Guilherme Sakae Sabatini

**Pesquisa de Carrapatos e Riquétsias no Parque Estadual da Serra do Mar,
Núcleo Itutinga – Pillões, São Paulo**

São Paulo

2010

Guilherme Sakae Sabatini

**Pesquisa de Carrapatos e Riquétsias no Parque Estadual da Serra do Mar,
Núcleo Itutinga – Pillões, São Paulo**

Dissertação 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 Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2009

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a 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.2246
FMVZ

Sabatini, Guilherme Sakae

Pesquisa de Carrapatos e Riquétsias no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga – Pillões, São Paulo / Guilherme Sakae Sabatini. -- 2010.
56 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2010.

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

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Amblyomma incisum*. 2. *Amblyomma ovale*. 3. *Rickettsia parkeri*. 4. Parque Estadual da Serra do Mar. 5. Floresta Pluvial Atlântica. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa de carrapatos e *Rickettsia spp* no Parque Estadual da Serra do Mar - núcleo de Cubatão, São Paulo", protocolado sob o nº1257/2007, utilizando 24 (vinte e quatro) coelhos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado "ad referendum".

We certify that the Research "Searching for ticks and *Rickettsia spp* in Park Estadual da Serra do mar - nucleo of Cubatão, São Paulo", protocol number 1257/2008, utilizing 24 (twenty four) rabbits, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved "ad referendum", meeting.

São Paulo, 20 de março de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Sabatini, Guilherme Sakae

Título: Pesquisa de Carrapatos e Riquetsias no Parque Estadual da Serra do Mar,
Núcleo Itutinga – Pillões, São Paulo

Dissertação 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 Mestre em
Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico a meus pais Tarcísio e Jocelim, as minhas avós Euclidia (Quida) e Ildegarda (Dega) a meus irmãos Rafa e Kike e as cunhadas Tati e Karen pelo apoio e compreensão por não estar presente em momentos importantes

Ao grande primo e amigo Gustavo que me conhece desde criança, a Luciana e seus filhos

A minha esposa pelo companheirismo ajuda e compreensão nos momentos difíceis enfrentados

Ao meu sogro Ricardo e minha “querida” sogra Elizete e ao cunhado Filipe e cunhada Roberta

Aos meus amigos que sempre estiveram do meu lado nos momentos alegres e tristes bons e ruins que aconteceram ao longo de minha vida

AGRADECIMENTOS

Ao prof. e amigo Marcelo Bahia Labruna pela confiança e compreensão ao longo desses 3 anos

Ao amigo e companheiro de coletas Adriano Pinter. As suas ajudas mesmo depois do experimento.

Aos amigos de laboratório Jonas, Fernanda, Maria, Mariana, Aline, João Fabio, aos que não estão mais aqui Richard, Tais e Mauricio e aos que também foram amigos um dia Thiago

Aos prof. Fernando, Leonardo e Paulo pelas divertidas conversas nos corredores e copa do VPS, a Hilda que todos acham que é brava, é mentira somente uma pessoa dedicada, responsável, rígida e sempre que solicitada prestativa

Aos amigos Pedrinho, Renatinho, Bispo, Fininho, Washington e Danival e as amigas Carol, Sandrinha e a uma das mulheres mais viciadas em coca - cola que já conheci Rosana

Aos companheiros de república e amigos Alexandre Alemão e Ricardo Truta, André Bahia, Bertão, Marcelo Porção, Caca, Andre e Torto

Agradeço a SUCEN, pelo fornecimento de carros e motoristas, principalmente ao EDMAR, que não se encontra nem no céu e nem na terra.

Aos funcionários do PESM, principalmente aos Guardas-Parque. Ao Diniz, amigo e companheiro de coleta.

RESUMO

SABATINI G. S. **Pesquisa de Carrapatos e Riquétsias no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga – Pillões, São Paulo.** [Research on ticks and *Rickettsias* in the Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga – Pillões, São Paulo]. 2010. 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

As riquétsias são pesquisadas por muitos grupos em diversas regiões do mundo, pois podem infectar os humanos e animais. No período de julho de 2008 a junho de 2009 no Núcleo Itutinga – Pilões, localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, foram realizadas coletas mensais de carrapatos (455 adultos, 1939 ninfas e 46 bolos de larvas) distribuídas por seis trilhas distintas. No presente estudo constatou-se a existência de cerca de treze espécies de carrapatos no local (*A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. fuscum*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. ovale*, *Ixodes aragaoi*, *Ixodes loricatus*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Rhipicephalus sanguineus*) As espécies de maior expressão foram: *A. incisum*, frequentemente presente em antas, seguido por *H. juxtakochi* e *A. ovale*. Encontramos *R. parkeri*, *R. bellii* e *R. amblyommii*. Em *A. ovale* infectados com a *R. parkeri*, tivemos uma prevalência de 11,7% para o ambiente e 15,3% para os carrapatos coletados em hospedeiros cães. O *R. sanguineus* que se coalimentou com *A. ovale* em cães também estava infectado com *R. parkeri*. Podemos concluir que indivíduos que freqüentem a região onde encontramos o *A. ovale* infectado pode adquirir bactérias do Grupo Febre Maculosa.

Palavras-chave: *Amblyomma incisum*, *Amblyomma ovale*, *Rickettsia parkeri*, Parque Estadual da Serra do Mar, Floresta Pluvial Atlântica.

ABSTRACT

SABATINI G. S. **Research on ticks and *Rickettsias* in the Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga – Pillões, São Paulo.** [Pesquisa de Carrapatos e Riquétsias no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga – Pillões, São Paulo]. 2010 56 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

Rickettsia has been receiving attention from several researcher groups around the world, once these bacteria can infect animals and human being. In this study, monthly, during the period of July, 2008 and June, 2009, was carried out at Núcleo Itutinga – Pillões, localized in the Parque Estadual da Serra do Mar, a field research when ticks were collected from vegetation in six specific trails into the forest, overall were collected 455 adults, 1,939 nymphs and 46 larval agglomerates ticks. This study found out 13 different tick species (*A. aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. fuscum*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. ovale*, *Ixodes aragaoi*, *Ixodes loricatus*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Rhipicephalus sanguineus*). The majority found species were: *A. incisum*, *H. juxtakochi* and *A. ovale*. Three *Rickettsia* species were found naturally infecting ticks in the park: *R. parkeri*, *R. bellii* e *R. amblyommii*. *A. ovale* ticks showed a *R. parkeri* infection prevalence of 11.7% for free-living ticks and 15.3% for ticks collected upon dogs. Ticks *R. sanguineus* collected feeding upon the same dogs as *A. ovale* were also found infected with *R. parkeri*. Since *A. ovale* ticks can attach onto human being, we predict that visitors of this park might be exposed to Spotted Fever Group *Rickettsia* infected ticks.

Keyword: *Amblyomma incisum*, *Amblyomma ovale*, *Rickettsia parkeri*, Parque Estadual da Serra do Mar, Atlantic Rain Forest

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Trilhas utilizadas para coleta dos carrapatos no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga-Pilões, Cubatão, Brasil, 2008-2009.....	25
Tabela 2 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 1 (P1) do Parque Estadual da Serra do Mar Estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009.....	35
Tabela 3 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 2 (P2) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009.....	36
Tabela 4 - Número total de carrapatos coletados na vegetação na trilha 3 (P3) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009.....	37
Tabela 5 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 4 (P4) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009.....	38
Tabela 6 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 5 (P5) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009.....	39
Tabela 7 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 6 (P6) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009.....	40
Tabela 8 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais nas seis trilhas do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009.....	41
Tabela 9 - Infecção por <i>Rickettsia</i> em carrapatos adultos coletados da vegetação e de cães nas seis trilhas do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo, Brasil, 2008-2009.....	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Núcleos de administração do PESH.....	17
Figura 2 - Índice pluviométrico do Parque Estadual da Serra do Mar, em toda a sua extensão. Fonte: Projeto “Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar”, adaptado.....	23
Figura 3 - Mapa com a porção sudeste do Estado de São Paulo, mostrando áreas de remanescentes florestais (verde) e os limites do Parque Estadual da Serra do Mar (lilás), o retângulo preto marca a área contemplada neste estudo.....	24
Figura 4 - Distribuição dos pontos de coleta de carrapatos (P1 a P6) dentro da área do Parque Estadual da Serra do Mar contemplada neste estudo.....	27
Figura 5 - Distribuição dos pontos de coleta de carrapatos (P1 a P6) e as diferentes fisionomias vegetais que compõe a área deste estudo.....	27

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Primers utilizados no trabalho.....	33
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

PESM	Parque estadual da Serra do Mar
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Polimerase Chain Reaction
MEM	Minimum Essential Medium
SPG	Sucrose-Fosfato-Glutamato
<i>A. ovale</i>	<i>Amblyomma ovale</i>
<i>A. fuscum</i>	<i>Amblyomma fuscum</i>
<i>A. cajennense</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>
<i>A. incisum</i>	<i>Amblyomma incisum</i>
<i>A. nodosum</i>	<i>Amblyomma nodosum</i>
<i>A. naponense</i>	<i>Amblyomma naponense</i>
<i>A. longirostre</i>	<i>Amblyomma longirostre</i>
<i>A. aureolatum</i>	<i>Amblyomma aureolatum</i>
<i>A. brasiliense</i>	<i>Amblyomma brasiliense</i>
<i>A. dubitatum</i>	<i>Amblyomma dubitatum</i>
<i>I. aragaoi</i>	<i>Ixodes aragaoi</i>
<i>I. loricatus</i>	<i>Ixodes loricatus</i>
<i>R. sanguineus</i>	<i>Rhipcephalus sanguineus</i>
<i>H. juxtakochi</i>	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>
<i>R. bellii</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
<i>R. amblyommii</i>	<i>Rickettsia amblyommii</i>
<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>
SP	São Paulo
FM	Febre Maculosa
FMB	Febre Maculosa Brasileira
SBC	São Bernardo do Campo
mm	Milímetros

LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Graus Celcius
km ²	Quilômetros quadrados
%	Porcentagem
cm ²	Centímetros quadrados

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAISE MÉTODOS	22
3.1 ÁREA DE ESTUDO - LOCAL DA COLETA DE CARRAPATOS	22
3.2 COLETAS DE CARRAPATOS	27
3.3 IDENTIFICAÇÃO DE CARRAPATOS	29
3.4. PESQUISA DE INFECÇÃO POR <i>RICKETTSIA</i> SPP	30
3.4.1 TESTE DE HEMOLINFA	30
3.4.2 ISOLAMENTO E DETECÇÃO DE RIQUETSIAS DE CARRAPATOS	30
3.4.3 MANUTENÇÃO EM LABORATÓRIO E CARACTERIZAÇÃO	31
3.4.4 MOLECULAR DO ISOLADO DE <i>RICKETTSIA</i>	32
4 RESULTADOS	34
5 DISCUSSÃO	43
6 CONCLUSÃO	48
7 REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

No mundo existem cerca de 870 espécies de carrapatos descritos (BARROS-BATTESTI et al., 2006), apenas 10% tem importância em Saúde Pública, devido às possibilidades de parasitarem humanos (OLIVER, Jr. J. H, 1989).

Na região do neotrópico, temos 188 espécies descritas, das quais 57 são do gênero *Amblyomma* Kock 1844, diversas espécies desse gênero são reconhecidas como vetores de patógenos que tanto acometem os humanos como aos animais de produção (GUGLIELMONE et al., 2003, 2006).

A fauna brasileira de Ixodídeos está atualmente representada por 61 espécies de carrapatos, sendo a maioria do gênero *Amblyomma* (BARROS-BATTESTI et al., 2006). A espécie *Amblyomma cajennense*, carrapato nativo da América do Sul, é o de maior importância em diversos países do Cone Sul (SZABÓ, 2009a). No estado de São Paulo (SP) destacamos o *Amblyomma cajennense* (GUEDES et al., 2005) e *A. aureolatum* (PINTER; LABRUNA, 2006) como vetores da Febre Maculosa Brasileira. Mais outros carrapatos do gênero *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* também podem transmitir riquetsias do grupo da Febre Maculosa (FM).

Os carrapatos podem transmitir uma variedade muito maior de microorganismos patogênicos (protozoários, riquetsias, espiroquetas, vírus e helmintos) do que qualquer outro grupo de vetores artrópodes. Por isso, pode ser considerado um dos grupos mais importantes de vetores para doenças infecciosas emergentes e reemergentes em humanos, animais domésticos e selvagens. (JONGEAN; UILENBERG, 2004). Hoje eles constituem o segundo grupo em importância como vetores de doenças infecciosas e a sua importância, no entanto, atribuída a essas doenças e, por conseguinte, aos carrapatos, foi sempre muito limitada (SILVA, 2004).

Alguns carrapatos têm importância para a Saúde Pública e Veterinária por causarem danos diretos durante sua alimentação e por transmitirem agentes infecciosos aos homens e animais tanto domésticos como selvagens (SILVA, 2004).

No Brasil, a importância das doenças humanas transmitidas por carrapatos, e mesmo a existência de algumas delas ainda está por ser adequadamente dimensionada. Ainda que a importância do carrapato na Medicina Veterinária tenha

recebido bastante atenção, há várias décadas, seu papel na Saúde Pública humana tem sido pouco considerado. Até recentemente, a única doença humana conhecida transmitida por carrapato era a Febre Maculosa Brasileira (FMB), descrita no Brasil pela primeira vez na década de 20 em São Paulo e Minas Gerais na década de 30. A anaplasmoze, babesiose e a erliquiose tem sido estudadas e reconhecidas pela sua importância em Medicina Veterinária, enquanto as descrições de infecções em humanos por esses agentes necessitam ser ainda profundamente estudada quanto a sua real distribuição ou mesmo ocorrência no Brasil (SILVA, 2004).

As riquetsias são parasitas intracelulares obrigatórias descritas com tamanho entre (0,3 X 0,8 µm a 0,5 X 2,0 µm) (FOURNIER; RAOULT in: PAROLA, 2009), com formato de pequenos bastonetes e que podem ser observados em microscópio pela coloração de Gimenez, pertencem a ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae e sub grupo α -Proteobacteria. Podem ser transmitidas por alguns tipos de vetores como: piolhos, ácaros, pulgas e carrapatos, onde podemos encontrar as riquetsias nas glândulas salivares e em seus ovários. É dividida em três grupos, um ancestral com *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*, o grupo tifo que é representado por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi* e o da FM composto por mais de 20 espécies (ROUX et al., 1997; YU; WALKER, 2003; LABRUNA, 2005b), Dentro do grupo FM, destaca-se *Rickettsia rickettsii*, com maior patogenicidade, depois temos a *Rickettsia parkeri* com moderada patogenicidade e outras com patogenicidade indefinida até o presente momento e as não patogênicas, tais como *Rickettsia peacockii* e *Rickettsia montanensis* (WALKER; PADDOCK; DUMLER, 2008). De modo geral, as riquetsias patogênicas não são distinguíveis das não patogênicas pelos aspectos morfológicos ou bioquímicos (BURGDORFER, 1970).

As infecções em humanos podem ser causadas por pelo menos doze espécies de riquetsias sendo elas: *Rickettsia rickettsii*; *Rickettsia conorii*; *Rickettsia africae*; *Rickettsia parkeri*; *Rickettsia australis*; *Rickettsia honei*; *Rickettsia sibirica*; *Rickettsia japonica*; *Rickettsia massiliae*; *Rickettsia aeschlimannii*; *Rickettsia akari*; *Rickettsia felis* (RAOULT; ROX 1997; RAOULT et al., 2002; PACHECO, 2007).

O Brasil tem uma grande extensão de terra e muitos habitats, e esses ambientes são explorados de diferentes formas tais as explorações de minerais e metais nobres através da mineração; o desmatamento seja para extração de madeira ou a constituição de pastagens e ou para agricultura; exploração sustentável de florestas com extração de frutas, sementes e plantas medicinais,

flores e folhagens das florestas; produção de alimentos com os rebanhos comerciais de bovinos, suínos, eqüinos, caprinos e ovinos; podemos incluir como forma de exploração turística as trilhas para caminhada. E todos esses segmentos têm atuação de seres humanos que ficam expostos aos carrapatos. Outra forma importante de contato com os vetores é a invasão de mananciais por pessoas de baixa renda e poceiros.

Sabe-se que as doenças e seus vetores estão presentes nas florestas, pois se tratam das áreas mais preservadas e com grande variedade de seres vivos e para entendê-las, é necessário conhecê-las melhor. Desta forma, o presente trabalho englobou uma área de Mata Atlântica, com poucos estudos relacionados a carrapatos, e também por estar bem próxima a capital do Estado de SP, umas das maiores cidades do mundo.

Próximo a cidade São Paulo há a maior reserva permanente de Mata Atlântica existente no Brasil, o Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), que é dividido em oito núcleos administrativos, está a 60 km da capital e a oito de São Bernardo do Campo (SBC). Hoje existem apenas 7% do que um dia foi à mata Atlântica, e uma boa parte encontra-se em SP, essa área remanescente estende-se da divisa do litoral norte de SP com o Estado do Rio de Janeiro até chegar ao extremo sul do litoral do Estado na cidade de Iguape Vale do Ribeira. Abaixo na figura 1.

Fonte: Projeto “Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar”, adaptado de IBGE e IF, 2008.

Figura 1 - Núcleos de administração do PESP.

Para definir a Mata Atlântica, existem diversas classificações. O presente trabalho utilizou a definição do IBGE de 1993, “O Decreto Lei 750/93”, que define Mata Atlântica como:

“O espaço que contém aspectos fitogeográficos e botânicos que tenham influência das condições climatológicas peculiares do mar (Joly/70) incluindo as áreas associadas delimitadas segundo o Mapa de Vegetação do Brasil (IBGE, 1993) que inclui as Florestas Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual, manguezais, restingas e campos de altitude associados, brejos interioranos e encraves florestais da Região Nordeste”

Há muito tempo atrás a Floresta Atlântica se estendia por todo o litoral do Brasil, e com a colonização e desenvolvimento de diversas cidades em meio a esse habitat, praticamente dizimamos esse Bioma.

A Mata Atlântica floresta grandiosa e heterogênea, de solo bem drenado e com grande fertilidade, é caracterizada por apresentar árvores de folhas largas, sempre-verdes, de longa duração e mecanismos adaptados para resistir tanto a períodos de calor extremo quanto de muita umidade. Sua vegetação apresenta altura média de 15 metros, mas as grandes árvores chegam a atingir até 40 metros. O grande número de cipós, bromélias, orquídeas e outras epífitas (plantas aéreas) que se hospedam nas imponentes árvores dão a esta floresta um caráter tipicamente tropical. (http://www.ra-bugio.org.br/mataatlantica_03.php).

O PESM se encaixa nas descrições de Floresta Ombrofila densa Montana e Sub-montana, descritas abaixo:

A floresta Sub-montana compreende as matas que ocorrem na faixa de altitude entre os 50 e os 500 metros, no relevo montanhoso da Serra do Mar, nos contrafortes litorâneos e nas ilhas. Seus principais remanescentes constituem, quase sempre, áreas de preservação permanente, pois estão situados na escarpa frontal da Serra do Mar (www.inea.rj.gov.br/mata/patrimonio-natural_floresta-ombrofila-densa.asp)

A composição florística é rica e variada, sendo alguns elementos bastante comuns, como o tapiá (*Alchornea iricurana* - Euphorbiaceae); as frequentíssimas embaúbas (*Cecropia spp.* - Moraceae) e quaresmeiras (*Tibouchina granulosa* - Melastomataceae); as grossas figueiras (*Ficus spp.* - Moraceae), que, muitas vezes, são árvores estranguladoras de outras árvores, crescendo sobre elas como parasitas; a carrapeta (*Guarea guidonia* - Meliaceae), sempre presente às margens dos riachos; o açoita-cavalo (*Luehea grandiflora* - Tiliaceae) e a gregária pindaíba (*Xylopia brasiliensis* - Annonaceae). Essas espécies, juntamente com dezenas de outras, formam um dossel contínuo, sombreando o interior das matas. Sob esse dossel que pode estar a 25-30m do solo e do qual sobressaem as copas do jacatirão (*Miconia fairchildiana* - Melastomataceae) e da canela-santa (*Vochysia laurifolia* - Vochysiaceae), um sem número de plantas forma um sub-bosque adaptado à luminosidade diminuída pelas árvores mais altas. As folhas, para otimização da fotossíntese possuem maiores concentrações de clorofila e, por isso, têm coloração verde-escura, como as Piperaceae dos gêneros *Piper*, *Potomorphee* *Ottoniae* os sonhos-d'ouro (*Psychotria nuda* - Rubiaceae) ou expandem as lâminas

foliares, exibindo macrofilia acentuada, como a *Rudgea macrophylla* (Rubiaceae) e as inúmeras Marantaceae (*Maranta*, *Ctenanthe*, *Stromanthe*) e Musaceae (*Heliconia*). Esse sub-bosque é o habitat do palmito (*Euterpe edulis* - Palmae), cujos estoques naturais sofrem contínua depleção por cortadores clandestinos (www.inea.rj.gov.br/mata/patrimonio-natural_floresta-ombrofila-densa.asp).

A floresta Montana localiza-se no rebordo dissecado da Serra do Mar e na Serra de Itatiaia, em altitudes compreendidas entre os 500 e os 1500m. As partes altas de algumas das unidades de conservação do Estado contêm trechos da Formação Montana da Floresta Ombrófila Densa (www.inea.rj.gov.br/mata/patrimonio-natural_floresta-ombrofila-densa.asp).

A flora dessa formação apresenta muita das espécies da Formação Submontana. Surgem, entretanto, o gigante da Mata Atlântica, o jequitibá-rosa (*Cariniana estrellensis* - Lecythidaceae), que, sobressaindo do dossel contínuo das copas, pode superar os 30m de altura. Bastante alto é, também, o ouriceiro (*Sloanea* sp. - Eleocarpaceae), (www.inea.rj.gov.br/mata/patrimonio-natural_floresta-ombrofila-densa.asp)

A dominância em espécies fica por conta das Lauraceae, que estão representadas por inúmeros gêneros (*Aiouea*, *Aniba*, *Cryptocarya*, *Endlicheria*, *Licaria*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Persea*, *Phyllostemodaphne*, *Urbanodendron*) e espécies, destacando-se, entre elas, o raríssimo tapinhoã (*Mezilaurus navalium*), de especial importância histórica: considerado o carvalho brasileiro, foi intensamente utilizado na construção de caravelas, urcas, fragatas, escunas e sumacas, bem como nos reparos das frotas que aportavam avariadas ao Rio de Janeiro. Sua intensa utilização no período colonial foi regulamentada por Carta Régia de 1799. Outras espécies que fazem parte da Floresta Montana são o cedro (*Cedrela angustifolia* - Meliaceae), o louro-pardo (*Cordia trichotoma* - Boraginaceae), o vinhático (*Plathymeria foliolosa* - Leguminosae) e o guaperê (*Lamanonia ternata* - Cunoniaceae). No sub-bosque, aparecem a guaricanga (*Geonoma* sp. - Palmae) e os fetos arborescentes ou samambaias-gigantes: *Trichopteris* sp. (Cyatheaceae) e *Dicksonia sellowiana* (Dicksoniaceae), (www.inea.rj.gov.br/mata/patrimonio-natural_floresta-ombrofila-densa.asp)

O interior dessas matas, sempre sombrio, é ocupado por plantas herbáceas de pequeno porte, como *Besleria* spp (Gesneriaceae), *Coccocypselum* spp. (Rubiaceae), *Dichorisandra* spp. (Commelinaceae), *Dorstenia* spp (Moraceae), *Pilea* spp. (Urticaceae) e uma infinidade de gêneros de Pteridophyta (*Blechnum*, *Didymochlaena*, *Dryopteris*, *Lygodium*, *Marattia*, *Polybotria*, *Sellaginella*). Cipós e escandentes são, também, numerosos: *Bauhinia* spp (Leguminosae), *Cissus* spp. (Vitaceae), *Davilla rugosa* (Dilleniaceae), *Pithecoctenium* spp. (Bignoniaceae), *Serjania* spp. (Sapindaceae) e *Smilax* spp. (Smilacaceae), entre outros (www.inea.rj.gov.br/mata/patrimonio-natural_floresta-ombrofila-densa.asp)

Troncos e galhos das árvores são literalmente cobertos de epífitos, que vão desde líquens, hepáticas e musgos, passando por várias Pteridophyta (*Hymenophyllum*, *Microgramma*, *Trichomanes*); Dicotyledoneae, como Begoniaceae (*Begonia*), Cactaceae (*Hariota*, *Ripsalis*, *Schlumbergera*), Gesneriaceae (*Codonanthe*, *Nematanthus*), Marcgraviaceae (*Marcgravia*), Piperaceae (*Peperomia*) e Monocotyledoneae, como Bromeliaceae (*Vriesia*, *Tillandsia*), Cyclanthaceae (*Carludovica*) e Orchidaceae (*Bifrenaria*, *Catasetum*, *Cattleya*, *Miltonia*, *Oncidium*, *Pleurothallis*), (www.inea.rj.gov.br/mata/patrimonio-natural_floresta-ombrofila-densa.asp)

2 OBJETIVOS

Geral:

- Avaliar a diversidade de carrapatos e infecção por *Rickettsia* sp em carrapatos colhidos no Parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Cubatão, Estado de São Paulo.

Específicos:

- Determinar a fauna de carrapatos de vida livre nas trilhas do Parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Cubatão.
- Avaliar a infecção por *Rickettsia* spp nos carrapatos colhidos no Parque.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este tópico descreve todos os procedimentos e condutas adotadas durante o presente trabalho.

3.1 Áreas de estudo - Locais da coleta de carrapatos

O PESH foi criado em 30 de agosto de 1977 pelo decreto de Lei nº 10.251, e é a maior unidade de conservação do Estado de São Paulo e a maior do país nos domínios de Mata Atlântica (CLAUSET, 1999). A maior unidade do PESH com 1.380 km² se distribui pelas cidades de São Bernardo do Campo, Cubatão, São Vicente, Bertioga, Santos, Praia Grande, Santo André, Mogi das Cruzes, Biritiba Mirim, São Paulo, Monguaguá, Itanhãem e Ribeirão Pires (CLAUSET, 1999). A vegetação é definida como Floresta ombrófila densa, presente num relevo de escarpas festonadas com altitude na faixa de 0 a 700m. A precipitação é constante e intensa variando em toda a sua extensão de 1200 mm a 4400 mm (Figura 2), com temperaturas variando de 16° C a 27 ° C durante o verão e de 10° C a 24° C no inverno (CLAUSET, 1999).

Figura. 2 - Índice pluviométrico do Parque Estadual da Serra do Mar, em toda a sua extensão. Fonte: Projeto “Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar”, adaptado.

Fonte: Sistema de Informações Florestais do Estado de São Paulo - Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Figura 3 – Mapa com a porção sudeste do Estado de São Paulo, mostrando áreas de remanescentes florestais (verde) e os limites do Parque Estadual da Serra do Mar (lilás), o retângulo preto marca a área contemplada neste estudo.

Este estudo foi conduzido no Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) Núcleo Itutinga-Pilões (figura 3), com sede situada na Estrada Elias Zarzur, quilometro 8 s-n, na cidade de Cubatão a sessenta quilômetros de São Paulo, uma reserva da biosfera da Mata Atlântica. Com 115 mil hectares, envolvendo treze municípios do Estado de São Paulo, Cubatão é um dos núcleos administrativos do Parque Estadual da Serra do Mar. O Parque possui uma área total de quase 315 mil hectares, numa extensão que vai desde a divisa de SP com o Rio de Janeiro até o município de Itariri, no sul do Estado de São Paulo, passando por toda a faixa litorânea.

Os carrapatos foram colhidos em seis trilhas dentro das imediações do parque, designadas de Trilha 1 a Trilha 6. A localização desses locais escolhidos para colheita de carrapatos pode ser observada, na tabela 1 e na Figuras 4 e 5.

Tabela 1. Trilhas utilizadas para coleta dos carrapatos no Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Itutinga-Pilões-Cubatão-Brasil-2008-2009.

Trilhas	Coordenadas	Altitude (m)	Distância para trilha 1 (m)
1	23°49'29.4"S 46°30'47.4"W	759	-----
2	23°51'28.5"S 46°30'43.1"W	746	3.930
3	23°53'36.2"S 46°34'22.6"W	764	10.600
4	23°55'47.6"S 46°31'07.5"W	69	11.700
5	23°47'35.4"S 46°18'33.3"W	993	20.600
6	23°54'17.7"S 46°29'28.3"W	36	9.300

A Trilha 1 (P1) fica na sede do parque em São Bernardo do Campo. Este ponto foi escolhido por ser próximo a residência de alguns funcionários do Parque, por conter rastros de Antas e pequenos cervídeos, local de relato de muitas capivaras, e por albergar cães de estimação infestados pelo carrapato *Amblyomma aureolatum*.

A Trilha 2 (P2) é usada pela concessionária que faz a manutenção das torres de energia e foi escolhida por apresentar muitos rastros e fezes de animais silvestres, tais como antas, cervídeos, canídeos e felinos, local pouco freqüentado por pessoas. Este ponto está entre os trechos altos das rodovias Anchieta e Imigrantes, cercado de um lado pela interligação e pelo outro por água da represa, o que o torna uma “ilha” de Mata Atlântica secundária. Este local sofreu algumas modificações ao longo dos meses de coleta em sua vegetação, no começo ela era mais densa e alta, e depois de três meses de trabalho, houve uma grande roçada na área para facilitar a manutenção das torres de Energia, coincidindo com queda substancial nas coletas de carrapatos subseqüentes, o que pode estar relacionado com alteração do micro-clima local ideal para as fases imaturas de vida livre do carrapato.

A Trilha 3 (P3) conhecida como trilha do Marinho, foi escolhida por apresentar muitos rastros de antas e rastros de pequenos cervídeos. Local com características de mata em recomposição (secundária). O caminho utilizado para acessar a trilha era rodeado por tanques formados pela mineração com a extração de areia, onde ao atingir o lençol freático formam-se os poços, que são abandonados, formando um ambiente propício para as capivaras.

A Trilha 4 (P4) conhecida como trilha da Usina, foi escolhida para representar a área de Mata Atlântica mais próxima do nível do mar, onde também foram observados muitos rastros de médios e grandes mamíferos, tais como antas, porco do mato, cervídeos e canídeos. Local com maior nível de preservação da mata.

A Trilha 5 (P5) foi escolhida por representar uma área de exploração turística da cidade de Santo André, distrito de Paranapiacaba, local de maior altitude do experimento, trilha muito utilizada por turistas. No entanto, os registros de médios e grandes mamíferos eram mais pobres, havendo relatos apenas de cervídeos, mesmo que esporádicos.

A Trilha 6 (P6) fica ao lado da estrada de acesso à sede do parque em Cubatão, ao lado do Rio Cubatão, na margem oposta da Trilha 4. Durante os trabalhos a campo, não foram observados registros de médios e grandes mamíferos nessa trilha. Os quais se encontram na figura 4 e 5, abaixo.

Fonte: Sistema de Informações Florestais do Estado de São Paulo - Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo

Figura 4 – Distribuição dos pontos de coleta de carrapatos (P1 a P6) dentro da área do Parque Estadual da Serra do Mar contemplada neste estudo.

Fonte: Sistema de Informações Florestais do Estado de São Paulo - Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.

Figura 5 – Distribuição dos pontos de coleta de carrapatos (P1 a P6) e as diferentes fisionomias vegetais que compõe a área deste estudo.

3.2 Coletas de carrapatos

As coletas de carrapatos de vida livre e de animais foram realizadas mensalmente por 12 meses de julho de 2008 a junho de 2009, nas Trilhas de 1 a 4. A Trilha 5 foi amostrada somente nos primeiros 6 meses. Devido a baixos índices de coletas, esta trilha foi substituída pela Trilha 6 a partir do sétimo mês, que foi amostrada até o décimo - segundo mês. Os carrapatos foram colhidos em vida livre no próprio ambiente, através de dois métodos:

1- Busca visual na vegetação: este método busca encontrar carrapatos em posição de espera do hospedeiro nas pontas de folhas de plantas rasteiras e de baixo porte (20-90 cm de altura) nas trilhas de animais silvestres. Estudos anteriores constataram que este método se mostrou altamente produtivo para coleta de carrapatos em florestas primárias de Mata Atlântica e Amazônia (SZABÓ et al. 2003, LABRUNA et al. 2005a).

2- Arraste de flanela. Consiste em arrastar um pedaço de pano de algodão branco (50 cm de largura x 100 cm de comprimento) sobre a vegetação marginal de trilhas e estradas. O objetivo é fazer com que o pano retire os carrapatos que estejam nas pontas das folhas na vegetação, sendo esta retirada facilitada pela consistência tipo “micro-felpuda” do pano de algodão. A cada 10 metros, o pano é minuciosamente inspecionado a procura de carrapatos que por ventura tenham sido apanhados pelo pano durante o arraste. É o método de escolha para captura de carrapatos pequenos, principalmente larvas, que são menos visíveis pelo método visual e são dificilmente capturadas pela armadilha de CO₂ (devido ao pequeno deslocamento horizontal de larvas) (VIEIRA et al. 2003).

Em cada uma das 12 coletas, cada trilha era amostrada por quatro pesquisadores ao mesmo tempo, por um tempo total de 60 minutos, que coincidia com um deslocamento médio de 900 metros.

Sempre que possível cães domésticos presentes nas trilhas durante os trabalhos de campo eram examinados para a presença de carrapatos, os quais também eram colhidos e processados juntamente com os carrapatos colhidos em vida livre. Em uma única ocasião (outubro 2008), foi encontrado um gambá (*Didelphis aurita*) morto no acesso a trilha 4. Este animal também foi examinado para presença de carrapatos, os quais foram colhidos para o presente estudo.

3.3 Identificação dos carrapatos

Todos os carrapatos capturados foram acondicionados vivos e trazidos imediatamente ao laboratório, onde foram separados primeiramente conforme o estágio de vida. Os carrapatos adultos foram identificados ao nível de espécie sob lupa estereoscópica segundo critérios morfológicos e chaves dicotômicas (ARAGÃO; FONSECA, 1961; JONES et al., 1972, BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Estudos com carrapatos brasileiros ainda não permitiram a identificação exata ao nível de larvas e ninfas de muitas das espécies de carrapatos da fauna brasileira, principalmente dentro do gênero *Amblyomma* (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Sendo assim, larvas e ninfas de carrapatos colhidos na vegetação foram alimentadas em laboratório até a obtenção de adultos e assim permitir sua identificação precisa. Para isto estes instares foram colocados para se alimentar dentro de câmaras de pano coladas ao dorso tosquiado ou aos pavilhões auriculares de coelhos domésticos, segundo PINTER et al., (2002). As larvas e ninfas ingurgitadas foram recolhidas e postas para sofrerem ecdise em estufa BOD a 25°C, 95% UR e escuro constante. As ninfas oriundas de larvas ingurgitadas foram colocadas para se alimentarem em outros coelhos, e assim fazerem ecdise para adultos. Os adultos obtidos das larvas e ninfas colhidas a campo foram utilizados para identificação taxonômica desses imaturos colhidos. As larvas colhidas em vida livre tiveram que ser quantificadas segundo o número de bolos de larvas, devido à impossibilidade de contá-las individualmente com precisão nas condições de campo. Na prática, considerou-se que cada bolo colhido era descendente de uma única fêmea. Por esta razão, não importava a diferença do número de larvas contido em cada bolo. Da mesma forma, não importava quantos adultos eram obtidos de cada bolo de larva criado até a fase adulta em laboratório; o importante era que todos eles fossem da mesma espécie.

Amostras de referência para cada espécie de carrapato encontrada foram depositadas na coleção de carrapatos “Coleção Nacional de Carrapatos – CNC” no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

3.4 Pesquisas de infecção por *Rickettsia* spp.

Somente os carrapatos colhidos no estágio adulto foram processados para pesquisa de *Rickettsia*, conforme descrito abaixo.

3.4.1 Teste de hemolinfa

O teste de hemolinfa é um método de triagem que permite identificar os carrapatos adultos que estejam infectados por organismos morfológicamente compatíveis com riquetsias (BURGDORFER, 1970). De cada carrapato, a porção distal de uma das patas foi cortada e uma a duas gotas de hemolinfa foram despejadas em lâmina de vidro limpa e desengordurada. As lâminas foram fixadas ao ar livre e coradas pelo método de Gimenez (1964) e examinadas ao microscópio óptico no aumento de 1000x. Após colheita da hemolinfa os carrapatos foram congelados a -80°C , para posterior processamento descrito abaixo.

3.4.2 Isolamento e detecção de riquetsias de carrapatos

Alguns carrapatos positivos no teste de hemolinfa, escolhidos de forma aleatória, foram descongelados e submetidos à técnica de isolamento de riquetsias em cultura de células Vero, utilizando-se a técnica de “shell vial”, conforme descrito por MARRERO e RAOULT (1989) e utilizado por LABRUNA et al., (2004a). Para tal, cada carrapato foi triturado em meio BHI estéril e inoculado em monocamadas de células Vero presentes no fundo raso de tubos “shell vial”, os quais foram centrifugados a 700 g por 1 h. Após isso, a monocamada de células Vero foi lavada com meio “Minimum Essential Medium” (MEM), contendo 5% de soro fetal bovino. Após isso, 1 ml do mesmo meio, mas com antibióticos (penicilina e estreptomicina), foi colocado em cada tubo, os quais foram incubados às temperaturas de 28°C e 32°C (um tubo para cada temperatura). Após três dias, o meio líquido de cada tubo foi centrifugado e o

sedimento foi fixado em lâmina de vidro, que foi corada pelo método de Gimenez (GIMENEZ, 1964) para visualização de estruturas tipo riquetsias no interior das células (LABRUNA et al., 2004a). Se demonstrado estruturas compatíveis com riquetsias, as células do tubo eram raspadas com a ponta de uma pipeta, e inoculadas em uma garrafa de 25cm² contendo uma monocamada de células Vero, para tentativa de estabelecer o isolado em laboratório. Se negativos, os tubos continuavam incubados na mesma temperatura, e examinados a cada três dias, até que a monocamada fosse naturalmente destruída. Uma vez estabelecido o isolado em células Vero, este era submetido ao PCR, para confirmação da espécie de riquetsia, conforme descrito por LABRUNA et al. (2004a).

Paralelamente, uma alíquota do triturado de carrapato utilizado para inocular a cultura de células, era submetida à extração de DNA e submetida ao PCR com os primers CS-78 e CS-323 (quadro 1), conforme Labruna et al., (2004a). O produto de PCR era submetido ao seqüenciamento automático de nucleotídeos, com objetivo de fazer a identificação genotípica da riquetsia presente no inoculo das células.

3.4.3 Manutenção em laboratório e caracterização molecular do isolado de *Rickettsia*

Uma vez que células do “shell vial” se mostrassem infectantes e fossem inoculadas em uma garrafa de 25cm² contendo uma monocamada de células Vero, esta foi monitorada até que se mostrasse um mínimo de 90% de células infectadas pela *Rickettsia*, através de avaliação visual pela coloração de Gimenez. Estando infectada nesta magnitude, a monocamada foi raspada e inoculada em garrafas de 150cm² contendo monocamadas de células Vero. Monocamadas que demonstrassem nível de infecção próximo de 100% das células (determinado visualmente através de coloração de Gimenez) eram raspadas, e a suspensão de células centrifugada. O sedimento de células era ressuspensionado em tampão SPG (sucrose-fosfato-glutamato), pH 7.0 estéril, sendo então congelado a – 80° C (LABRUNA et al., 2004a), formando-se amostras de referência para o isolado obtido. Parte deste material era submetido à extração de DNA, para ser usado em PCR com o objetivo de amplificar fragmentos dos genes da proteína 17-kDa, *gltA*,

ompA e *ompB* de riquétsias, utilizando todos os primers descritos no quadro 1. As condições de PCR eram as mesmas descritas por Labruna et al. (2004b).

Os fragmentos amplificados pela PCR eram purificados utilizando-se o produto comercial ExoSAP - IT (USB Corporation) e submetidos ao seqüenciamento genético utilizando-se o “kit” comercial BigDye TM Terminator – Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems. Foi utilizado o seqüenciador de DNA modelo ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Perkin Elmer), segundo seu manual de instruções. As seqüências obtidas foram editadas pelo pacote de programas Bioedit® (HALL, 1999) e submetidas à análise de similaridade com as seqüências disponíveis no GenBank, através do programa BLAST analysis (ALTSCHUL et al., 1990).

3.4.4 PCR de carrapatos

Para cada espécie de carrapatos, espécimes com resultados negativos ou inconclusivos ao teste de hemolinfa foram processados para a pesquisa de DNA de *Rickettsia*, através de PCR. Para tal, cada carrapato foi processado individualmente para extração de DNA pelo método de tiocianato de guanidina (SANGIONI et al., 2005) e submetido ao PCR para uma porção do gene *gltA*, utilizando-se os primers CS-78 e CS-323, e ao PCR para uma porção do gene *ompA*, utilizando-se os primers *Rr190.70p* e *Rr190.602n* (quadro 1), conforme descrito por Labruna et al. (2004a). Os fragmentos resultantes de PCR, que fossem compatíveis com o tamanho esperado para riquétsias, eram purificados e submetidos ao seqüenciamento direto de nucleotídeos em seqüenciador automático, conforme descrito acima. As seqüências obtidas foram submetidas ao programa “BLAST analysis” (ALTSCHUL et al., 1990) para determinação de similaridades com outras espécies de riquétsias.

O número de carrapatos positivos no PCR e seqüenciamento, somado aos dados moleculares dos carrapatos utilizados para inocular células, foram utilizados para calcular a freqüência de carrapatos infectados por cada genótipo de *Rickettsia* encontrado.

Pares de primers	Genes e primers	Seqüência de Primers (5'-3')	Referência	Posição relativa à ORF
1	16S rRNA fd1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Weisburg et al., 1991	
	800r	CTACCAGGGTATCTAAT	Weisburg et al., 1991	
2	<i>gltA</i> CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	Labruna et al. 2004a	-78 à -56
	CS-323	GCTTCCTTAAAAATCAATAAATCAGGAT	Labruna et al. 2004a	323 à 296
3	<i>htrA</i> 17k-5	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	Labruna et al. 2004b	-62 à -34
	17k-3	TGTCTATCAATTCACAACTTGCC	Labruna et al. 2004b	+6 à 464
4	<i>OmpA</i> <i>Rr190.70p</i>	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	Regnery et al. 1991	478 à 499
	<i>Rr190.602n</i>	AGTGCAGCATTGCTCCCCCT	Regnery et al. 1991	990 à 969
5	<i>OmpB</i> 120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	Roux and Raoult 2000	M59 à M41
	120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA	Roux and Raoult 2000	807 à 788

Quadro 1 - Primers utilizados no trabalho

4 RESULTADOS

Durante os 12 meses de coleta, coletou-se um total de 2440 carrapatos, sendo 455 adultos, 1939 ninfas e 46 bolos de larvas, representando 13 espécies de quatro gêneros (*Amblyomma*, *Haemaphysalis* *Ixodes* e *R. sanguineus*). Os números de carrapatos colhidos segundo o substrato amostrado (vegetação ou animais) e conforme as trilhas de coleta (P1 a P6) estão representados nas tabelas 2 a 8. As trilhas 1 a 4 foram amostradas durante os 12 meses, ao passo que a trilha 5 e 6 foram amostradas apenas por seis meses cada. Das ninfas de *Amblyomma* spp colhidas, 642 foram criadas até o estágio adulto em laboratório

Dos carrapatos adultos, 396 foram testados para pesquisa de *Rickettsia*. Pelo teste de hemolinfa, 20 (5,05%) continham estruturas semelhantes a *Rickettsia*. Porém, quando testados pelo teste de PCR, a infecção por *Rickettsia* foi confirmada apenas em 19 carrapatos (4,79%) (Tabela 10). A espécie *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica foi a mais comum, sendo identificada em *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus sanguineus* através do seqüenciamento de DNA de produtos de PCR correspondentes a fragmentos dos genes *gltA* e *ompA*. Em menores proporções, foram detectadas, por PCR, *R. bellii* em *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma incisum* e *A. ovale*, e *R. amblyommii* em *A. ovale* e *Haemaphysalis juxtakochi*.

Através da técnica de shell vial, foi isolado e estabelecido através de pelo menos 3 passagens em células Vero uma cepa de *R. bellii* de um carrapato *A. incisum*. Amostras deste isolado encontram-se criopreservadas na coleção de Riquetsias do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP. O DNA extraído de células infectadas da terceira passagem foi testado por uma bateria de PCR utilizando-se todos os primers citados no quadro 1. Produtos de PCR foram obtidos apenas para os primers direcionados aos genes 16S rRNA, *gltA* e *htrA*, os quais foram todos seqüenciados e mostraram 100% de homologia com seqüências de *R. bellii* disponíveis no GenBank.

Todos os carrapatos *A. ovale* e *R. sanguineus* infectados por *R. parkeri* foram coletados na trilha 4. *R. bellii* foi detectada em *A. incisum* das trilhas 3 e 4, *A. ovale* da trilha 4 e *A. aureolatum* da trilha 5. *R. amblyommii* foi encontrada em *H. juxtakochi* da trilha 2 e em *A. ovale* da trilha 4.

Durante o trabalho de campo, por inúmeras vezes os pesquisadores foram parasitados por larvas e ninfas de *Amblyomma* spp e em uma única ocasião por um adulto de *A. ovale*.

Tabela 2 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 1 (P1) do Parque Estadual da Serra do Mar Estado de São Paulo-Brasil-2008-2009.

Espécies de carrapatos	Número de carrapatos segundo o substrato			
	Vegetação			Animais
	Adultos	Ninfas	Larvas*	Adultos
<i>Amblyomma aureolatum</i>	3	---	---	66 (cães)
<i>Amblyomma incisum</i>	4	---	---	---
<i>Amblyomma longirostre</i>	1	---	---	---
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	9	10	5	---
<i>Amblyomma</i> spp	---	4	2	---
Total	17	14	7	66

* pela impossibilidade de contar o número exato de larvas, as larvas foram quantificadas como número de bolo de larvas.

Tabela 3 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 2 (P2) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo-Brasil-2008-2009.

Espécies de carrapatos	Número de carrapatos segundo o substrato				
	Vegetação			Animais	
	Adultos	Ninfas	Larvas*	Adultos	Ninfa
<i>Amblyomma</i> spp	---	63	15	---	1 (cão)
<i>Amblyomma aureolatum</i>	---	---	---	6 (cão)	---
<i>Amblyomma incisum</i>	6	29 ⁺	---	---	---
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	7	43	4	---	---
Total	13	135	19	6	1

* pela impossibilidade de contar o número exato de larvas, as larvas foram quantificadas como número de bolo de larvas.

⁺ Ninfas e Larvas que foram criadas até o estágio adulto em laboratório, possibilitando a identificação da espécie.

Tabela 4 - Número total de carrapatos coletados na vegetação na trilha 3 (P3) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo-Brasil- 2008-2009.

Espécies de carrapatos	Número de carrapatos segundo o substrato		
	Vegetação		
	Adultos	Ninfas	Larvas*
<i>Amblyomma brasiliense</i>	4	---	---
<i>Amblyomma incisum</i>	76	333 ⁺	4 ⁺
<i>Amblyomma dubitatum</i>		11 ⁺	---
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	15	92	2
<i>Amblyomma</i> spp	---	1037	14
Total	95	1473	20

* pela impossibilidade de contar o número exato de larvas, as larvas foram quantificadas como número de bolo de larvas.

⁺ Ninfas e Larvas que foram criadas até o estágio adulto em laboratório, possibilitando a identificação da espécie.

Tabela 5 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 4 (P4) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo-Brasil-2008-2009.

Espécies de carrapatos	Número de carrapatos segundo o substrato				
	Vegetação			Animais	
	Adultos	Ninfas	Larvas*	Adultos	Ninfas
<i>Amblyomma brasiliense</i>	32	19 ⁺	---	---	1 (cão)
<i>Amblyomma fuscum</i>	---	---	---	---	2 ⁺ (<i>Didelphis aurita</i>)
<i>Amblyomma incisum</i>	14	120 ⁺	5 ⁺	---	---
<i>Amblyomma naponense</i>	2	---	---	1 (cão)	---
<i>Amblyomma nodosum</i>	---	---	---	2 (cães)	---
<i>Amblyomma ovale</i>	22	---	---	48 (cães)	---
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	3	1	---	---	---
<i>Ixodes loricatus</i>	---	---	---	2 (<i>D. aurita</i>)	---
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	---	---	---	59 (cães)	---
<i>Amblyomma</i> spp	---	188	5	---	---
Total	71	328	10	112	3

* pela impossibilidade de contar o número exato de larvas, as larvas foram quantificadas como número de bolo de larvas.

⁺ Ninfas e Larvas que foram criadas até o estágio adulto em laboratório, possibilitando a identificação da espécie

Tabela 6 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 5 (P5) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo-Brasil-2008-2009.

Espécies de carrapatos	Número de carrapatos segundo o substrato		
	Vegetação		Animais
	Adultos	Ninfas	Adultos
<i>Amblyomma aureolatum</i>	4	---	42 (cães)
<i>Amblyomma ovale</i>	---	---	10 (cães)
<i>Ixodes aragaoi</i>	1	---	---
<i>Amblyomma</i> spp	---	2	---
Total	5	2	52

* pela impossibilidade de contar o número exato de larvas, as larvas foram quantificadas como número de bolo de larvas.

Tabela 7 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais na trilha 6 (P6) do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo-Brasil-2008-2009.

Espécies de carrapatos	Número de carrapatos segundo o substrato	
	Vegetação	
	Adultos	Ninfas
<i>Amblyomma incisum</i>	---	1 ⁺
<i>Amblyomma ovale</i>	12	---
<i>Amblyomma</i> spp	---	2
Total	12	3

* pela impossibilidade de contar o número exato de larvas, as larvas foram quantificadas como número de bolo de larvas.

Tabela 8 - Número total de carrapatos coletados na vegetação e em animais nas seis trilhas do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo-Brasil-2008-2009.

Espécies de carrapatos	Numero de carrapatos segundo o substrato				
	Vegetação			Animais (número examinado)	
	Adultos	Ninfas	Larvas	Adultos	Ninfas*
<i>Amblyomma aureolatum</i>	7	---	---	Cães (70) – 114	---
<i>Amblyomma brasiliense</i>	36	---	---	---	Cão (1) – 1 ⁺
<i>Amblyomma dubitatum</i>	---	11 ⁺	---	---	---
<i>Amblyomma fuscum</i>	---	---	---	---	<i>Didelphis aurita</i> (1) – 2 ⁺
<i>Amblyomma incisum</i>	101	482*	9*	---	---
<i>Amblyomma longirostre</i>	1	---	---	---	---
<i>Amblyomma naponense</i>	2	---	---	---	---
<i>Amblyomma nodosum</i>	1	---	---	2 (cães)	---
<i>Amblyomma ovale</i>	34	---	---	Cães (35) – 61	---
<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	34	146	11	---	---
<i>Ixodes aragaoi</i>	1	---	---	---	---
<i>Ixodes loricatus</i>	---	---	---	<i>D. aurita</i> (1) - 2	---
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	---	---	---	Cães (35) - 59	1
<i>Amblyomma</i> spp	---	1296	26	---	---
Total	217	1935	46	238	4

* pela impossibilidade de contar o número exato de larvas, as larvas foram quantificadas como número de bolo de larvas

⁺ Ninfas e Larvas que foram criadas até o estagio adulto em laboratório, possibilitando a identificação da espécie.

Tabela 9 - Infecção por *Rickettsia* em carrapatos adultos coletados da vegetação e de cães nas seis trilhas do Parque Estadual da Serra do Mar, Estado de São Paulo-Brasil-2008-2009.

Espécies de carrapatos	Vegetação			Cães		
	Nº Testado	Nº positivo (%)	Espécie de <i>Rickettsia</i> (Nº carrapatos)	Nº Testado	Nº positivo (%)	Espécie de <i>Rickettsia</i> (Nº carrapatos)
<i>A. aureolatum</i>	6	0 (0)	---	75	1 (1.3)	<i>R. bellii</i> (1)
<i>A. brasiliense</i>	35	0 (0)	---	---	---	---
<i>A. incisum</i>	101	3 (2.9)	<i>R. bellii</i> (3)	---	---	---
<i>A. longirostre</i>	1	0 (0)	---	---	---	---
<i>A. naponense</i>	1	0 (0)	---	2	0 (0)	---
<i>A. nodosum</i>	1	0 (0)	---	2	0 (0)	---
<i>A. ovale</i>	34	4 (11.7)	<i>R. parkeri</i> (3), <i>R. bellii</i> (1)	59	9 (15.3)	<i>R. parkeri</i> (8), <i>R. amblyommii</i> (1)
<i>H. juxtakochi</i>	25	1 (4.0)	<i>R. amblyommii</i> (1)	---	---	---
<i>R. sanguineus</i>	---	---	---	54	1 (1.9)	<i>R. parkeri</i> (1)

5 DISCUSSÃO

Os carrapatos foram coletados em seis pontos previamente estabelecidos, para que abrangêssemos uma área que tivesse altitudes diferentes, com variações de temperatura, de vegetação e animais diferentes, visando uma maior diversidade de espécimes a serem coletadas. Com isso, foram identificadas as seguintes treze espécies de carrapatos:

Amblyomma aureolatum Pallas 1772, carrapato de carnívoros em fase adulta e em fase imatura, parasita, roedores e aves, a relatos de parasitismo humano (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Amblyomma brasiliense Aragão 1908, carrapato que parasita mamíferos da ordem Artiodactyla e Perissodactyla encontrado em humanos (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Essa espécie é endêmica da América do Sul, com relatos no Brasil, Argentina, Paraguai (GUGLIELMONE et al. 2003). Aragão relatou que larvas e ninfas são muito agressivas. Recentemente em Intermirantes foi relatado parasitando humanos (SZABÓ et al., 2006).

Amblyomma dubitatum Neumann 1899, parasita a ordem Rodentia, foi encontrada em antas, morcegos e também no homem, (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Amblyomma fuscum Neumann 1907, parasita répteis, mas já foi encontrado em cachorro do mato e tatu (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Amblyomma incisum Neumann 1906, parasita de mamíferos Perissodactyla. Seu principal hospedeiro é a anta *Tapirus terrestris* (LABRUNA et al., 2005a), mas já foi encontrado em capivaras e cachorros do mato; suas ninfas parasitam pequenos roedores e lebres. É bastante agressivo para o ser humano, principalmente o estágio ninfal (BARROS-BATTESTI et al., 2006; SZABÓ et al., 2009a). *A. incisum* é reportado na Amazônia e também para áreas não Amazônicas como Argentina, Paraguai e sudeste do Brasil (LABRUNA et al. 2005a; SZABÓ et al., 2006a).

Amblyomma longirostre Koch 1844, na fase adulta parasita animais da ordem Rodentia, principalmente ouriços (BARROS-BATTESTI et al., 2006); os estádios de larva e ninfa têm como hospedeiros preferenciais aves Passeriformes (BOTÃO-

MIRANDA et al., 2001; STORNI et al., 2005; VENZAL et al., 2005). *Amblyomma naponense* Packard 1869, parasita as ordens Artiodactyla e Xenarthras (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Amblyomma nodosum Neumann 1899, parasita a ordem Xenarthra na fase adulta e imaturos parasitam aves (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Amblyomma ovale Koch 1844, parasita na fase adulta vários hospedeiros sendo principalmente encontrado em carnívoros. Imaturos foram encontrados em carnívoros e gambás (BARROS-BATTESTI et al., 2006); há relatos de parasitismo humano em uma região de mata Atlântica do sul do Estado de São Paulo (SZABÓ et al., 2006a), No Estado de Rondônia, é o carrapato mais freqüentemente relatado em humanos (LABRUNA et al., 2005a).

Haemaphysalis juxtackochi Koch 1844, parasita em fase adulta mamíferos da ordem Artiodactyla e fase imatura, diversos hospedeiros (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Ixodes aragaoi Fonseca, 1935, parasita mamíferos da ordem Artiodactyla, especialmente cervídeos do gênero *Mazama*, imaturos foram encontrados em pequenos roedores (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Ixodes loricatus Neumann 1899, parasita em fase imatura, roedores e em fase adulta, Marsupiais (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Rhipicephalus sanguineus Latreille 1806, parasita principalmente canídeos domésticos, raramente parasitam o homem (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

As trilhas 1, 2, 3 e 5 têm as mesmas características de vegetação (secundária) juntamente com a trilha 6, apesar das distâncias entre as trilhas. A trilha 4 tem características únicas, com uma mata mais densa e preservada, o que se observa na figura 5. No entanto, enquanto as trilhas 1, 2, 3 e 5 se apresentam a altitudes acima de 700m, as trilhas 4 e 6 estão abaixo de 100m em relação ao nível do mar. Interessantemente, *A. aureolatum* foi encontrado em cães e em vida livre apenas nas áreas acima de 700m (trilhas 1, 2 e 5), ao passo que *A. ovale* prevaleceu nas áreas baixas (trilha 4 e 6). Vale mencionar que os poucos achados de *A. ovale* em cães na trilha 5 (tabela 6) estiveram sempre condicionados à presença pregressa desses cães em áreas de baixa altitude (<100m) durante no máximo uma semana antes da coleta, conforme relatado pelos próprios proprietários dos cães (dados não mostrados). Desta forma, é bem provável que essas infestações por *A. ovale* foram adquiridas nas áreas de baixa altitude e os

cães serviram de transporte do carrapato para as áreas mais altas. No entanto, não houve qualquer indício que *A. ovale* estivesse estabelecido nessas áreas altas, pois jamais foi encontrado em vida livre, ao contrário das trilhas 4 e 6.

Os resultados do presente trabalho assemelham-se parcialmente aos relatados por Szabó et al. (2009a), realizado em áreas de Mata Atlântica do Parque Estadual de Intervales, sul do Estado de São Paulo. Em ambos os trabalhos, a espécie *A. incisum* foi a mais abundante na vegetação, seguidas de *A. brasiliense*, *A. ovale*, *A. aureolatum*, *A. dubitatum* e *H. juxtakochi* em menores proporções. Por outro lado, o presente trabalho relata uma maior diversidade de espécies, já que *A. nodosum*, *A. fuscum*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *I. aragaoi*, *I. loricatus* e *R. sanguineus* não foram encontradas em Intervales. A única espécie encontrada em Intervales, porém não relatada no presente trabalho, foi *A. cajennense*. Essas diferenças podem estar relacionadas a chances de amostragem, e não necessariamente a ausência ou presença dessas espécies de carrapatos em uma das duas áreas.

Com relação as rickettsias encontradas no PESM, a bactéria mais comum foi a *Rickettsia parkeri* que foi descoberta em 1937 pelo pesquisador Ralph Robinson Parker, em carrapatos da espécie *Amblyomma maculatum* no estado do Texas. Atualmente, a ocorrência de pelo menos três cepas de *R. parkeri* estão confirmadas nos Estados Unidos, Argentina, Uruguai e Brasil, infectando os carrapatos *A. maculatum* (cepa Maculatum), *A. triste* (cepa Maculatum), *A. dubitatum* (cepa Cooperi) e *A. nodosum* (cepa NOD) (Labruna 2009, OGRZEWALSKA et al., 2009). Muito embora *R. parkeri* é conhecida desde o final da década de 1930, sua patogenicidade foi confirmada somente recentemente (PADDOCK et al., 2004). Casos de febre maculosa causada por *R. parkeri* têm sido relatados nos Estados Unidos, Uruguai e mais recentemente, no estado de São Paulo (SPOLIDORIO et al., 2010). Vale ressaltar que enquanto os casos humanos dos Estados Unidos e possivelmente o Uruguai referem-se à cepa Maculatum, o caso recente do Brasil refere-se a uma nova cepa, chamada de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Este caso foi adquirido no município de Peruíbe, numa reserva de Mata Atlântica a uma altitude inferior a 100m do nível do mar, porém o carrapato transmissor não foi identificado ao nível de gênero e espécie (SPOLIDORIO et al., 2010). Diante dos resultados do presente trabalho, onde cerca de 10 a 15% dos carrapatos *A. ovale* foram encontrados infectados por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, é bem provável

que este carrapato seja o vetor desta riquetsia para seres humanos. Esta afirmação é reforçada pela capacidade demonstrada de *A. ovale* em parasitar seres humanos e pela sua ampla distribuição em áreas de Mata Atlântica, principalmente abaixo de 700 m (SZABÓ et al., 2006, 2009a).

A espécie *A. ovale* está amplamente distribuída pelo Brasil, sendo relatada em todos os biomas exceto Caatinga (LABRUNA et al., 2005c). No Rio Grande do Sul, onde *A. ovale* é um dos principais parasitos de cães domésticos de áreas rurais (Luis A. Sangioni, Comunicação Pessoal), um recente estudo demonstrou evidências sorológicas de infecção por *R. parkeri* em pelo menos 100 cães, a maioria de áreas rurais (SAITO et al., 2008). De forma semelhante, no Estado de Rondônia, onde *A. ovale* é o principal carrapato parasitando cães de áreas rurais (LABRUNA et al., 2005a), recentemente houve evidência sorológica de infecção por *R. parkeri* em pelo menos quatro cães (LABRUNA et al., 2007a). Desta forma, é possível que diferentes populações de *A. ovale* em diferentes áreas do Brasil estejam transmitindo *R. parkeri* para animais e humanos, porém sem confirmação laboratorial da infecção. As técnicas sorológicas usualmente utilizadas para o diagnóstico de febre maculosa brasileira, supostamente causada por *R. rickettsii*, se baseiam simplesmente em antígenos de *R. rickettsii*, sem o emprego de antígenos adicionais tal como *R. parkeri* (LABRUNA, 2009). Como essas duas espécies de riquetsia freqüentemente apresentam reações sorológicas cruzadas, é bem provável que parte dos casos de febre maculosa brasileira laboratorialmente confirmados por sorologia tenham sido causados por *R. parkeri*, embora tal afirmação careça de futuras investigações.

O achado de um adulto de *R. sanguineus* infectado por *R. parkeri* na trilha 4 merece atenção e pode estar relacionado à co-alimentação dos cães dessa trilha por *A. ovale* e *R. sanguineus*. Este achado levanta a possibilidade de *R. sanguineus* também servir como vetor de *R. parkeri*, especialmente para cães, seu principal hospedeiro.

Foi encontrado também *R. belli*, a qual devemos ressaltar que é a mais comum encontrada em diversos carrapatos tanto Argas, Ornithodoros, Haemaphysalis, Ixodes, and Amblyomma (LABRUNA, 2007b) e *R. amblyommii* que foi relatada para *H. juxtakochi* (LABRUNA, 2007c)

O PESM possui algumas particularidades a serem observadas com a exposição do homem ao vetor de agentes do GFM e outras zoonoses. Após o

término da construção da rodovia Anchieta na década de 1970, as instalações utilizadas pelos operários que ali moraram durante a construção foram invadidas por sem-tetos. Ali eles se estabeleceram e se multiplicaram hoje se tornaram um problema para a integridade do PESH, pois se encontram em uma área de manancial e proteção ambiental, poluindo o ambiente ao seu redor, desmatando, caçando e retirando palmitos e folhagens. Ainda há o problema dos poceiros que em algum momento do passado se estabeleceram dentro dos limites do PESH e até que as indenizações saiam, eles ainda estarão dentro do parque. Somando-se ao caráter turístico do PESH, resultando na presença de inúmeras pessoas nas trilhas do parque ao longo do ano, os resultados do presente trabalho indicam que os riscos dessas pessoas (residentes e turistas) em adquirirem a febre maculosa causada por *R. parkeri* no PESH é real, já que 10 a 15% dos carrapatos *A. ovale* desta área estão infectados por esta riquetsia. Desta forma, o relato de presença recente a áreas do PESH deve ser considerado um importante fator na anamnese de pacientes com suspeitas clínicas de febre maculosa no Estado de São Paulo.

6 CONCLUSÃO

-O PESM apresenta uma alta diversidade de carrapatos, com pelo menos 13 espécies pertencentes a quatro gêneros, infectados por pelo menos três espécies de *Rickettsia* (*R. parkeri*, *R. bellii* e *R. amblyommii*).

-*Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica é um patógeno comum em carrapatos *A. ovale* nas áreas de baixa altitude do parque, indicando que seres humanos que freqüentam estas áreas estão sob risco de febre maculosa causada por esta riquetsia.

7 REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v. 215 p. 403-410, 1990.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-130, 1961.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, H. G. Carrapatos de importância medico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 1. ed. São Paulo/BR: **Vox/ICTTD-3/Butantan**, 2006, 223pp.

BOTÃO-MIRANDA, R. A.; STORNI, A.; RITTER, P. D. Parasitismo por carrapatos em algumas aves capturadas na Ilha Grande, Estado do Rio de Janeiro. **Rev. Bras. Patol.**, v. 37, p. 226, 2001.

BURGDORFER W. The hemolymph test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, p. 1010-1014, 1970.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: **Walker D.H.**, Ed.: 33–50. CRC. Biology of Rickettsial Diseases, Boca Raton Inc., FL, 1988, p. 33-50.

CLAUSET, L. R. Paisagem paulista: áreas protegidas. São Paulo: **Empresa de Artes**, 1999. 185 p.

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

FOURNIER, P. E. AND RAOULT, D. Bacteriology, Taxonomy, and Phylogeny of *Rickettsia*. In RAOULT D., PAROLA P. *Rickettsial Diseases*. New York, London, **Ed. Informa health care**, 2009, cap. 1, p. 1 – 13.

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

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

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENÑA, A.; KEIRANS, A. J.; ROBBINS, R. G. Ticks (Acari). Ixodida of the Neotropical zoogeographic region. Special Publication of the International Consortium. **Ticks and Tick-borne Diseases**. Atalanta, Houten, The Netherlands, 2003, 173 pp.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PENÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp. Appl. Acarol.** v. 40, p. 83–100. 2006.

GUIMARAES, J. H.; TUCCI E. C. AND BARROS - BATRRESTI. D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. Editora Plêiade, São Paulo, 2001.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleos Acids Symp.** Ser, v. 41, p. 95-98, 1999.

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

JONES, E. K.; CLIFFORD, C. M.; KEIRANS, J. E.; KOHLS, G. M. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the western hemisphere. **Brigham Young University. Science Bulletin**. Biological Series, v. 17, n. 4, 1972.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3-4, 2004.

LA SCOLA, B.; MECONI, S.; FENOLLAR, F.; ROLAIN, J. M.; ROUX, V.; RAOULT, D. Emended description of *Rickettsia felis* (Bouyer et al., 2001), a temperature-dependent cultured bacterium. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v. 52, p. 2035–2041, 2002.

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, p. 90-98, 2004a.

LABRUNA, M. B., WHITWORTH, T., BOUYER, D. H., MCBRIDE, J., CAMARGO, L. M., CAMARGO, E. P., POPOV, V., WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **J. Med. Entomol.** v. 41, p. 1073–1081. 2004b.

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

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondônia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 169–174. 2005b.

LABRUNA M. B.; JORGE, R. S.; SANA, D. A.; JÁCOMO, A. T.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S. JR; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H.; GOMES, A. A.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F.; MORATO, R. L.; ALHO, C. J.; PINTER, A.;

FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI D. M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 36, n. 1-2, p. 149-63, 2005c.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. Anais I Simpósio Brasileiro de Acarologia – I SIBAC, p. 63-78, **In: Simpósio Brasileiro de Acarologia**, 2006.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 7, n. 2, p. 249-55, 2007a.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; NAVA, S.; BRANDÃO P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; GUGLIELMONE, A. A. Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. **Microb. Ecol.** v. 54, p. 126–133, 2007b.

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

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Rickettsiology And Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1166, p. 156 -166, 2009.

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

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A., RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F., LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in an Atlantic rain Forest region of Brazil. **J Med Entomol**, n. 46, vol. 5, p. 1225-9, . 2009.

OLIVER, Jr. J. H. Biology And Systematics Of Ticks (Acari: Ixodida). **Annu. Rev. Ecol. Syst.**, v. 20, p. 397-430, 1989.

PACHECO, R. C. Pesquisa de *Rickettsia* spp. Em carrapatos *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899 e *Amblyomma triste* Kock 1844, provenientes do Brasil Uruguai, respectivamente. 2007. 51 f (Doutorado em Medicina Veterinária) – **Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia**, São Paulo, 2007.

PACHECO, R. C.; ROSA, D. S.; RICHTZENHAIN, L.; SZABÓ, M. P. J., LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from southern Brazil. **Rev.MVZ Córdoba**. v. 13, n. 2, p. 1273-1279. 2008.

PACHECO, R. C.; ROSA, S.; RICHTZENHAIN, L.; SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from Southern Brazil. **Revista MVZ Córdoba** v.13 p. 1273-1279, 2008.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L.; TAMMINGA, C. L.; OHL C. A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 6, p. 805-11, 2004.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Vet. Res.** v. 36, p. 469–492, 2005a.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clin. Microbiol.** v. 18, p. 719–756, 2005b.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H.. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Vet. Parasitol.**, vol. 105, p. 79-88, 2002.

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

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, p. 694–719, 1997.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; ABBOUD, P.; CARON, F. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* Infection. **Emerging Infectious Diseases**, n. 8, v. 7, p. 748-749, 2002.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, p.1576-1586, 1991.

ROUX, V.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsiae* sequencing and analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, p. 2058-2065, 1996.

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer membrane protein rOmpB (*ompB*). **International Journal of Systematic Evolution and Microbiology**, v. 50 p. 1449-1455, 2000.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN F. G.; FARIAS, N. A. R.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B.. Canine Infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in Southern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79 n.1, p. 102–108, 2008.

SILVA, L. J. Doenças Transmitidas por Carrapatos em Humanos: Ocorrência, distribuição e impacto em saúde pública, com ênfase no Estado de São Paulo. In: **Consulta de especialistas OPAS/OMS sobre rickettsioses nas Américas – Relatório Final**, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil, p. 22–30, 18-19 de setembro de 2004.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS H. G. C.; LABRUNA M. B. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerg Infect Dis.**, v. 13, p. 1111–1113, 2007.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B., MANTOVANI, E., BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. A novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. V. 434, p. 817-2040, 2010.

STORNI, A.; ALVES, M. A. S.; VALIM, M. P. Ácaros de penas e carrapatos (Acari) associados a *Turdus albicollis*, Vieillot (Aves, Muscicapidae) em uma área de Mata Atlântica da Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil. **Rev. Bras. Zool.**, v. 22, p. 419-423, 2005.

SUMNER, J. W.; DURDEN, L. A.; GODDARD, J.; STROMDAHL, E. Y.; CLARK K. L.; REEVES, W. K.; PADDOCK, C. D. Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) and *Rickettsia parkeri*, United States. **Emerg. Infect. Dis.** v.13, p. 751–753, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; GARCIA, M. V.; VOGLIOTTI, A.; LABRUNA, M. B.; CASTAGNOLLI, K. C.; CASTRO, M. B.; DUARTE, J. M. B. Ticks feeding on the brocket deer (*Mazama SPP.*) and Free-living ticks at deer trails in the Atlantic rain forest of southeast Brazil. In: Biennial Conference of The Society for Tropical Veterinary Medicine, 7th . **Abstracts and Program**, Foz do Iguaçu, Brasil, 2003, p. 30.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; CASTAGNOLLI, K. C.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Exp Appl Acarol.**, v. 39, p. 339–346, 2006.

SZABÓ, M. P. J.; PEREIRA, L. F.; CASTRO, M.B.; GARCIA, M. V.; SANCHES, G. S.; LABRUNA, M. B. Biology and life cycle of *Amblyomma incisum* (Acari:Ixodidae). **Exp Appl Acarol** v. 48, p. 263–271, 2009a.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V.; CASTAGNOLLI, K. C.; PACHECO, R. C.; CASTRO, M. B.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B.. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. **Ann Trop Med Parasitol** v. 103, n. 1, 57–72, 2009b.

VENZAL, J.M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 10, p. 1493– 1495, 2004.

VENZAL, J. M.; FÉLIX, M. L.; OLMOS, A.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. A Collection of ticks (Ixodidae) from wild birds in Uruguay. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 36, p. 325-331, 2005.

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

WALKER, D. H.; PADDOCK, C. D.; DUMLER, J. S. Emerging and Re-emerging Tick-transmitted Rickettsial and Ehrlichial infection. **Med. Clin. N Am**, v. 92, p. 1345-1361, 2008.

WEISBURG, W. G.; BARNS, S. M.; PELLETIER, D. A. AND LANE, D. J. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **J. Bacteriol.**, v. 173 p. 697-703, 1991.

WEISS, E., MOULDER, J. W. The rickettsias and chlamydias. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, **vol. 1. ed. Krieg, N.R., Holt, J.G., Williams and Wilkins**, p. 687–739, 1984.

http://www.ra-bugio.org.br/mataatlantica_03.php, acesso em 25/01/2010.

http://www.inea.rj.gov.br/mata/patrimonio-natural_floresta-ombrofila-densa.asp, acesso em 25/01/2010.