anaplasma spp.*, *Ehrlichia spp.*, *Hepatozoon spp.*, *Babesia spp.*, *Borrelia spp.* e *Coxiella spp.*, pela técnica molecular da PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), que permite que um fragmento específico da molécula de DNA seja amplificado milhares de vezes in vitro. Assim, foi possível conseguir cópias de uma região ou gene alvo, para comparação com os organismos próximos. As reações foram feitas em termociclador com gradiente de temperatura da marca Eppendorf®, em microtubos com concentração final de 25ul (2,5ul da amostra de DNA e 22,5ul de Mix PCR). O mix foi preparado na proporção de 8ul de H₂O Mq, 1ul de primer “forward” e 1ul de primer “reverse”, além de 12,5ul do produto comercial DreamTaq Green PCR Master Mix® (ThermoFisher), seguindo as instruções do fabricante. As temperaturas de anelamento dos primers no termociclador foram utilizadas conforme a literatura.

Os produtos de PCR foram submetidos a eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,5%, marcados com o corante SYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies) e visualizados sob luz ultravioleta (UV) em câmara escura (AlphaImager®). As amostras que revelaram bandas na altura dos controles positivos foram consideradas positivas.

A descrição do conjunto de primers, os respectivos genes alvo e os protocolos seguidos para cada reação de PCR, são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista dos *primers* utilizados nas amplificações pela técnica da PCR (Reação em Cadeia Pela Polimerase)

Genes e primers	Especificidade	Sequência dos primers (5' - 3')	Tamanho do fragmento	Referência
gltA	<i>Rickettsia</i> spp.			
CS78-F		GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401 pb	Labruna et al., 2004
CS323-R		GCTTCCTTAAAAATTCAATAAATCAGGAT		
OmpA	<i>Rickettsia</i> spp. GFM			
190.70-F		ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	632 pb	Regnery et al., 1991
190.602-R		AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT		
OmpB	<i>Rickettsia</i> spp. GFM			
120-M59		CCGCAGGGTTGGTAACTGC	856 pb	Roux & Raoult 2000
120-807		CCTTTTAGATTACCGCTAA		
16S	Anaplasmataceae			
EHR16S-F		GCTTCCTTAAAAATTCAATAAATCAGGAT	345 pb	Inokuma et al., 2000
EHR16S-R		GCTTCCTTAAAAATTCAATAAATCAGGAT		
Dsb	<i>Ehrlichia</i> spp.			
DSB330-F		GATGATGTTTGAAGATATSAAACAAAT	401 pb	Doyle et al., 2005
DSB720-R		CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAATC		
DSB380-F		ATTTTATAGRATTTTCCAATACTTGG	349 pb	Almeida et al., 2013
Flab	<i>Borrelia</i> spp.			
FLALS-F		AACAGCTGAAGAGCTTGGAAAT	354 pb	Stromdahl et al., 2003
FLARS-R		CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC		
18S	<i>Babesia</i> spp.			
BAB143-167-F		CCGTGCTAATTGTAGGGCTAATACA	551 pb	Almeida et al., 2012
BAB694-667-R		GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG		
18S	<i>Hepatozoon</i> spp.			
HEP142-169-F		GCTTGAAACACTCTARTTTTCTCAAAG	574 pb	Almeida et al., 2013
HEP743-718-R		ACAATAAAGTAAAAACAAYTCAAAG		
16S	<i>Coxiella</i> spp.			
16S-F		CGGCTTCCCGAAGGTTAG	532 pb	Almeida et al., 2012
16S-R		TGCATCGAATTAAACCACATGCTCCACCGC		
16S	Carrapatos			
16S-F		CCGGTCTGAAGTCAAGTCAAGT	460 pb	Mangold et al., 1998
16S-R		GCTCAATGATTTTAAATTGCTGT		
12S	Carrapatos			
T1B		AAACTAGGATTAGATACCTT	360 pb	Beati and Keirans, 2001
T2A		AATGAGAGCGACGGGCGATGT		
ITS2	Carrapatos			
ITS2-F		ACATTGCGCCTTGGGTCTT	1200 a 1600 pb	Jizhou et al., 2014
ITS2-R		TCGCCTGATCTGAGGTCGAC		

4.8 Sequenciamento dos produtos da PCR

Os produtos amplificados foram então submetidos à purificação de DNA através do produto comercial ExoSa-IT (USB Corporation), e encaminhados para sequenciamento gênico, em laboratório externo (Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo).

Os sequenciamentos dos produtos de PCR foram feitos utilizando o produto comercial BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, em sequenciador automático de DNA, analisados pelo software Sequencing Analysis 5.3.1. As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa SeqMan e submetidas a análise por homologia através do BLAST, com sequências disponíveis no banco de dados do GenBank.

4.9 Sorologia para pesquisa de anticorpos para *Rickettsia* spp.

Para a avaliação da presença de anticorpos anti-*Rickettsia* nos animais, foi utilizada a técnica sorológica da Reação de ImunoFluorescência Indireta (RIFI). Foram testados os antígenos de cinco espécies (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*). Em cada lâmina, soros sabidamente negativos e positivos foram utilizados como controles.

Os soros reativos na diluição 1:64 para qualquer espécie de *Rickettsia* foram então testados em diluições seriadas (1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048...), para a determinação do título final de reatividade. Para os soros que foram reativos para mais de uma espécie testada, considerou-se aquele que demonstrou um título quatro vezes maior, comparado ao outro, sendo assim considerado homólogo, conforme padrões previamente definidos (Horta et al., 2004).

5 RESULTADOS

5.1 Hospedeiros e Carrapatos

Foram realizadas 18 campanhas de coleta, de março de 2013 e dezembro de 2015, na Reserva Florestal do Morro Grande, que resultaram na captura de 158 pequenos mamíferos silvestres e cães, distribuídos em 126 roedores de 10 espécies, 26 marsupiais de 3 espécies, um tapiti (lebre silvestre), além de 5 cães domésticos inspecionados. Destes hospedeiros, foram recolhidos 327 carrapatos representados por 9 espécies de 4 diferentes gêneros, além de larvas de *Amblyomma* sp. A distribuição dos hospedeiros capturados e carrapatos coletados está apresentada na Tabela 2.

Entre os pequenos mamíferos silvestres, a espécie mais abundante foi *Akodon c.f. montensis*, que somou 56 indivíduos, representando 35,5% de todos os animais coletados ao longo do estudo. Foi também o roedor que apresentou a maior riqueza de espécies de carrapatos. A prevalência de indivíduos parasitados foi 33,93%, sendo encontradas 5 diferentes espécies, das quais 4 pertencentes ao gênero *Ixodes*: *I. aragaoi*, *I. c.f. fuscipes*, *I. loricatus* e *I. schulzei*, além de larvas de *A. dubitatum* e *Amblyomma* sp.

Das 14 espécies de pequenos mamíferos silvestres coletados, apenas no roedor *Oxymycterus c.f. dasytrichus* e no marsupial *Marmosops incanus* não observamos nenhum carrapato em parasitismo durante a inspeção, embora tenham sido capturados somente dois exemplares da primeira e apenas um da segunda espécie de hospedeiro.

Dentre os carrapatos recolhidos nos hospedeiros, a espécie mais abundante foi *I. loricatus*, comumente encontrada em marsupiais do gênero *Didelphis*, sobretudo em estágio adulto. Estes hospedeiros são representados na área de estudo pela espécie *D. aurita*, que foi o marsupial mais abundante, com 17 exemplares capturados, e também o animal silvestre de maior prevalência de parasitismo por carrapatos (70,59%) dentre todos os examinados. A maior riqueza de carrapatos em hospedeiros, juntamente com *A. c.f. montensis*, ocorreu neste marsupial, encontrado parasitado por 5 diferentes espécies (*I. loricatus*, *I. aragaoi*, *I. schulzei*, *I. c.f. fuscipes* e *A. dubitatum*) (Tabela 2).

Tabela 2 – Número de machos (M), fêmeas (F), ninfas (N) e larvas (L) de carrapatos coletados em pequenos mamíferos silvestres e cães da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), no município de Cotia, São Paulo, de março de 2013 e dezembro de 2015

Hospedeiros (nº total)	<i>A. aureolatum</i>	<i>A. dubitatum</i>	<i>A. sculptum</i>	<i>Amblyomma</i> sp.	<i>H. leporispalustris</i>	<i>I. aragaoi</i>	<i>I. c.f.fuscipes</i>	<i>I. loricatus</i>	<i>I. schulzei</i>	<i>R. sanguineus</i>	Total
DIDELPHIMORPHIA											
<i>Didelphis aurita</i> (17)		38L				1N, 5L	3N	32F, 11M, 2L	1L		93 (32F, 11M, 4N, 46L)
<i>Marmosops incanus</i> (1)											
<i>Monodelphis americana</i> (8)						3L		2N, 36L			41 (2N, 39L)
RODENTIA											
<i>Akodon c.f. montensis</i> (56)		1L		1L		16L	12L	1F, 1M, 1N	4N, 7L		44 (1F, 1M, 5N, 37L)
<i>Brucepattersonius</i> sp. (4)						1N, 1L			2L		4 (1N, 3L)
<i>Delomys c.f. sublineatus</i> (9)						26L		1L	1L		28 (28L)
<i>Euryoryzomys russatus</i> (9)						5L	3N				8 (3N, 5L)
<i>Necomys</i> sp. (2)								1L			1 (1L)
<i>Nectomys squamipes</i> (9)		4L		2L		10L					16 (16L)
<i>Oligoryzomys nigripes</i> (9)						1N, 21L	1L	1L	1L		25 (1N, 24L)
<i>Oxymycterus c.f. dasytrichus</i> (2)											
<i>Rhipidomys</i> sp. (1)									1L		1(1L)
<i>Thaptomys nigrita</i> (25)		4L						1F, 2M, 1L	1L		9 (1F, 2M, 6L)
LAGOMORPHA											
<i>Sylvilagus</i> sp. (1)						3M, 8F					8 (3M, 8F)
CARNIVORA											
<i>C. familiaris</i> (6)	13F, 7M		1F, 3M							11F, 1M, 11N	47 (25F, 11M, 11N)
Total (158)	20 (13F, 7M)	47 (47L)	4 (1F, 3M)	3 (3L)	11 (3M, 8F)	90 (3N, 87L)	19 (6N, 13L)	93 (34F, 14M, 3N, 42L)	18 (4N, 14L)	23 (11F, 1M, 11N)	328

Tabela 3 – Índices de infestação de hospedeiros por carrapatos

	Hospedeiros		Carrapatos				
	Total	Infestados	Total	Prevalência (%)	Abundância	Intensidade	Riqueza
DIDELPHIMORPHIA							
<i>Didelphis aurita</i>	17	12	93	70,59	5,47	7,75	5
<i>Marmosops incanus</i>	1	0	0	0,00	0,00	0,00	0
<i>Monodelphis americana</i>	8	1	41	12,50	5,13	41,00	2
RODENTIA							
<i>Akodon c.f. montensis</i>	56	19	44	33,93	0,79	2,32	6
<i>Bucepattersonius sp.</i>	4	2	4	50,00	1,00	2,00	2
<i>Delomys c.f. sublineatus</i>	9	6	28	66,67	3,11	4,67	3
<i>Euryoryzomys russatus</i>	9	4	8	44,44	0,89	2,00	2
<i>Necomys sp.</i>	2	1	1	50,00	0,50	1,00	1
<i>Nectomys squamipes</i>	9	3	16	33,33	1,78	5,33	3
<i>Olygoryzomys nigripes</i>	9	5	25	55,56	2,78	5,00	4
<i>Oxymycterus c.f. dasytrichus</i>	2	0	0	0,00	0,00	0,00	0
<i>Rhipidomys sp.</i>	1	1	1	100,00	1,00	1,00	1
<i>Thaptomys nigrita</i>	25	3	9	12,00	0,36	3,00	3
LAGOMORPHA							
<i>Sylvilagus sp.</i>	1	1	11	100,00	11,00	11,00	1
CARNÍVORA							
<i>C. familiaris</i> (6)	6	2	46	33,33	7,67	23,00	3
Total	159	60	327	37,74	2,06	5,45	10

Outro carrapato muito abundante nos pequenos mamíferos, *I. aragaoi*, foi encontrado parasitando 8 diferentes espécies de roedores e marsupiais, exclusivamente estágios imaturos, somando 90 indivíduos coletados.

As identificações morfológicas das larvas dos carrapatos do gênero *Ixodes* encontrados nos pequenos mamíferos (*I. aragaoi*, *I. c.f. fuscipes*, *I. loricatus* e *I. schulzei*) foram suportadas por sequenciamento gênico, feito em diferentes amostras selecionadas destes carrapatos. Para o gênero *Amblyomma*, a única espécie identificada em parasitismo nos pequenos mamíferos foi *A. dubitatum*, encontrada em 3 diferentes espécies de roedores e, principalmente em gambás. Esses carrapatos estavam no estágio larval, e foram identificados através de sequenciamento gênico.

Foram vistoriados para a presença de carrapatos 6 cães domésticos, 3 deles encontrados no interior da RFMG circulando nas trilhas (não apresentando carrapatos no momento da inspeção), e 3 cães residentes

próximos a duas diferentes entradas da reserva (2 animais em uma casa e 1 em outra) que, segundo seus proprietários, tinham acesso esporádico a mata. Todos estavam parasitados, e um animal apresentou parasitismo simultâneo por 3 diferentes espécies de carrapatos (*A. aureolatum*, *A. sculptum* e *R. sanguineus* s.l.). No domicílio deste animal, observamos adultos não alimentados de *A. sculptum* se abrigando em fissuras das paredes externas da casa, num local desprovido de vegetação próxima e pouco sombreado.

Figura 4 – Adulto de *Amblyomma sculptum* utilizando fissura de parede de alvenaria como abrigo

Fonte: RAMIREZ, D.G (2015)

Simultaneamente a pesquisa de carrapatos em hospedeiros, foi realizada a procura de exemplares em vida livre na vegetação, através da técnica de arraste e busca visual. Um total de 597 exemplares foi recolhido e identificado, distribuídos em 9 espécies e 3 gêneros, além de larvas do gênero *Amblyomma*.

As espécies mais abundantes foram *A. incisum* (N=165), *A. brasiliense* (N=162), e *Haemaphysalis juxtakochi* (N=111), e o estágio ninfal teve maior proporção nas 3 espécies. Além destas, destacam-se dois carrapatos do gênero *Ixodes*, *I. aragaoi* e *I. c.f. auritulus*, com um total de 53 e 36 exemplares coletados na vegetação, respectivamente. Houve predominância de estágios imaturos em *I. c.f. auritulus*, enquanto que *I. aragaoi* foram coletados exclusivamente exemplares adultos (Tabela 4).

Tabela 4 – Número de machos (M), fêmeas (F), ninfas (N) e larvas (L) coletados na vegetação da Reserva Florestal do Morro Grande (RFMG), de março de 2013 e dezembro de 2015

Espécies de carrapatos	Estação seca	Estação chuvosa	Total
<i>Amblyomma brasiliense</i>	4M, 2F, 94N, 9L	4M, 49N	162 (8M, 2F, 143N, 9L)
<i>Amblyomma sculptum</i>	1M, 1F, 3N	3F, 2N	10 (1M, 4F, 5N)
<i>Amblyomma sp.</i>	40L	1L	41 (41L)
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	5M, 5F, 61N, 5L	2M, 1F, 22N, 10L	111 (7M, 6F, 83N, 15L)
<i>Ixodes aragaoi</i>	21M, 26F	4M, 2F	53 (25M, 28F)
<i>Ixodes cf. auritulus</i>	2F, 13N, 13L	1F, 1N, 6L	36 (3F, 14N, 19L)
<i>Amblyomma incisum</i>	2M, 1F, 66N, 10L	1M, 83N, 2L	165 (3M, 1F, 149N, 12L)
<i>Amblyomma naponense</i>	2N	1F	3 (1F, 2N)
<i>A. aureolatum</i>	1M, 8N	2F, 1N	12 (1M, 2F, 9N)
<i>A. dubitatum</i>	2N	2N	4 (4N)
Total	397 (34M, 37F, 249N, 77L)	200 (11M, 10F, 160N, 19L)	597

Merece destaque os repetidos encontros que tivemos ao longo das campanhas de campo, de sinais de atividade humanas predatória (caça e pesca ilegais) na RFMG. Em muitas oportunidades, nos deparamos com ceva e armadilhas para caça, e acampamentos clandestinos que geram muita sujeira e poluição local (Figura 5). Houve inclusive episódios de roubos de algumas das nossas armadilhas.

Figura 5 – Sinais de atividades de caça e pesca ilegais na mata da RFMG

Legenda: A – Acampamento improvisado; B – Plataforma de madeira utilizada por caçadores; C – Ceva com milho para atração de fauna
 Fonte: RAMIREZ, D.G (2015)

5.2 Sorologia

Foi feita a sorologia para a pesquisa da presença de anticorpos anti *Rickettsia* spp. pela técnica de RIFI, em um total de 102 animais, sendo 78 roedores de 9 espécies, 18 marsupiais de 2 espécies, 1 lagomorfo e 5 cães domésticos. Destes, 39 (38,2%) animais foram soro reativos para pelo menos um dos 5 antígenos testados (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii* e *R. bellii*). Com exceção dos cães domésticos, que se mostraram todos negativos (vale ressaltar o pequeno número de soros testados), a soro positividade apresentada por alguns dos pequenos mamíferos silvestres coletados ao longo de quase três anos demonstram haver a circulação de cepas de *Rickettsia* naquela região.

A grande maioria dos animais foi positiva para mais de um antígeno, e apresentou títulos finais entre esses antígenos cujo valor não nos permite sugerir um provável antígeno homólogo (PAH). Estes foram considerados apenas nos casos onde um título final foi ao menos quatro vezes maior, quando comparado aos demais. Dos 39 animais positivos, em seis amostras nós sugerimos um PAH, sendo *R. bellii* (3), *R. rickettsii* (2) e *R. rhipicephali* (1).

Das nove espécies de roedores silvestres submetidos à RIFI, oito foram positivas para ao menos um dos antígenos, com exceção de *Oligoryzomys nigripes*, que foi negativa nos 4 soros testados. Três soros de roedores apresentaram PAH para *R. bellii* (1), *R. rhipicephali* (1) e *R. rickettsii* (1). No caso dos marsupiais, as duas espécies desafiadas (*D. aurita* e *M. americana*) apresentaram títulos para ao menos um antígeno de *Rickettsia* spp. O único exemplar de lagomorfo capturado, *Sylvilagus* sp., apresentou título de 1:64 para o antígeno de *R. rickettsii* (Tabela 5).

O roedor *A. montensis* foi a espécie mais abundante entre todas as coletadas e, conseqüentemente aquela com maior número de exemplares submetidos à RIFI, apresentando uma alta prevalência de soro reativos (48,5%). Outras duas espécies de roedores apresentaram prevalência igual ou superior a 50%, porém apenas dois exemplares de cada uma foram empregados.

O marsupial *D. aurita* apresentou uma alta prevalência de animais soro reativos, que superou os 50%. Dentre os 8 soros positivos, 2 deles foram

homólogos para *R. bellii* e 1 para *R. rickettsii*. A cuíca da espécie *M. americana* apresentou um animal soro reativo dentre as 3 amostras submetidas à RIFI. (Tabela 6).

Tabela 5 - Pequenos mamíferos silvestres com presença de anticorpos anti *Rickettsia* spp. testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), coletados na RFMG, de março de 2013 e dezembro de 2015

Animais	Nº positivos/ Nº testados (%)	Número de animais soro reativos para cada antígeno de <i>Rickettsia</i> spp.					PAH
<i>R. rickettsii</i> <i>R. parkeri</i> <i>R. rhipicephali</i> <i>R. amblyommii</i> <i>R. bellii</i>							
Rodentia							
<i>Akodon montensis</i>	16/33 (48,5)	15	15	15	14	14	<i>R. bellii</i> (1)
<i>Brucepattersonius</i> sp.	1/3 (33,3)	1	-	-	1	-	-
<i>Delomys sublineatus</i>	3/8 (37,5)	2	2	2	2	3	<i>R. rhipicephali</i> (1)
<i>Euryoryzomys russatus</i>	2/7 (28,6)	2	1	1	1	1	-
<i>Necomys</i> sp.	1/2 (50)	1	-	-	-	-	<i>R. rickettsii</i> (1)
<i>Nectomys squamipes</i>	1/6 (16,6)	-	-	1	1	1	-
<i>Oxymycterus dasytrichus</i>	2/2 (100)	2	2	2	2	2	-
<i>Thaptomys nigrita</i>	3/13 (23)	3	2	1	2	2	-
Didelphimorphia							
<i>Didelphis aurita</i>	8/15 (53,3)	6	5	6	4	3	<i>R. bellii</i> <i>R. rickettsii</i> (1)
<i>Monodelphis americana</i>	1/3 (33,3)	1	-	-	-	-	-
Lagomorpha							
<i>Sylvilagus</i> sp.	1/1 (100)	1	-	-	-	-	-

Legenda: PAH - provável antígeno homólogo

Tabela 6 - Títulos sorológicos frente a 5 antígenos de *Rickettsia* spp. em pequenos mamíferos silvestres coletados na RFMG, testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Animais	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. amblyomi</i>	<i>R. bellii</i>	PAH
Rodentia						
<i>A. montensis</i>	512	256	128	256	256	
<i>A. montensis</i>	512	256	128	256	256	
<i>A. montensis</i>	-	64	64	-	256	<i>R. bellii</i>
<i>A. montensis</i>	128	-	-	64	-	
<i>A. montensis</i>	512	256	256	256	512	
<i>A. montensis</i>	128	256	128	128	512	
<i>A. montensis</i>	128	128	128	128	256	
<i>A. montensis</i>	256	64	128	128	256	
<i>A. montensis</i>	128	64	64	64	128	
<i>A. montensis</i>	128	128	128	64	128	
<i>A. montensis</i>	256	256	256	256	512	
<i>A. montensis</i>	512	256	256	256	256	
<i>A. montensis</i>	256	128	128	256	128	
<i>A. montensis</i>	128	64	64	128	64	
<i>A. montensis</i>	256	128	128	128	256	
<i>A. montensis</i>	128	64	64	-	-	
<i>Bucepattersonius</i>	128	-	-	64	-	
<i>D. sublineatus</i>	-	64	256	64	64	<i>R. rhipicephali</i>
<i>D. sublineatus</i>	256	128	128	128	128	
<i>D. sublineatus</i>	64	-	-	-	64	
<i>E. russatus</i>	64	-	-	64	-	
<i>E. russatus</i>	128	64	64	-	128	
<i>Necromys</i>	128	-	-	-	-	<i>R. rickettsii</i>
<i>N. squamipes</i>	-	-	128	64	64	
<i>O. dasytrichus</i>	256	64	256	256	128	
<i>O. dasytrichus</i>	512	128	128	256	128	
<i>T. nigrita</i>	64	64	-	-	128	
<i>T. nigrita</i>	64	-	-	64	128	
<i>T. nigrita</i>	128	64	64	128	-	
Didelphimorphia						
<i>D. aurita</i>	64	128	128	128	-	
<i>D. aurita</i>	512	256	256	-	-	
<i>D. aurita</i>	256	512	128	128	-	
<i>D. aurita</i>	256	256	128	256	-	
<i>D. aurita</i>	256	256	256	256	128	
<i>D. aurita</i>	128	-	-	-	-	<i>R. rickettsii</i>
<i>D. aurita</i>	-	-	64	-	2048	<i>R. bellii</i>
<i>D. aurita</i>	-	-	-	-	128	<i>R. bellii</i>
<i>M. americana</i>	64	-	-	-	-	
Lagomorpha						
<i>S. brasiliensis</i>	64	-	-	-	-	

5.3 Pesquisa de patógenos pela técnica de PCR

No total, aproximadamente 500 carrapatos em todos os estágios biológicos (larvas, ninfas e adultos) oriundos dos hospedeiros e da vegetação foram submetidos à extração de DNA e posterior PCR para pesquisa de *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp., *Babesia* spp., *Coxiella* spp., *Hepatozoon* spp. e membros da família Anaplasmataceae. Todas as espécies de carrapatos encontradas no presente estudo tiveram exemplares selecionados e testados. Os carrapatos não utilizados nesta etapa foram preservados para posterior tombamento em coleção zoológica como material testemunho, especialmente aqueles pertencentes a táxons pouco frequentes (espécies do gênero *Ixodes*, com exceção a *I. loricatus*).

Exemplares imaturos das espécies de *Amblyomma* (*A. brasiliense* e *A. incisum*) e *Haemaphysalis juxtakochi* colhidos na vegetação, foram processados em “pools” de ninfas com 5 indivíduos cada, por se apresentarem em maior número.

Na pesquisa de riquetsias, 36 de um total de 40 amostras de *I. aragaoi* adultos, um pool de 10 larvas de *A. incisum* e uma fêmea de *A. sculptum*, todos coletados na vegetação, foram positivas na PCR que amplifica um fragmento de 401 pb do gene *gltA* de *Rickettsia* spp. As amostras foram então submetidas a nova PCR, que amplifica um fragmento de 630 pb do gene *ompA*, presente apenas nas riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM). Aquelas provenientes de *I. aragaoi* e *A. sculptum* foram positivas na segunda reação de PCR, e o produto amplificado foi então submetido a purificação do DNA e sequenciamento gênico, assim como o amplificado do gene *gltA* oriundo de larvas de *A. incisum*.

A análise de similaridade pelo Blast das sequências provenientes de *A. sculptum* apresentaram 99% de homologia com sequências de *R. parkeri* isoladas de *Amblyomma triste* (AIJ01124, KF782320) no Brasil, Uruguai e Argentina, disponíveis no GenBank.

Foram selecionadas quatro amostras positivas para o gene *ompA* (2 machos e 2 de fêmeas) obtidos em *I. aragaoi*, para sequenciamento gênico dos produtos amplificados. A análise de similaridade pelo Blast apresentou 99% de homologia com riquetsias encontradas em *I. minor* e *I. boliviensis* na América

Central (KF702334; KJ507218), que são geneticamente relacionadas ao grupo *R. monacensis*, endosimbiontes dos carrapatos *I. scapularis*.

Na pesquisa da presença de protozoários do gênero *Hepatozoon*, encontramos duas amostras positivas na reação de PCR que amplifica um fragmento de 574 pb do gene 18S rRNA. O DNA é oriundo de larvas de *I.c.f. fuscipes* e *I. schulzei* coletadas em roedores da espécie *Akodon montensis*. As análises das sequências pelo Blast apresentaram 99% de homologia com linhagens de *Hepatozoon* sp. (FJ719819.1, FJ719818.1, FJ719817.1) isoladas do sangue de um marsupial, *Dromiciops gliroides* no Chile.

Três pools (1 com larvas e 2 com ninfas) de *A. incisum* foram positivos na PCR na pesquisa da presença de piroplasmídeos do gênero *Babesia*, utilizando um par de primers que amplifica um fragmento de 551 pb do gene 18S rDNA. As análises pelo Blast de sequências homólogas no Genbank apontaram 94% de similaridade com sequências de *Babesia macropus* (KM206774.1, KM206773.1) isoladas de sangue e tecidos de duas espécies de cangurus na região de Queensland, em um estudo retrospectivo de surtos de anemia e mortalidade.

Na procura de DNA de *Coxiella* spp. utilizando um par de primers que amplificam um fragmento de 532 pb do gene 16SrDNA, 14 amostras de diferentes espécies do gênero *Amblyomma* (*A. aureolatum* [F]; *A. brasiliense* [N]; *A. incisum* [N e L]; *A. naponense* [N]; *A. sculptum* [F e N]) foram positivas. Os contigs das sequências geradas e analisadas foram semelhantes entre si, e apresentaram homologia entre 98 e 99% com DNA de *Coxiella* endosimbiontes de carrapatos ixodídeos (KP994826.1, KP994825.1, KP994818.1, KR820012.1, KJ459074.1) disponíveis no Genbank.

Não encontramos amostras positivas na pesquisa de DNA de membros da família Anaplasmataceae e do gênero *Borrelia*, através da técnica da PCR. As amostras com DNA extraído viável foram testadas para todos os agentes propostos nos objetivos do estudo.

6 DISCUSSÃO

6.1 Hospedeiros e carrapatos em parasitismo

Conforme apresentado nos resultados, foi coletado um total de 153 pequenos mamíferos silvestres durante as campanhas bimestrais realizadas entre os anos de 2013 e 2015, na RFMG. As espécies de roedores, marsupiais e lagomorfos aqui encontradas foram parcialmente relatadas em estudos prévios realizados nessa mesma reserva, conduzidos por Abel et al. (2000), Negrão & Valladares-Pádua (2006) e Pardini & Umetsu (2006). O roedor *Necomys* sp. não foi citado nessas publicações, o que faz com que sua coleta no presente estudo, seja o primeiro registro desta espécie para a RFMG.

Enquanto nós encontramos 10 espécies de roedores e 3 de marsupiais, Abel et al. (2000) encontraram 6 e 2, respectivamente, utilizando o mesmo tipo de armadilha. Os últimos dois autores acima mencionados encontraram 14 e 9, respectivamente. Todavia, esses estudos contaram também com o uso de armadilhas de queda (tipo pitfall), que não foram empregadas em nossas coletas, além de abrangerem um número bem maior de sítios de armadilhamento, já que o propósito desses trabalhos foi fazer um levantamento abrangente da mastofauna local.

Em relação aos carrapatos encontrados em parasitismo nos marsupiais e roedores, observamos grande riqueza de exemplares do gênero *Ixodes*, representado por 4 diferentes espécies (*I. aragaoi*, *I. c.f. fuscipes*, *I. loricatus* e *I. schulzei*), com maior abundância de *I. aragaoi* e *I. loricatus*.

Abel et al. (2000) não relacionaram as espécies de hospedeiros com as de carrapatos coletados na RFMG, mencionando apenas que se tratavam de *I. loricatus*, *Ixodes* sp., *Amblyomma* sp. e do argasídeo *Ornithodoros* sp., e que todos os exemplares foram triturados para observação da presença de borrélias. Dessa forma, fica impossibilitada uma discussão mais ampla desse artigo com os achados no presente estudo.

O taxon *Ixodes aragaoi*, originalmente descrito e com registros somente para o Brasil, foi recentemente redescrito e validado, e os exemplares de *I. pararicinus* originário do Uruguai foram sinonimizado com este primeiro, expandindo assim sua área de ocorrência (ONOFRIO et al., 2014).

No Brasil, os cervídeos do gênero *Mazama* são apontados como os hospedeiros primários deste carrapato, inclusive tendo o seu material tipo coletado em *Mazama guazoubira* proveniente do município de Cotia, área de abrangência da RFMG (ARAGÃO & FONSECA, 1952). Além dos roedores sigdomontíneos do gênero *Akodon* e *Olygoryzomys nigripes*, os marsupiais do gênero *Monodelphis* são os hospedeiros conhecidos para os estágios imaturos de *I. aragaoi* no Brasil (ARZUA; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2005; BLANCO et al., 2016). No presente estudo, além de *Akodon* sp. e *O. nigripes* previamente registrados, nós relatamos o encontro de imaturos de *I. aragaoi* em cinco novos hospedeiros: o gambá *D. aurita* (1N e 5L) e os roedores cricetídeos *Bucepattersonius* sp. (1N e 1L), *Delomys c.f. sublineatus* (26L), *E. russatus* (5L) e *N. squamipes* (10L).

Carrapatos imaturos morfológicamente semelhantes a *I. fuscipes* foram encontrados durante exame dos espécimes coletados nos hospedeiros. Espécie neotropical, *I. fuscipes*, foi registrada somente em três países da América do Sul, incluindo o Brasil onde está distribuída por alguns estados das regiões Norte, Sudeste e Sul. Apesar dos poucos exemplares depositados em coleção, foi encontrada parasitando hospedeiros diversos como mamíferos das ordens Didelphimorphia e Rodentia (Sciuridae e Cricetidae), felídeos silvestres e aves (ARZUA; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2005; GUGLIELMONE et al., 2014).

Exemplares selecionados para PCR e sequenciamento gênico apresentaram 99% de homologia através do Blast com a sequência de *I. fuscipes* depositada no Genbank oriunda de uma fêmea coletada em *Olygoryzomys nigripes* no município de Jaborá/SC (número de acesso: KU894387.1) (BLANCO et al., 2016). No presente estudo, além de *O. nigripes*, foram encontrados espécimes deste carrapato em 4 roedores do gênero *Akodon*, 1 *E. russatus* e 2 gambás *D. aurita*, representando três novos registros de hospedeiro. Estes exemplares imaturos serão considerados como *I. c.f. fuscipes* até que seja finalizado um estudo taxonômico sobre carrapatos coletados no Brasil e identificados como *I. fuscipes*, e a possibilidade da ocorrência de novas espécies próximas, ainda não descritas.

Exemplares imaturos de *Ixodes schulzei* foram encontrados sobre sete diferentes espécies de pequenos mamíferos, distribuídos em seis roedores e

no marsupial *D. aurita*. Esta espécie de carrapato foi relatada somente para o Brasil e todos os registros prévios de hospedeiros estão associados com roedores cricetídeos das espécies *A. montensis*, *E. russatus*, *N. squamipes*, *O. flavencens* e *O. nigripes* (ARZUA; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2005; SARAIVA et al., 2012; ONOFRIO et al., 2013; BLANCO et al., 2016; COELHO et al., 2016; MARTINS et al., 2016).

Nós identificamos larvas de *I. schulzei* sobre quatro hospedeiros ainda não registrados, *Brucepattersonius* sp. (2L), *Delomys c.f. sublineatus* (1L), *Rhipidomys* sp. (1L) e *Thaptomys nigrita* (1L). Além dos cricetídeos citados, este é o primeiro registro de *I. schulzei* parasitando um marsupial no Brasil, o gambá *D. aurita* (1L). Apesar do encontro de *I. schulzei* em uma grande diversidade de hospedeiros, observamos uma baixa intensidade de carrapatos por indivíduo, já que na maioria dos animais, não encontramos mais do que 2 espécimes fixados, com exceção de dois *Akodon* sp., que apresentaram 4 e 5 carrapatos cada um.

Os hospedeiros usuais dos adultos do carrapato *Ixodes loricatus* pertencem a ordem Didelphimorphia, e seus estágios imaturos além destes marsupiais, são frequentemente encontrados em roedores cricetídeos. Os registros de parasitismo encontrados na literatura para o Brasil abrangem várias espécies de hospedeiros de pelo menos 7 gêneros de marsupiais e 5 de roedores (BARROS-BATTESTI et al., 2000; ARZUA; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2005; SARAIVA et al., 2012; SZABÓ et al., 2013; BLANCO et al., 2016; COELHO et al., 2016).

Na RFMG, *I. loricatus* foi a espécie mais abundante em parasitismo nos pequenos mamíferos coletados de 2013 a 2015, com um total de 93 (28%) carrapatos distribuídos em 7 espécies (2 marsupiais e 5 roedores), das quais 3 delas, para o nosso conhecimento, ainda não registrados na literatura: *Delomys c.f. sublineatus* (1L), *Necromys* sp. (1L) e *Thaptomys nigrita* (2M, 1F, 1L).

No gênero *Amblyomma*, *A. dubitatum* foi a única espécie encontrada nos pequenos mamíferos, parasitando 3 espécies de roedores, além de gambás. O hospedeiro primário para todos os estágios ativos são as capivaras, e normalmente a sua presença está relacionada diretamente às áreas de distribuição destes herbívoros. Todavia, várias espécies de mamíferos de médio e grande porte são também parasitadas por este carrapato, e roedores

cricetídeos e gambás geralmente albergam seus estágios imaturos (NAVA et al., 2010). Embora não tenhamos visualizado diretamente capivaras em nenhuma oportunidade na RFMG, vestígios indiretos como pegadas, fezes, rastros na vegetação de borda em cursos d'água e relatos de moradores locais, nos confirma que este animal se faz presente na região.

6.2 Carrapatos coletados do ambiente

Estudos anteriores conduzidos no bioma Mata Atlântica nos estados de São Paulo e Rio Grande do Sul, apontam as espécies *A. incisum*, *A. brasiliense* e *H. juxtakochi* como as mais abundantes na vegetação (SZABÓ et al., 2009, 2013; SABATINI et al., 2010; KRAWCZAK, 2016), corroborando os resultados apresentados no presente estudo. Além destas, os autores citam *A. aureolatum* como uma espécie comumente encontrada na Mata Atlântica de altitude, o que também pôde ser observado no presente estudo, onde 12 espécimes foram coletados na vegetação.

Outra espécie encontrada, *A. sculptum* foi representada por um total de 10 indivíduos em fase não parasitária. É um carrapato generalista normalmente ausente na Mata Atlântica e nas florestas tropicais úmidas, mas que pode se estabelecer em áreas degradadas e nos ambientes antropizados que tenham a ocorrência de seus hospedeiros preferenciais para os estágios adultos, como as capivaras e os cavalos. Nestas áreas, são encontrados principalmente em microclimas com condições de sombreamento e umidade adequados, como matas ciliares, pastos sujos ou formações de arbustos de pequeno porte, que impedem a dessecação dos carrapatos e de seus ovos (LABRUNA et al., 2001; SOUZA et al., 2006; SZABO et al., 2013).

Todavia, chama a atenção que entre os 10 exemplares de *A. sculptum* por nós coletados, 3 fêmeas não alimentadas foram encontradas em fissuras nas paredes externas de uma residência localizada a cerca de 500 metros do acesso à Represa da Graça, onde havia também a presença de *R. sanguineus* s.l. nas mesmas paredes, e 2 cães residentes.

A residência foi vistoriada pela oportunidade, já que se encontra muito próxima a uma das entradas da reserva. Os carrapatos encontravam-se em fissuras distintas localizadas em uma altura estimada entre 1 a 1,5 metro do

chão, e distantes entre si de 0,5 a 1 metro, onde os cães costumavam dormir, segundo os seus proprietários. A área ao redor da casa (um raio de aproximadamente 20 metros) não apresentava qualquer vegetação, e pouco sombreamento. Um dos cães encontrava-se parasitado por adultos de *A. sculptum* (1F e 3M), além de *R. sanguineus* e *A. aureolatum*. Este animal era um cão idoso e com motilidade reduzida e, segundo os proprietários, passava a maior parte do tempo ao redor da casa. Não havia a presença de animais domésticos em co-residência (por exemplo cavalos e porcos) com os cães, embora tenhamos presenciado o uso de cavalos como transporte nas estradas locais, em um bairro próximo.

Nas condições acima descritas, o achado simultâneo de carrapatos não alimentados e em parasitismo em cão residente neste local, sugerimos o comportamento nidícola de *A. sculptum* neste sítio de coleta.

Para o gênero *Ixodes*, destacamos os exemplares encontrados em vida livre de duas espécies, *I. aragaoi* (N=50) e *I. c.f. auritulus* (N=31).

Na primeira, foram coletados exclusivamente carrapatos adultos, enquanto que em *I. c.f. auritulus* houve predominância de exemplares em estágios imaturos. Notadamente, foram mais frequentes nos meses secos e/ou frios do ano, sobretudo entre Agosto e Outubro. Esta tendência se repetiu durante os anos de 2013, 2014 e 2015.

Houve um encontro de *I. aragaoi* no ambiente reportado por Sabatini et al. (2010) na Mata Atlântica em São Paulo, em um fragmento situado a 993 metros acima do nível do mar, altitude semelhante à encontrada na RFMG. Estes autores acharam um único exemplar desta espécie entre 2439 carrapatos capturados ao longo de um ano, em seis diferentes localidades e altitudes no Parque Estadual da Serra do Mar.

No presente estudo, nós relatamos o encontro de um total de 50 exemplares adultos de *I. aragaoi* coletados na vegetação, além dos já citados 90 espécimes imaturos sobre pequenos mamíferos. Foi a espécie mais abundante do gênero *Ixodes*.

A outra espécie é morfologicamente próxima a *I. auritulus*, que possui especificidade parasitária com aves Passeriformes do gênero *Turdus* e no Brasil, está restrita às regiões altas e frias (ARZUA; BARROS-BATTESTI, 1999).

Análises moleculares de um fragmento do gene 16S rDNA (~ 460pb) de carrapatos através do Blast com sequências disponíveis no Genbank, apontou homologia de 94% com *I. auritulus* (AF113928, AF549845, AF549873) oriundos da Austrália e Argentina (KLOMPEN, 2000; XU et al., 2003).

Outro marcador genético, o 12S (~ 360pb) rDNA, apresentou 94% de homologia com uma espécie denominada como *Ixodes* sp. genótipo I coletada em aves Passeriformes na Costa Rica (larvas, ninfas e adultos) (OGRZEWALSKA et al., 2015).

Foi testado também o uso de um terceiro marcador molecular, o nuclear ribossomal internal transcribed spacer 2 (ITS2) de carrapatos.

As sequências de ITS2 (~ 1300pb) foram desconsideradas, já que apresentaram valores baixos de cobertura do alinhamento (“query coverage”), que não chegaram a 20% com as sequências mais próximas através do Blast. Este é considerado um bom marcador de DNA para a distinção entre espécies de carrapatos, por apresentar grande variação intraespecífica (entre táxons próximos) e maior divergência interespecífica (LV et al., 2014). Porém, ainda conta com um pequeno número de sequências de carrapatos disponíveis para comparação nos bancos de dados, abrangendo um número limitado de táxons.

Se somados os exemplares coletados nos pequenos mamíferos e aqueles em vida livre na vegetação, temos um total de cinco espécies de *Ixodes* encontradas na RFMG. Isso demonstrou ser uma localidade com particular concentração de espécies deste gênero, o que para o nosso conhecimento, é inédito no Brasil.

6.3 Sorologia

Os resultados observados no presente estudo, para a pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em pequenos mamíferos silvestres da RFMG, estão de acordo aos demonstrados em estudos correlatos desenvolvidos em outras regiões do país. Especificamente nas amostras dos roedores, nós observamos 37% de positividade pela RIFI, enquanto que em outros estudos conduzidos também no bioma Mata Atlântica, estes valores variaram entre 33,5% a até 85% (PENA et al., 2009; DANTAS-TORRES et al., 2012; MILAGRES et al., 2013; KRAWCZAK, 2016). A grande amplitude nos

percentuais de roedores positivos nos estudos citados pode ter alguma relação com as diferentes metodologias de escolha das áreas amostradas, já que apesar de todas estarem situadas em domínios do bioma Mata Atlântica, notadamente estão inseridas em locais com diferentes graus de modificação ambiental, ou então envolveram também regiões com reconhecido histórico de casos humanos de Febre Maculosa Brasileira (FMB), aqui chamadas de áreas endêmicas. As modificações ambientais impactam fortemente toda a estrutura ecológica e a biodiversidade local, incluindo-se aí a dos pequenos mamíferos e, conseqüentemente, seus ectoparasitos. Como exemplo, os trabalhos conduzidos por Dantas-Torres et al. (2012) e Milagres et al. (2013), que encontraram 68,8 % e 63 %, respectivamente, de roedores soro reativos. Pena et al. (2009) observaram em uma área endêmica para FMB, 0 % de animais positivos em espécies consideradas silvestres (*Nectomys squamipes* e *Oryzomys subflavus*), enquanto que o roedor sinantrópico, *Rattus rattus*, alcançou expressivos 81,3%. Em comum, as diferentes localidades onde foram capturados os pequenos mamíferos nesses trabalhos supracitados incluem também regiões peri-urbanas e/ou rurais modificadas, e algumas áreas consideradas endêmicas (casos humanos de FMB). Em contrapartida, nos trabalhos conduzidos por Krawczak (2016) e Szabó et al. (2013) em fragmentos de Mata Atlântica em áreas de conservação permanente, mesmo incluindo localidades consideradas como áreas endêmicas, os percentuais não foram superiores a 40% de roedores positivos na RIFI.

Se compararmos os resultados encontrados no presente estudo com investigações semelhantes conduzidas em outros biomas brasileiros, como no caso do Cerrado, a diferença é também notável. Coelho et al. (2016) e Binder et al. (2017) observaram em roedores silvestres, nesse bioma, percentuais de infecção menores, de 13,8 e 6,8% respectivamente, de animais soro reativos para antígenos de *Rickettsia* spp. Em ambos os estudos, as espécies de roedores capturadas e desafiadas sorologicamente eram essencialmente silvestres, em áreas de importante diversidade de pequenos mamíferos do Cerrado.

Assim como nos roedores, grandes amplitudes são observadas nos resultados de sorologia dos diferentes estudos com marsupiais no Brasil. Os didelfídeos são considerados importantes na epidemiologia das riquetsioses,

agindo como animais sentinelas. Gambás do gênero *Didelphis* são apontados como bons hospedeiros amplificadores de riquetsias, incluindo *R. rickettsii*. Além disso, são animais frequentemente encontrados com altos índices de parasitismo por carrapatos em áreas de conhecida transmissão de FMB, incluindo imaturos de algumas espécies do gênero *Amblyomma*, sustentando suas populações na natureza (HORTA et al., 2009; LABRUNA, 2009).

No presente estudo, obtivemos 50% de marsupiais soro reativos, sendo oito dos nove animais positivos pertencentes à espécie *D. aurita*. Em diferentes trabalhos feitos no bioma Mata Atlântica utilizando esses animais como modelo, os valores encontrados variaram entre 26,8 a até 85% (HORTA et al., 2007; PENA et al., 2009; MILAGRES et al., 2010, 2013; DANTAS-TORRES et al., 2012; SZABÓ et al., 2013; KRAWCZAK, 2016; MELO et al., 2016). Em dois estudos conduzidos exclusivamente em áreas no bioma Cerrado, os marsupiais apresentaram títulos com valores entre 37,5% e 39,6% em localidades nos estados do Mato Grosso do Sul e Minas Gerais, respectivamente (COELHO et al., 2016; BINDER et al., 2017).

Estudos que objetivaram comparar a sorologia de pequenos mamíferos e cães domésticos em algumas áreas endêmicas e não endêmicas no Estado de São Paulo, não encontraram diferenças significativas de soro prevalência destes animais silvestres entre estas áreas, o que mantém ainda dúvidas sobre a dinâmica de circulação das cepas de *Rickettsia* patogênicas nas populações de pequenos mamíferos (OGRZEWSKA et al., 2012; MELO et al., 2016).

Em nosso estudo, cinco cães domésticos foram submetidos à sorologia, e todos foram negativos. Três destes animais foram capturados circulando em trilhas no interior da RFMG, provavelmente recém-abandonados no local por seus antigos tutores. Tal prática foi observada por nós e também relatada por moradores das imediações. Por esta razão, não é possível saber por quanto tempo estes cães estiveram expostos na mata, o que pode ter ocorrido por períodos curtos, de poucos dias ou semanas. Os outros cães eram residentes em uma localidade próxima a um dos acessos a RFMG e tinham acesso esporádico a mata, segundo relato dos seus proprietários.

Um único exemplar da lebre silvestre *Sylvilagus* sp. foi capturado e teve amostra de soro submetido a RIFI, apresentando títulos sorológicos de 1:64 para o antígeno de *R. rickettsii*. Embora nos Estados Unidos, lebres do gênero

Sylvilagus sejam incriminadas na manutenção de populações de carrapatos vetores e participem do ciclo epidemiológico de *R. rickettsii* (BURGDORFER et al., 1980), no Brasil, não se conhece nada sobre o papel deste mamífero na manutenção de riquetsias. Para o nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho que testou soro de *Sylvilagus* sp. para a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. no Brasil.

A correlação entre a distribuição dos valores de soro prevalência de riquetsias em pequenos mamíferos silvestres em áreas endêmicas e não endêmicas para FMB permanece pouco esclarecida. Todavia, presume-se que áreas que preservem maiores fragmentos de floresta nativa, suas características fitofisionômicas e biodiversidade, sejam menos susceptíveis a altas taxas de exposição às riquetsias entre os animais e os carrapatos (OGRZEWALSKA et al., 2011, 2012; SZABO et al., 2013).

6.4 Pesquisa de microrganismos em carrapatos

As sequências parciais geradas do gene *OmpA* de *Rickettsia* spp. obtidas de exemplares adultos de *I. aragaoi*, apresentaram similaridade com genótipos de riquetsias não descritas encontradas nos carrapatos *I. minor* e *I. boliviensis*, coletados de aves e cães, respectivamente, na Costa Rica (TROYO et al., 2014; OGRZEWALSKA et al., 2015). Tais riquetsias são geneticamente relacionadas com endosimbiontes do carrapato *I. scapularis* próximas ao grupo *R. monacensis* encontradas com altas prevalências em populações de *I. scapularis* nos Estados Unidos (BENSON et al., 2004; MORENO et al., 2006; STEINER et al., 2008). Riquetsias endosimbiontes, de forma geral, não são patogênicas, mas podem interferir na transmissão e replicação de espécies patogênicas entre os carrapatos (SOCOLOVSKI et al., 2009).

A partir de uma fêmea não alimentada de *A. sculptum*, sequências parciais geradas pela PCR do gene *ompA* de *Rickettsia* sp. foram similares à *R. parkeri* oriundas de carrapatos *A. triste* coletados no Pantanal do Mato Grosso e Delta do Rio Paraná na Argentina, ambos com isolados em células Vero (MONJE et al., 2014; MELO et al., 2015). Achados de cepas próximas a *R. parkeri* foram descritos nos últimos anos no Brasil, com o encontro em diferentes espécies de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma*

(LABRUNA et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2013; SZABO et al., 2013; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014). Tentamos o uso de outro marcador (a proteína externa de membrana *ompB*) de *Rickettsia* sp. para melhor caracterização molecular do achado no presente estudo, porém foi infrutífero. As sequências geradas apresentaram baixa qualidade, e não puderam ser comparadas. Assim, outras tentativas serão feitas futuramente.

Os protozoários do gênero *Hepatozoon* infectam uma grande variedade de vertebrados domésticos e silvestres, e sua transmissão se dá principalmente pela ingestão acidental de artrópodes hematófagos por seus hospedeiros (SMITH, 1996). Por acometerem cães domésticos, no Brasil, os estudos envolvem principalmente *H. canis* e a fauna de carrapatos associada aos cães (ANDRÉ et al., 2010; ALMEIDA et al., 2013; DEMONER et al., 2013; BRAGA et al., 2016; WOLF et al., 2016). Dois estudos recentes relataram o encontro de genótipos de *Hepatozoon* sp. em sangue e tecido de três roedores *Calomys callosus* no Pantanal Brasileiro (WOLF et al., 2016) e em uma ninfa de *A. fuscum* coletada sobre *A. montensis*, em uma área de Mata Atlântica no estado de Santa Catarina (BLANCO et al., 2016). Nosso encontro de *Hepatozoon* sp. em exemplares dos carrapatos *I.c.f fuscipes* e *I. schulzei* parasitando *A. montensis*, fornece novas informações sobre a circulação desses agentes em carrapatos de pequenos mamíferos, sendo o primeiro registro em espécies de *Ixodes* no Brasil.

Espécies de *Babesia* são frequentemente reportadas infectando cães domésticos e canídeos silvestres, no nosso país, e *B. canis vogeli* é predominantemente o agente causador da babesiose canina, doença de ampla distribuição e alta prevalência. O vetor conhecido no Brasil é o carrapato *R. sanguineus* s.l., espécie comum em áreas urbanas (SPOLIDORIO et al., 2011; ARAUJO et al., 2015; ROTONDANO et al., 2015). Nos ambientes naturais, pouco se conhece sobre a presença de *Babesia* sp. na fauna silvestre e nos carrapatos. Recentemente, genótipos de *Babesia* sp. de pequenos mamíferos foram descritos no Brasil, originários de um marsupial e três roedores coletados no bioma Pantanal, no estado do Mato Grosso. Foram nomeados como *Babesia* sp. *Monodelphis* e *Babesia* sp. *Thrichomys*, em alusão aos nomes dos hospedeiros onde foram encontrados (WOLF et al., 2016). No presente estudo,

três *pools* de carrapatos imaturos da espécie *A. incisum* foram positivos para *Babesia* sp., o que para o nosso conhecimento é o primeiro registro deste protozoário nesta espécie de carrapato.

Agente causal de uma enfermidade conhecida como febre Q, a bactéria intracelular obrigatória *Coxiella burnetti* infecta uma grande variedade de animais vertebrados, incluindo o homem (RAOULT; MARRIE; MEGE, 2005). Embora não se conheça o papel dos carrapatos na cadeia epidemiológica dessa doença, grande número de espécies foram relatadas infectadas, sugerindo uma possível via alternativa para a já conhecida transmissão via aerossóis e fluidos animais contaminados (PAROLA; RAOULT, 2001; DURON; JOURDAIN; MCCOY, 2014). No Brasil, estudos recentes apontam alta prevalência de diferentes genótipos de *Coxiella* endossimbiontes em algumas espécies de carrapatos, incluindo os gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Argasidae* do gênero *Ornithodoros* (ALMEIDA et al., 2012; MACHADO-FERREIRA et al., 2016). Estes últimos autores testaram pela técnica da PCR 15 diferentes espécies, e as 10 pertencentes ao gênero *Amblyomma*, amplificaram DNA de *Coxiella*. No presente estudo, apenas nas amostras de *A. dubitatum* não encontramos exemplares positivos. As demais (*A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. incisum*, *A. naponense* e *A. sculptum*) amplificaram produtos que, após sequenciados, foram similares à *Coxiella* endossimbionte de carrapatos.

Os resultados expostos no presente estudo, nos mostra que a Reserva Florestal do Morro Grande, apesar da intensa pressão antrópica, ainda preserva um importante patrimônio biológico para a nossa região.

7 CONCLUSÕES

1. A fauna de pequenos mamíferos (roedores e marsupiais) e de carrapatos em parasitismo nos hospedeiros e em vida livre, da RFMG, apresentou grande riqueza de espécies, apesar de ser um fragmento de Mata Atlântica próximo ao maior adensamento populacional do Hemisfério Sul.

2. A diversidade de espécies de *Ixodes* spp. em uma mesma localidade, como aquela amostrada no presente estudo, é a maior já encontrada para este gênero, no Brasil.
3. Novos registros de hospedeiros foram acrescentados para as espécies *I. aragaoi*, *I. loricatus*, *I. schulzei* e *I. cf. schulzei*.
4. Larvas, ninfas e fêmeas de *Ixodes auritulus* foram encontradas na vegetação pela primeira vez no Brasil.
5. Existe a presença de anticorpos para antígenos de *Rickettsia* spp. nos pequenos mamíferos da RFMG, sugerindo a circulação de cepas desses microrganismos entre os animais.
6. A quase totalidade de carrapatos adultos da espécie *I. aragaoi* e cinco diferentes espécies de *Amblyomma*, apresentaram respectivamente, infecção por riquetsias e *Coxiella* sp. endosimbiontes, comumente associadas a esses carrapatos.
7. Os protozoários *Hepatozoon* sp. e *Babesia* sp. foram encontrados em exemplares de *I. schulzei* e *I. cf. fuscipes*, e em *pools* de carrapatos imaturos de *Amblyomma incisum*, respectivamente, pela primeira vez no Brasil.

REFERÊNCIAS

- ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. S. *Borrelia*-like spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest reserve, Cotia County, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 95, 621–624, 2000.
- ALMEIDA, A. P.; MARCILI, A.; LEITE, R. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; DOMINGUES, L. N.; MARTINS, J. R.; LABRUNA, M. B. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 203–206, 2012.

ALMEIDA, A. P.; SOUZA, T. D.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* Agents Infecting the Crab-Eating Fox (*Cerdocyon thous*) in Southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 640–646, 2013.

ANDRÉ, M. R.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; VARGAS, G. H.; FALCADE, M.; SOUSA, L.; SALLES, A. R.; ALLEGRETTI, S. M.; FELIPPE, P. A. N.; MACHADO, R. Z. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. in Brazilian and exotic wild carnivores. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 1–2, p. 134–138, 2010.

ARAUJO, A. C.; SILVEIRA, J. A. G.; AZEVEDO, S. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; RIBEIRO, M. F. B.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. *Babesia canis vogeli* infection in dogs and ticks in the semiarid region of Pernambuco, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 5, p. 456–461, 2015.

ARZUA, M.; BARROS-BATTESTI, D. M. Parasitism of *Ixodes* (*Multidentatus*) *auritulus* Neumann (Acari: Ixodidae) on birds from the City of Curitiba, State of Paraná, Southern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 5, p. 597–603, 1999.

ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de Historia Natural Capao da Imbuia, Curitiba, Parana, Brazil. **Revista Brasileira De Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 623–632, 2005.

BARBIERI, A. R. M.; FILHO, J. M.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOUZA, J. C.; SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 848–853, out. 2014.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; PICHORIM, M.; KEIRANS, J. E. *Ixodes* (*Multidentatus*) *paranaensis* n. sp. (Acari: Ixodidae) a parasite of *Streptoprocne biscutata* (Sclater 1865) (Apodiformes: Apodidae) birds in Brazil.

Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 98, n. 1, p. 93–102, 2003.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B.; ARRUDA-SANTOS, A. D.; GIACOMIN, F. G. Description of the immature stages and redescription of the female of *Ixodes schulzei* Aragão & Fonseca, 1951 (Acari: Ixodidae), an endemic tick species of Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 68, n. 3, p. 157–166, 2007.

BARROS-BATTESTI, D. M.; YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L.; GOMES A. C. Parasitism by *Ixodes didelphidis* and *I. loricatus* (Acari: Ixodidae) on small wild mammals from an Atlantic Forest in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 6, p. 820–827, 2000.

BASILE, R. C.; YOSHINARI, N. H.; MANTOVANI, E.; BONOLDI, V. N.; MACORIS, D. da G.; QUEIROZ-NETO, A. Brazilian borreliosis with special emphasis on humans and horses. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 8, p. 167–172, 2016.

BENSON, M. J.; GAWRONSKI, J. D.; EVELEIGH, D. E.; BENSON, D. R. Intracellular Symbionts and Other Bacteria Associated with Deer Ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 70, n. 1, p. 616–620, 2004.

BINDER, L. C.; KRAWCZAK, F. S.; SPONCHIADO, J.; MELO, G. L.; MORAES-FILHO, J.; BASTOS, F. A. N.; CÁCERES, N. C.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in small mammals from Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Ciência Rural**, v. 47, n. 1, p. 1–5, 2017.

BLANCO, C. M.; TEIXEIRA, B. R.; SILVA, A. G.; OLIVEIRA, R. C.; STRECHT, L.; OGRZEWSKA, M.; DE LEMOS, E. R. S. Microorganisms in ticks (Acari: Ixodidae) collected on marsupials and rodents from Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 90–98, 2016.

BONOLDI, V. L. **Estudo laboratorial de agentes infecciosos transmitidos por carrapatos em pacientes com Doença de Lyme-simile (Síndrome Baggio-Yoshinari)**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 114 p, 2010.

BRAGA, Í. A.; RAMOS, D. G. S.; MARCILI, A.; MELO, A. L. T.; TAQUES, I. I. G. G.; AMUDE, A. M.; CHITARRA, C. S.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; PACHECO, R. C.; AGUIAR, D. M. Molecular detection of tick-borne protozoan parasites in a population of domestic cats in midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 1004–1009, 2016.

BURGDORFER, W.; COONEY, J. C.; MAVROS, A. J.; JELLISON, W. L.; MASER, C. The role of cottontail rabbits (*Sylvilagus* spp.) in the ecology of *Rickettsia rickettsii* in the United States. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 29, n. 4, p. 686–90, jul. 1980.

CALIC, S. B.; GALVÃO, M. A. M.; BACELLAR, F.; ROCHA, C. M. B. M.; MAFRA, C. L.; LEITE, R. C.; WALKER, D. H. Human ehrlichioses in Brazil: first suspect cases. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 259–62, 2004.

COELHO, M. G.; RAMOS, V. N.; LIMONGI, J. E.; LEMOS, E. R. S.; GUTERRES, A.; COSTA NETO, S. F.; ROZENTAL, T.; BONVICINO, C. R.; D'ANDREA, P. S.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 3, p. 275–282, 2016.

COLOMBO, A.; JOLY, C. Brazilian Atlantic Forest lato sensu: the most ancient Brazilian forest, and a biodiversity hotspot, is highly threatened by climate change. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 3, p. 697–708, 2010

DAGNONE, A. S.; DE MORAIS, H. S. A.; VIDOTTO, M. C.; JOJIMA, F. S.;

VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in anemic, thrombocytopenic, or tick-infested dogs from a hospital population in South Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 117, n. 4, p. 285–290, nov. 2003.

DANTAS-TORRES, F.; ALÉSSIO, F. M.; SIQUEIRA, D. B.; MAUFFREY, J.-F.; MARVULO, M. F. V.; MARTINS, T. F.; MORAES-FILHO, J.; CAMARGO, M. C. G. O.; D'AURIA, S. R. N.; LABRUNA, M. B.; SILVA, J. C. R. Exposure of small mammals to ticks and rickettsiae in Atlantic Forest patches in the metropolitan area of Recife, North-eastern Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 83–91, 2012.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 1, n. 1, p. 25, 2008.

DEMONER, L. C.; RUBINI, A. S.; PADUAN, K. S.; METZGER, B.; ANTUNES, J. M. A. P.; MARTINS, T. F.; MATHIAS, M. I. C.; O'DWYER, L. H. Investigation of tick vectors of *Hepatozoon canis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 6, p. 542–546, 2013.

DONAHOE, S. L.; PEACOCK, C. S.; CHOO, A. Y. L.; COOK, R. W.; O'DONOGHUE, P.; CRAMERI, S.; VOGELNEST, L.; GORDON, A. N.; SCOTT, J. L.; ROSE, K. A retrospective study of *Babesia macropus* associated with morbidity and mortality in eastern grey kangaroos (*Macropus giganteus*) and agile wallabies (*Macropus agilis*). **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 4, n. 2, p. 268–276, 2015.

DUMLER, J.S.; BARBET, A.F.; BEKKER, C.P.; DASCH, G.A.; PALMER, G.H.; RAY, S.C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p.2145–2165, 2001.

DURON, O.; JOURDAIN, E.; MCCOY, K. D. Diversity and global distribution of

the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 557–563, 2014.

DURON, O.; NOËL, V.; MCCOY, K. D.; BONAZZI, M.; SIDI-BOUMEDINE, K.; MOREL, O.; VAVRE, F.; ZENNER, L.; JOURDAIN, E.; DURAND, P.; ARNATHAU, C.; RENAUD, F.; TRAPE, J.-F.; BIGUEZOTON, A. S.; CREMASCHI, J.; DIETRICH, M.; LÉGER, E.; APPELGREN, A.; DUPRAZ, M.; GÓMEZ-DÍAZ, E.; DIATTA, G.; DAYO, G.-K.; ADAKAL, H.; ZOUNGRANA, S.; VIAL, L.; CHEVILLON, C. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 5, p. e1004892, 2015.

GAZETA, G. S.; CARVALHO, R. W.; AVELAR, R. F.; AMORIM, M.; ABOUD-DUTRA, A. E. Ocorrência de *Babesia* sp. em pequenos roedores no Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 56, n. 6, p. 741–744, 2004.

GOTTLIEB, J.; ANDRÉ, M. R.; SOARES, J. F.; GONÇALVES, L. R.; TONIAL DE OLIVEIRA, M.; COSTA, M. M.; LABRUNA, M. B.; BORTOLINI, C. E.; MACHADO, R. Z.; VIEIRA, M. I. B. *Rangelia vitalii*, *Babesia* spp. and *Ehrlichia* spp. in dogs in Passo Fundo, state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 2, p. 172–178, 2016.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PENÑA, A.; HORAK, I. G. **The hard ticks of the world**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Rodents of the subfamily Sigmodontinae (Myomorpha: Cricetidae) as hosts for South American hard ticks (Acari: Ixodidae) with hypotheses on life history. **Zootaxa**, v. 65, n. 2904, p. 45–65, 2011.

HADDAD, N. M.; BRUDVIG, L. a.; CLOBERT, J.; DAVIES, K. F.; GONZALEZ, A.; HOLT, R. D.; LOVEJOY, T. E.; SEXTON, J. O.; AUSTIN, M. P.; COLLINS,

C. D.; COOK, W. M.; DAMSCHEN, E. I.; EWERS, R. M.; FOSTER, B. L.; JENKINS, C. N.; KING, A. J.; LAURANCE, W. F.; LEVEY, D. J.; MARGULES, C. R.; MELBOURNE, B. A.; NICHOLLS, A. O.; ORROCK, J. L.; SONG, D.-X.; TOWNSHEND, J. R. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. **Science Advances**, v. 1, n. 2, p. 1–9, 2015.

HAN, B. A.; SCHMIDT, J. P.; BOWDEN, S. E.; DRAKE, J. M. Rodent reservoirs of future zoonotic diseases. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 22, p. 7039–7044, 2015.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M.B.; SANGIONI, L. A. , VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever – endemic area in the state of São Paulo, Brasil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 93-97, 2004.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 793–801, 2007.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 109–118, 2009.

HORTA, M. C.; SABATINI, G. S.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWSKA, M.; CANAL, R. B.; PACHECO, R. C.; MARTINS, T. F.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 10, n.

10, p. 959–967, 2010.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Manual Técnico da Vegetação Brasileira. 2ª edição revista e ampliada. Sistema Fitogeográfico. Inventário das Formações Florestais e Campestres. Técnicas e Manejo de Coleções Botânicas. Procedimentos para Mapeamentos.**p. 1-271, 2012.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3–14, 2004.

KLOMPEN, J. Systematics and Biogeography of Hard Ticks, a Total Evidence Approach. **Cladistics**, v. 16, n. 1, p. 70–102, 2000.

KRAWCZAK, Felipe da Silva. **Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em área endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no estado do Rio Grande do Sul.** 2016. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

KRAWCZAK, F. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; NUNES, F. P.; SOARES, J. F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 7, 2014.

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

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; CAMARGO, L. M. A.; AGUIAR, D. M.; YABSLEY, M. J.; DAVIDSON, W. R.; STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; STICH, R. W.; LONG, S. W.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. A preliminary investigation of *Ehrlichia* species in ticks, humans, dogs, and capybaras from Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 189–195,

2007.

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; DE WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1–14, 2001.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90–98, 2004.

LIU, H.; LI, Q.; ZHANG, X.; LI, Z.; WANG, Z.; SONG, M.; WEI, F.; WANG, S.; LIU, Q. Characterization of rickettsiae in ticks in northeastern China. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 498, 2016.

LV, J.; WU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; FENG, C.; YUAN, X.; JIA, G.; DENG, J.; WANG, C.; WANG, Q.; MEI, L.; LIN, X. Assessment of four DNA fragments (COI , 16S rDNA , ITS2 , 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari : Ixodida). p. 1–11, 2014.

MACHADO-FERREIRA, E.; VIZZONI, V. F.; BALSEMÃO-PIRES, E.; MOERBECK, L.; GAZETA, G. S.; PIESMAN, J.; VOLOCH, C. M.; SOARES, C. A. G. *Coxiella* symbionts are widespread into hard ticks. **Parasitology Research**, v. 115, n. 12, p. 4691–4699, 2016.

MACHADO, R. Z.; DUARTE, J. M. B.; DAGNONE, A. S.; SZABÓ, M. P. J. Detection of *Ehrlichia chaffeensis* in Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Veterinary Parasitology**, v. 139, n. 1–3, p. 262–266, 2006.

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

scanning electron microscopy. **Systematic Parasitology**, v. 59, n. 2, p. 135–146, 2004.

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

MARTINS, T. F.; PERES, M. G.; COSTA, F. B.; BACCHIEGA, T. S.; APPOLINARIO, C. M.; MEGID, J.; LABRUNA, M. B. Ticks infesting wild small rodents in three areas of the state of São Paulo, Brazil. **Ciência Rural**, v. 46, n. 5, p. 871–875, 2016.

MELO, A. L. T.; AGUIAR, D. M. de; SPOLIDORIO, M. G.; YOSHINARI, N. H.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C. Serological evidence of exposure to tick-borne agents in opossums (*Didelphis* spp.) in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 3, p. 348–352, 2016.

MELO, A. L. T.; ALVES, A. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARTINS, T. F.; WITTER, R.; PACHECO, T. A.; SOARES, H. S.; MARCILI, A.; CHITARRA, C. S.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. *Rickettsia parkeri* infecting free-living *Amblyomma triste* ticks in the Brazilian Pantanal. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 237–241, 2015.

MERINO, S.; VÁSQUEZ, R. A.; MARTÍNEZ, J.; CELIS-DIEZ, J. L.; GUTIÉRREZ-JIMÉNEZ, L.; IPPI, S.; SÁNCHEZ-MONSALVEZ, I.; MARTÍNEZ-DE LA PUENTE, J. Molecular characterization of an ancient *Hepatozoon* species parasitizing the “living fossil” marsupial “Monito del Monte” *Dromiciops gliroides* from Chile. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 98, n. 3, p. 568–576, 2009.

METZGER, J. P.; ALVES, L. F.; GOULART, W.; TEIXEIRA, A. M. D. G.;

SIMÕES, S. J. C.; CATHARINO, E. L. M. Uma área de relevante interesse biológico, porém pouco conhecida: a Reserva Florestal do Morro Grande. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, p. 1-33, 2006.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; BARCELOS, R. M.; GOMES, G. G.; MONTANDON, C. E.; PENA, D. C. H.; NIERI BASTOS, F. A.; SILVEIRA, I.; PACHECO, R.; LABRUNA, M. B.; BOUYER, D. H.; FREITAS, R. N.; WALKER, D. H.; MAFRA, C. L.; GALVAO, M. A. M. *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern Region of Minas Gerais, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1305–1307, 2010.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; MONTANDON, C. E.; FREITAS, R. N.; PACHECO, R.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M. Spotted fever group *Rickettsia* in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern Region of Minas Gerais State, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 937–939, 2013.

MONJE, L. D.; NAVA, S.; ANTONIAZZI, L. R.; COLOMBO, V. C.; BELDOMENICO, P. M. In vitro isolation and infection intensity of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* ticks from the Paraná River Delta region, Argentina. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 924–927, 2014.

MOREIRA, J. R.; FERRAZ, K. M.; HERRERA, E. A.; MACDONALD, D. W. **Capybara**. New York, NY: Springer New York, 2013.

MORENO, C. X.; MOY, F.; DANIELS, T. J.; GODFREY, H. P.; CABELLO, F. C. Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. **Environmental Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 761–772, 2006.

NAVA, S.; BARBIERI, A. M.; MAYA, L.; COLINA, R.; MANGOLD, A. J.;

LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. *Borrelia* infection in *Ixodes pararicinus* ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. **Acta Tropica**, v. 139, p. 1–4, 2014.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; MASTROPAOLO, M.; GONZÁLEZ, E. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 51, n. 4, p. 335–351, 2010.

NEGRÃO, M. D. F. F.; VALLADARES-PÁDUA, C. Registros de mamíferos de maior porte na Reserva Florestal do Morro Grande, São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, p. 0–0, 2006.

OGRZEWALSKA, M.; PINTER, A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 1, 2016.

OGRZEWALSKA, M.; LITERÁK, I.; CAPEK, M.; SYCHRA, O.; CALDERÓN, V. Á.; RODRÍGUEZ, B. C.; PRUDENCIO, C.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B. Bacteria of the genus *Rickettsia* in ticks (Acari: Ixodidae) collected from birds in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 4, p. 478–482, 2015.

OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T.; CAPEK, M.; LITERAK, I.; LABRUNA, M. B. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1–2, p. 145–147, 2013.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D. G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; COSTA, F. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1283–1300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; JENKINS, C. N.; LABRUNA, M. B. Effect of forest fragmentation on tick infestations of birds and tick infection rates by

Rickettsia in the Atlantic Forest of Brazil. **EcoHealth**, v. 8, n. 3, p. 320–331, 2011.

OLIVER, J. H. Biology and Systematics of Ticks (Acari:Ixodida). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 397–430, 1989.

OLIVEIRA, A.; FONSECA, A. H.; ISHIKAWA, M. M.; YOSHINARI, N. H. Cinética do crescimento de *Borrelia burgdorferi* (Spirochaetaceae) em diferentes meios de cultivo. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 24, v. 2, p. 61-64, 2004.

ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H. Diagnoses of and illustrated key to the species of *Ixodes* Latreille, 1795 (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Systematic Parasitology**, v. 72, n. 2, p. 143–157, 2009.

ONOFRIO, V. C.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. M. Description of immature stages and redescription of adults of *Ixodes luciae* Senevet (Acari:Ixodidae). **Zootaxa**, n. 2495, p. 53–64, 2010.

ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SAMPAIO, J. dos S.; SOARES, J. F.; SILVA, M. J. de J.; BARROS-BATTESTI, D. M. Noteworthy records of *Ixodes schulzei* (Acari: Ixodidae) on rodents from the State of Parana, southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 159–161, 2013.

ONOFRIO, V. C.; RAMIREZ, D. G.; GIOVANNI, D. N. S.; MARCILI, A.; MANGOLD, A. J.; VENZAL, J. M.; MENDONÇA, R. Z.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. Validation of the taxon *Ixodes aragaoi* Fonseca (Acari: Ixodidae) based on morphological and molecular data. **Zootaxa**, n. 4, p. 361–370, 2014.

PARDINI, R.; UMETSU, F. Pequenos mamíferos não-voadores da Reserva Florestal do Morro Grande: distribuição das espécies e da diversidade em uma área de Mata Atlântica. **Biota Neotropica**, v. 6, n. 2, p. 1–5, 2006.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897–928, 2001.

PAROLA, P.; ROVERY, C.; ROLAIN, J. M.; BROUQUI, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in Tick - borne Rickettsioses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 7, p. 1105–1108, 2009.

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

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

PORTILLO, A.; SANTIBÁÑEZ, S.; GARCÍA-ÁLVAREZ, L.; PALOMAR, A. M.; OTEO, J. A. Rickettsioses in Europe. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 11–12, p. 834–838, 2015.

RAOULT, D.; MARRIE, T.; MEGE, J. Natural history and pathophysiology of Q fever. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 4, p. 219–226, 2005.

RAOULT, D.; BROUQUI, P. **Rickettsiae and rickettsial diseases at the turn of the Third Millenium**. Paris, Elsevier, 1999.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141–1153, jun. 2009.

ROTONDANO, T. E. de F.; ALMEIDA, H. K. A.; KRAWCZAK, F. S.; SANTANA, V. L.; VIDAL, I. F.; LABRUNDA, M. B.; DE AZEVEDO, S. S.; AMEIDA, A. M. P.;

DE MELO, M. A. Survey of *Ehrlichia canis*, *Babesia* spp. and *Hepatozoon* spp. in dogs from a semiarid region of Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 52–58, 2015.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of Sao Paulo, Brazil. **J Med Entomol**, v. 47, n. 5, p. 913–916, 2010.

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

SARAIVA, D. G.; FOURNIER, G. F. S. R.; MARTINS, T. F.; LEAL, K. P. G.; VIEIRA, F. N.; CÂMARA, E. M. V. C.; COSTA, C. G.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; GUGLIELMONE, A. A.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 2, p. 159–166, 2012.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. de C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111–1113, 2007.

SMITH, T. G. The Genus *Hepatozoon* (Apicomplexa : Adeleina). **The Journal of Parasitology**, v. 82, n. 4, p. 565–585, 1996.

SOCOLOVSCHI, C.; MEDIANNIKOV, O.; RAOULT, D.; PAROLA, P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and Ixodid ticks. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, p. 34, 2009.

SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; NETO, E. J. R.; PRADO, A. P. Dinâmica

sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887-891, 2006.

SPOLIDORIO, M. G.; TORRES, M. D. M.; CAMPOS, W. N. D. S.; MELO, A. L. T.; IGARASHI, M.; AMUDE, A. M.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Molecular detection of *Hepatozoon canis* and *Babesia canis vogeli* in domestic dogs from Cuiabá, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 3, p. 253–255, 2011.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521–523, 2010.

STEINER, F. E.; PINGER, R. R.; VANN, C. N.; GRINDLE, N.; CIVITELLO, D.; CLAY, K.; FUQUA, C. Infection and Co-infection Rates of *Anaplasma phagocytophilum* Variants, *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi*, and the Rickettsial Endosymbiont in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) from Sites in Indiana, Maine, Pennsylvania, and Wisconsin. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 2, p. 289–297, 2008.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PACHECO, R. C.; CASTRO, M. B.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 103, n. 1, p. 57–72, 2009.

SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. a; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 719–28, 2013.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 27, 2013.

TERASSINI, F. A.; BARBIERI, F. S.; ALBUQUERQUE, S.; SZABÓ, M. P. J.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Comparison of two methods for collecting free-living ticks in the Amazonian forest. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 4, p. 194–196, 2010.

TROYO, A.; MOREIRA-SOTO, A.; CARRANZA, M.; CALDERÓN-ARGUEDAS, O.; HUN, L.; TAYLOR, L. Detection of an undescribed *Rickettsia* sp. in *Ixodes boliviensis* from Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 883–886, 2014.

VIEIRA, R. F. C.; BIONDO, A. W.; GUIMARÃES, A. M. S.; SANTOS, A. P.; SANTOS, R. P.; DUTRA, L. H.; DINIZ, P. P. V. P.; MORAIS, H. A.; MESSICK, J. B.; LABRUNA, M. B.; VIDOTTO, O. Ehrlichiosis in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 01–12, 2011.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J. c.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 449–456, 2016.

XU, G.; FANG, Q. Q.; KEIRANS, J. E.; DURDEN, L. A. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. **The Journal of parasitology**, v. 89, n. 3, p. 452–457, 2003.

YOSHINARI, N. H.; BARROS, P. J. L.; BONOLDI, V. L. N. Perfil da Borreliose de Lyme no Brasil. **Revista Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, n. 52, p. 111-117, 1997.

YOSHINARI, N. H.; BONOLDI, V. L. N.; BARROS-BATTESTI, D. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Doença de Lyme-Símile. **Revista Brasileira de Reumatologia**, n. 39, v. 2, p. 57-58, 1999.