FRANCISCO BORGES COSTA

Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do Estado do Maranhão

São Paulo

2014

FRANCISCO BORGES COSTA

Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do Estado do Maranhão

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.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

De acordo:_____

Orientador

São Paulo
2014

Obs: A versão original se encontra disponível na Biblioteca da FMVZ/USP

VERSÃO CORRIGIDA

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.2969
FMVZ

Costa, Francisco Borges
Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do estado do Maranhão / Francisco Borges Costa. -- 2014.
115 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. Cães. 2. Carrapatos. 3. *Rickettsia*. 4. Maranhão. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por Rickettsia spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do estado do Maranhão", protocolado sob o nº 2263/2011, utilizando 600 (seiscentos) cães, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, 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 e foi aprovado em reunião de 22/6/2011.

We certify that the Research "Seroepidemiological and molecular epidemiology of rickettsial infections in dogs and ticks from urban and rural zones of the State of Maranhão, Brazil", protocol number 2263/2011, utilizing 600 (six hundred) dogs, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, 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 and was approved in the meeting of day 06/22/2011.

São Paulo, 27 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Costa, Francisco Borges

Título**:** Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do Estado do Maranhão

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_____

Dedicatória

Esta obra é dedicada a minha esposa

Andréa P. da Costa e aos meus queridos pais e irmãos

Agradecimentos

Nada seria tão fascinante nesta obra, se não conhecesse a realidade do meu povo maranhense, pelas portas abertas, pelo acolhimento de cada cidadão com seus cães em suas humildes residências... E foram tantas! E jamais iria perder esta oportunidade de dizer muito OBRIGADO por tudo.

Tudo na vida tem um início! Agradeço aos meus pais Sr. Antônio Tavares Costa e Sra. Maria Fagunda Borges Costa que sempre primaram pela minha educação e meu bem-estar, e somando a eles jamais me esquecerei dos meus irmãos que sempre me ofereceram a oportunidade de estudar longe de casa. Muitíssimo obrigado!

O relógio não pára, o tempo não pára... E viver com Andréa, a vida se tornou mais doce. Obrigado por tudo!!!

O sonho era entrar na universidade, até aquele momento seria o fim de uma jornada acadêmica, mas foi com a ajuda dos professores da Universidade Estadual do Maranhão que pude ir um pouco mais longe com as pesquisas, e hoje estou prestes a defender a tese de doutorado, aos senhores (em especial, Porfírio Candanedo Guerra, Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra, Ana Clara Gomes dos Santos, Antonia Oliveira e José Gomes) eu agradeço pela oportunidade de produzir novos conhecimentos.

E na área da pesquisa, tive o prazer de trabalhar e acompanhar seus ensinamentos durante estes três anos, falo do meu orientador Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna. Não apenas pela dedicação a pesquisa e didática nas aulas, mas pela seriedade com que as tratam. Ah! E a expedição – Complexo *Amblyomma cajennense*, uma maravilha “Alberto”. Muito obrigado pelo exemplo!

A todos os professores do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, que contribuíram com seus conhecimentos para minha vida dentro e fora da academia, em especial aos professores Drª. Solange Maria Gennari e Dr. Ricardo Augusto Dias, muito OBRIGADO!

A todos os funcionários do VPS, em especial Hilda de Fátima Jesus Penha, Renato Caravieri, Pedro Cesar F. da Silva, Sheila Oliveira de Souza, Sueli Akemi, Danival Lopes Moreira, por tudo de bom que aconteceu nestes anos.

A todos os colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias (que são muitos!), em especial aqueles que participaram desta jornada, seja no campo ou no laboratório: Andréa P da Costa, Thiago Fernandes Martins, Fernanda A Nieri-Bastos, Jonas Moraes Filho, Herbert de Sousa Soares, Diego Garcia Ramirez, Amália Regina Mar Barbieri e Tatiana Evelyn Hayama Ueno. Agradeço também Aline Gil Alves Guilloux do Laboratório de Epidemiologia e Bioestatística.

Aos amigos que conheci nesta jornada como Adriano Pinter, Maria Ogrzewalska, Matias Szabó, Danilo Saraiva, Gislene Fournier, Mauríco Horta, Arlei Marcilli, João Fábio Soares, Felipe Krawzack, Monize Gerardi, Renata Sakai, Ricardo Arrais, Aline Diniz e Ronaldo de Freitas. Desculpem-me pela minha memória, se esqueci de algum amigo.

Aos amigos que deixei em São Luís do Maranhão, José Maria Meireles, Edvaldo Franco Amorim Filho, Antonio Ferreira Simões Filho, Netto Simões, Márcio Simões, Vívian Magalhães, Tom dos Santos e Joicy Cortês de Sá.

Não posso esquecer-me dos bons momentos com os amigos que vieram de outros países como Paula Lado, Lucas Monje (Pancho!), Markéta Nováková, Margareth Paterrina, Álvaro Faccini, Sebastián Flores, Sebastián Muñoz, Jorge Luis, Evelina Tarragona, Mauricio Hernández, Angélica Escarcega, Paola Gomez e José Antonio Guzmán, muito obrigado pelo convívio.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da USP pela gentileza, atenção e esclarecimentos, em especial à Dra. Elza M Faquim.

Agradeço muito as instituições que me ajudaram com esta pesquisa no Maranhão como AGED-MA (Karlos Yuri Fernandes Pedrosa e Eric Takashi) e a UEMA (Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira de Candanedo Guerra e Prof. Dr. Hamilton Pereira Santos); USP/FMVZ/VPS.

Agradecemos a FAPESP pela aprovação do projeto: Processo nº 10/52395-0.

"Se queres prever o futuro, estuda o passado."

Confúcio, filósofo chinês.

RESUMO

COSTA, F. B. **Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do Estado do Maranhão. [**Seroepidemiology and molecular epidemiology by *Rickettsia* spp infections in dogs and ticks from urban and rural environments in the state of Maranhão]. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A emergência e reemergência de doenças transmitidas por artrópodes são desafios para as medicina Veterinária e Humana. Cães domésticos estão frequentemente expostos as diferentes espécies de carrapatos, os quais fazem destes animais bons sentinelas para riquetsioses que afetam os humanos. O Estado do Maranhão está localizado na região Nordeste do Brasil, numa área de transição dos biomas Amazônia e Cerrado. Neste contexto, no presente estudo, objetivou-se avaliar infecções por riquétsias em cães e carrapatos. Durante o perído de 2011 a 2013, amostras de sangue foram coletadas aleatoriamente de 1560 cães, sendo de áreas urbanas e rurais de oito municípios: Açailândia, Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento e São Domingos. As amostras foram testadas pela reação de imunofluorescência indireta para cinco espécies de riquétisas: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, "*Candidatus* Rickettsia amblyommii", *Rickettsia rhipicephali* e *Rickettsia bellii*. Os carrapatos foram coletados sobre os cães, identificados morfologicamente e submetidos a pesquisa de riquétsias, quase todos os carrapatos foram submetidos ao teste de hemolinfa e tentativa de isolamento de riquétsia. Do total, 12,6% (196/1560) dos cães foram sororreativos a *Rickettsia* spp. Noventa e dois soros mostraram títulos para *Rickettsia parkeri*, "*Candidatus* Rickettsia amblyommii", *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* pelo menos quatro vezes maior do que aqueles outros antígenos de riquétisa. Desta forma, considera-se que os cães foram infectados por *Rickettsia parkeri* (1 soro), "*Candidatus* Rickettsia amblyommii" (73 soros), *Rickettsia rhipicephali* (6 soros) and *Rickettsia bellii* (12 soros), com títulos variando de 128 a 16.384. Novecentos e cinquenta e nove carrapatos foram coletados sobre os cães, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* sensu lato, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma rotundatum*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Amblyomma* sp. Produtos da reação em cadeia pela polimerase de 17 carrapatos foram sequenciados e mostraram corresponder a "*Candidatus* Ricketsia andeanae", *Rickettsia bellii* and "*Candidatus* Rickettsia amblyommii". Estes resultados sugerem que estas riquétsias ou uma cepa muito próxima estão infectando

cães no Estado do Maranhão, ressaltando o potencial patogênico destas espécies de riquétsias no Nordeste do Brasil. Ao mesmo tempo, diferencia-se do Sudeste do Brasil, onde hospedeiros sentinelas como os cães, tendem a ter maiores títulos para *Rickettsia rickettsii* ou *Rickettsia parkeri*, os agentes da febre maculosa no Sudeste do Brasil.

Palavras-chave: Cães. Carrapatos. *Rickettsia*. Maranhão.

ABSTRACT

COSTA, F. B. **Seroepidemiology and molecular epidemiology by *Rickettsia* spp infections in dogs and ticks from urban and rural environments in the state of Maranhão. [**Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do Estado do Maranhão]. 2014. 115 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

The emergence and reemergence of diseases transmitted by arthropods are challenges for the Veterinary and Human medicine. Domestic dogs are often exposed to different tick species, what makes these animals good sentinels for rickettsial diseases that affect humans. The state of Maranhão is located in the northeastern region of Brazil, in a transition area from Amazon to Savannah biomes. In this context, the present study aimed to evaluate rickettsial infection in dogs from this state. During the period 2011 to 2013 blood samples were randomly collected from 1560 domestic dogs, being from urban and rural areas of eight municipalities of Maranhão: Açailândia, Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento and São Domingos. Samples were tested by indirect imunofluorescence assay against 5 *Rickettsia* species: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, "*Candidatus* Rickettsia amblyommii", *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii*. Ticks were collected on dogs to morphological taxonomic identification and to rickettsia research, almost ticks were submitted to hemolymph test and shell vial attempting to isolate rickettsia. Overall, 12.6% (196/1560) of the dogs were seroreactive to *Rickettsia* spp. Ninety-two sera showed titers to *Rickettsia parkeri*, "*Candidatus* Rickettsia amblyommii", *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* at least 4-fold higher than those observed to the other rickettsial antigens. In this way, we considered that these dogs were infected by *Rickettsia parkeri* (1sera), "*Candidatus* Rickettsia amblyommii" (73 sera), *Rickettsia rhipicephali* (6 sera) and *Rickettsia bellii* (12 sera), with titers ranging from 128 to 16,384. Nine hundred and fifty-nine ticks were collected on dogs (*Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma cajennense* sensu lato, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma rotundatum*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Haemaphysalis juxtakochi* and *Amblyomma* sp). Polymerase chain reaction products of at least seventeen of these ticks were sequenced and also showed to correspond to "*Candidatus* Ricketsia andeanae", *Rickettsia bellii* and "*Candidatus* Rickettsia amblyommii". These results suggest that these ricketsias or close-related strains are infecting

dogs in Maranhão state, highlighting the potential pathogenicity of these *Rickettsia* species in northeastern Brazil. At the same time, it differentiates from southeastern Brazil, where sentinel hosts like dogs tend to have higher titers to *Rickettsia rickettsii* or *Rickettsia parkeri*, the agents of spotted fever in southeastern Brazil.

Keywords: Dogs. Ticks. *Rickettsia*. Maranhão.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Caracterização da população canina das áreas urbana e rural de oito municípios do Estado do Maranhão..... 58

Tabela 2 - Ocorrência de carrapatos em cães das áreas urbanas e rurais de oito municípios do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil..... 59

Tabela 3 - Ocorrência de cães infestados por carrapatos das áreas urbanas e rurais de oito municípios do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil..... 60

Tabela 4 - Ocorrência de carrapatos coletados sobre os cães das áreas urbanas e rurais de oito municípios do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil..... 60

Tabela 5 - Infestação simples, mista com duas e três espécies de carrapatos em cães das áreas urbanas e rurais de oito municípios do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil..... 62

Tabela 6 - Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para os cinco antígenos de *Rickettsia* sp nos municípios de Açailândia, Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento e São Domingos, Maranhão, Nordeste do Brasil..... 64

Tabela 7 - Resultados das análises univariadas (teste exato de Fisher) para associação entre variáveis independentes com os resultados sorológicos de cães domésticos, analisados através de quatro perfis sorológicos determinados pela da reação de imunofluorescência indireta: (i) cães reativos a *Rickettsia* spcom titulos ≥64; (ii) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 64; (iii) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 512; (iv) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos pelo menos quatro vezes maior que os títulos finais para as demais espécies de *Rickettsia* testadas. Maranhão, 2014..... 67

Tabela 8 - Modelo final da regressão logística multivariada, com determinação de fatores de risco (odds ratio) associados a quatro perfis sorológicos de cães domésticos testados pela reação de imunofluorescência indireta: (i) cães reativos a *Rickettsia* sp com títulos ≥64; (ii) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 64; (iii) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 512; (iv) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos pelo menos quatro vezes maior que os títulos finais para as demais espécies de *Rickettsia* testadas. Maranhão, 2014..... 69

Tabela 9 - Carrapatos testados pela técnica de Shell Vial e PCR nos municípios de Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento e Viana, Estado do Maranhão, Brasil..... 71

LISTAS DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da localização geográfica dos municípios de Açailândia, Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento e São Domingos do Maranhão..... 47

Figura 2 - Distribuição dos soros caninos reagentes a *Rickettsia* spp segundo os ecossistemas amostrados. Os números percentuais nas caixas indicam a soropositividade de cães em áreas urbana e rural por município..... 65

Gráfico 1 - Boxplot dos títulos sorológicos para as cinco espécies de *Rickettsia* em cães de áreas urbanas e rurais do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil..... 63

Quadro 1 - Lista dos primers utilizados nas reações da PCR para a identificação das riquétsias nos carrapatos e nos isolados em cultivo celular..... 52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Brain-heart infusion
CRD	Cães com raças definidas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Deoxirribonucleotídeos- N- trifosfato
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
et al.	E colaboradores
EUA	Estados Unidos da América
EXOSAP	Exonuclease Shrimp Alkaline Phosfatase
FM	Febre maculosa
FMB	Febre maculosa brasileira
FMM	Febre maculosa do mediterrâneo
FMMR	Febre maculosa das montanhas rochosas
FMMA	Febre maculosa mata atlântica
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
gltA	Citrato sintase
GT	Grupo Tifo
GTr	Grupo de transição
GCa	Grupo canadenses
GB	Grupo bellii
GFM	Grupo da febre maculosa
htrA	High temperature requirement A
IC	Intervalo de confiança
IBSP	Coleção Acarológica do Instituto Butantan de São Paulo
IGT	Isotilcianato de guanidina

ISE6	Ixodes scapularis embrionário
KCl	Cloreto de potássio
MA	Maranhão
MEM	Minimum essencial médium
MG	Minas Gerais
ompA	Outer membrane protein A
ompB	Outer membrane protein B
PA	Provável antígeno
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
Primer	Oligonucleotídeo iniciador da PCR
RFLP	Polimorfismo de fragmentos de restrição
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
RPM	Rotações por minuto
Rrs	16S ribossomal RNA gene
Seq	Sequenciamento
SP	São Paulo
SRD	Sem raça definida
Taq	Thermus aquaticus
TBE	Tris Borato EDTA
TE	Tampão Tris EDTA
TRIS	tris(hydroxymethyl) amino metano
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Veterinária Preventiva e Saúde Animal
*Sca*1	Surface cell antigen 1

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
˚C	Graus Celsius
mm	Milímetro
Km	Quiilômetro
x	Vezes
µL	Microlitro
x g	Múltiplos da gravidade terrestre (9,8 m/s^2)
g	Força da gravidade
h	Hora
cm^2	Centímetro ao quadrado
mmol	Milimolar
pH	Potencial hidrogênico
KDa	Kilodalton
®	Marca registrada
TM	Trade Mark
V	Voltagem
ng	Nanograma
M	Molar
Mg	Magnésio
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µg	Micrograma
pb	Pares de bases
uv	Ultravioleta

$\leq$	Menor ou igual a
$>$	Maior que
$<$	Menor que
$\geq$	Maior ou igual a
x^2	Quiquadrado
+	Positivo
*	Asterísco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 22

2 REVISÃO DE LITERATURA..... 25

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO..... 25

2.2 *Rickettsia rickettsii*..... 26

2.3 *Rickettsia parkeri*..... 28

2.4 "*Candidatus* Rickettsia amblyommii"..... 30

2.5 *Rickettsia rhipicephali*..... 34

2.6 *Rickettsia bellii*..... 35

2.7 "*Candidatus* Rickettsia andeanae"..... 36

2.8 *Rickettsia felis*..... 37

2.9 *Rickettsia monteiroi*..... 39

2.10 *Rickettsia massilliae*..... 39

2.11 VETORES..... 41

2.12 HOSPEDEIROS..... 42

3 OBJETIVOS..... 45

4 MATERIAL E MÉTODOS..... 46

4.1 ÁREA DE ESTUDO..... 46

4.2 AMOSTRAGEM, QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO E COLETA DE MATERIAIS..... 47

4.2.1 **Amostragem**..... 47

4.2.2 **Questionário epidemiológico**..... 48

4.2.3 **Coleta de materiais – carrapatos e soros**..... 49

4.3 DIAGNÓSTICO DIRETO – PESQUISA DE RIQUÉTSIA EM CARRAPATOS..... 49

4.3.1 **Teste de hemolinfa**..... 49

4.3.2 **Técnia de isolamento em "Shel-vial"**..... 50

4.3.3 **Extração de ácidos nucléicos (DNA)**..... 51

4.3.4 **Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**..... 52

4.3.5 **Eletroforese**..... 53

4.3.6 **Purificação e seqüenciamento**..... 54

4.3.7 **Análise das sequências**..... 54

4.3.8 **Frequência de carrapatos infectados**..... 54

4.4 DIAGNÓSTICO INDIRETO – PESQUISA DE ANTICORPOS PARA RIQUÉTSIA NOS SOROS DOS CÃES..... 55

4.4.1 **Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)**..... 55

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 55

4.6 COLETAS ADICIONAIS DE CARRAPATOS..... 56

5 RESULTADOS..... 57

5.1CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CANINA DA ZONA URBANA E RURAL DE OITO MUNICÍPIOS DO MARANHÃO..... 57

5.2 CARRAPATOS..... 58

5.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA *Rickettsia* spp..... 62

5.4 INFECÇÃO POR *Rickettsia* NOS CARRAPATOS E ISOLAMENTO PELA TÉCNICA DE SHELL VIAL..... 70

5.4.1 **Coletas adicionais de carrapatos para isolamento de *Rickettsia***..... 71

6 DISCUSSÃO..... 72

6.1 CARRAPATOS EM CÃES NO MARANHÃO..... 73

6.2 SOROLOGIA DE CÃES PARA *Rickettsia* spp..... 77

6.3 INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp EM CARRAPATOS..... 79

7 CONCLUSÃO..... 82

REFERENCIAS..... 83

APÊNDICES..... 110

ANEXO..... 115

1 **INTRODUÇÃO**

Atualmente, observam-se mudanças na distribuição espacial e abundância de muitas espécies, incluindo carrapatos e seus patógenos. Essas mudanças são principalmente devido às alterações climáticas, modificações de habitat e a globalização das atividades humanas. Neste contexto, os carrapatos vêm se estabelecendo e permitindo questionamentos sobre suas consequências para a diversidade genética e seu potencial impacto sobre nichos naturais que invadem e podem permanecer desconhecidos para a ciência (LINDGREN et al., 2000; OGDEN et al., 2009; MEDLOCK et al., 2013). Exemplos como *Ixodes scapularis* e *I. ricinus* no leste e norte dos Estados Unidos e da Europa, respectivamente, assim como *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* na América do Sul, e *Amblyomma variegatum* nas Ilhas do Caribe mostram suas adaptações em outros ecossistemas e hospedeiros (LINDGREN et al., 2000; OGDEN et al., 2009; BARRE; UILENBERG, 2010; LÉGER et al., 2013; MEDLOCK et al., 2013).

Rickettsias são bactérias intracelulares obrigatórias que estão classicamente divididas em três grupos: o grupo tifo (GT), composto por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, associadas com os piolhos e pulgas, respectivamente. O grupo da febre maculosa (GFM) inclui mais de 20 espécies válidas, principalmente associadas aos carrapatos (por exemplo, *R. rickettsii*, *R. parkeri*) e pelo menos uma espécie associada com pulgas, *R. felis* (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005) e um grupo mais basal onde estão incluídas *R. bellii*, *R. monteiroi* e *R. canadensis* (MCKIEL; BELL; LACKMAN, 1967; PACHECO et al., 2011; LABRUNA et al., 2011b).

Segundo Pinter e Labruna (2006); Labruna (2009, 2011c); Pacheco et al. (2011); Ogrzewalska et al. (2012, 2014); Barbieri, Romero e Labruna (2012); Ramírez-Hernández et al. (2013); Flores-Mendoza et al. (2013); Miranda; Mattar (2013); Krawzack et al. (20014) e Nieri-Bastos et al. (2014), na América Latina, pelo menos 9 espécies de riquétsias foram registradas: *R. rickettsii* infectando *A. aureolatum* e *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) no Brasil, *R. felis* infectando pulgas na Argentina, Brasil, Chile, Colombia, Peru, Costa Rica, Panamá, México e Uruguai; *R. parkeri* infectando carrapatos no Uruguai, Argentina, Peru, Bolívia e Brasil; *R. massiliae* infectando carrapatos na Argentina; '*Candidatus* Rickettsia amblyommii' infectando carrapatos na Argentina, Brasil, Paraguai, Costa Rica, Panamá e Guiana Francesa; *R. bellii* infectando carrapatos na Argentina, Colômbia, El Salvador, Peru e no Brasil; *R. rhipicephali* infectando carrapatos no Brasil, *R.*

monteiroi infectando carrapato no Brasil e "*Candidatus* Rickettsia andeanae" infectando carrapatos na Argentina, Brasil, Paraguai e Peru. Entre estas, todas as espécies são classificadas no GFM, exceto a *R. bellii* que não faz parte do TG e nem GFM.

A ocorrência de carrapatos em cães no Brasil mostra dois cenários distintos intimamente dependentes do ambiente onde o hospedeiro vive. No primeiro cenário, os cães são criados em ambientes urbanos, dentro ou fora das residências, não tendo acesso às áreas onde vivem carnívoros silvestres ou outros mamíferos. Neste caso, os carrapatos encontrados nos cães são, na sua grande maioria, pertencentes à espécie *Rhipicephalus sanguineus* de hábitos nidícolas, introduzida no Brasil possivelmente pelo homem (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

No segundo cenário, os cães são criados em áreas rurais ou suburbanas, onde vivem soltos e têm acesso livre às matas e a outros ambientes, onde várias espécies de animais silvestres e domésticos estão presentes. Nestas condições, os cães podem ser infestados por diferentes espécies de carrapatos nativos, pertencentes ao gênero *Amblyomma* (LABRUNA; PEREIRA, 2001).

O Maranhão, com grande diversidade de ecossistemas, possui condições ambientais favoráveis às fases de vida livre do carrapato. Segundo Sangioni (2003), o conhecimento da epidemiologia em regiões com potencial biótico para o desenvolvimento da doença consiste em determinar as condições socioeconômicas da população, a distribuição e densidade dos vetores já como transmissores, as condições ecológicas das localidades e as espécies de hospedeiros envolvidas. Assim, a atividade humana sobre a vegetação tem um importante papel no surgimento e expansão das riquettsioses. O reflorestamento feito com arbustos e a prática agrícola de monoculturas favorecem a proliferação de artrópodes devido à formação de microclimas favoráveis, os quais geram um excelente habitat, favorecendo a sobrevivência dos ixodídeos e mamíferos hospedeiros dos estádios intermediários (CARDOSO, 2006).

Neste contexto, ressalta-se que os animais domésticos e silvestres estão frequentemente expostos a diferentes espécies de carrapatos, dependendo da distribuição destes artrópodes vetores no ambiente. Recentemente o interesse em carrapatos de animais domésticos tem aumentado por causa das doenças emergentes e reermegentes transmitidas por eles, incluindo aquelas causadas por rickettsias, devido a sua natureza zoonótica.

O território maranhense é composto por três grandes biomas, Amazônia, Cerrado e Caatinga, possuindo uma grande diversidade de fauna e flora. Por sua extensão territorial e posição estratégica de confluência dos biomas, o Estado situa-se numa zona de transição dos climas semiáridos do interior do Nordeste para os úmidos equatoriais da Amazônia,

permitindo que as condições edafoclimáticas ocorram com grande variabilidade, proporcionando diversos ecossistemas que vão desde ambientes salinos com presença de manguezais, vegetação secundária, grandes áreas com babaçuais e vegetação de grande porte com características do sistema amazônico (MARANHÃO, 2002). Assim sendo, o Estado do Maranhão aparece no cenário nacional como uma das áreas de maior diversidade animal e vegetal (AB´SABER 1977; MUNIZ, 2006; DIAS et al., 2009). Pouco se sabe sobre a ixodofauna do Estado e, consequentemente os possíveis patógenos que podem ser transmitidos aos animais e ao homem. Desta forma, um estudo transversal foi realizado para conhecer a magnitude das infecções por *Rickettsia* sobre os cães e carrapatos, contribuindo com dados sobre a epidemiologia das rickettsioses no Brasil, além de subsidiar cientificamente as ações de Saúde Pública.

2 **REVISÃO DE LITERATURA**

2.1 AGENTE ETIOLÓGICO

Riquétsias são cocobacilos, intracelulares obrigatórios, medindo entre 0,3-0,5 por 0,8-2,0 μm^2, possuem uma estrutura trilaminar com uma camada de peptidoglicano, e uma membrana exterior de dupla camada. O citoplasma destas bactérias contém ribossomos e filamentos de DNA. Dentro das células hospedeiras as riquétsias não são coradas pelo método de Gram, mas pelo método de Gimenez que retêm fuscsina básica quando coradas (GIMENEZ, 1964). Usando este método, elas aparecem vermelho brilhante, enquanto o fundo é manchado em azul pálido com a contrastante verde malaquita (PAROLA et al., 2007). Estas bactérias pertencem à família Rickettsiaceae e à ordem Rickettsiales (RAOULT; ROUX, 1997).

Atualmente, 26 espécies de riquétsias com validade e nomes publicados foram relatados, incluindo *R. asiatica*, *R. heilongjiangensis*, *R. hoogstraalii*, *R. raoultii*, e *R. tamurae* que foram relatados na última e maior revisão sobre riquétsias transmitidas por carrapatos em 2005 (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005; EUZEBY, 2006; FOURNIER et al., 2006; FUJITA et al., 2006; MEDIANNIKOV et al., 2008; DUH et al., 2010).

Recentemente, com o uso de ferramentas moleculares aplicadas foi possível sugerir, por uma análise multigênica, uma nova filogenia para o gênero *Rickettsia*, como segue: i) grupo do tifo (GT), composto pelas espécies *R. prowazekii* e *R. typhi*; ii) grupo da febre maculosa (GFM), representado por mais de vinte espécies; iii) grupo de transição (GTr), onde estão inseridas *R. akari*, *R. felis* e *R. australis*; iv) grupo canadensis (GC), formado pela espécie *R. canadensis* e afins; 5) grupo bellii (GB), representado pela espécie *R. bellii* e uma gama de outros genótipos encontrados em insetos (WEINERT et al., 2009; MERHEJ; RAOULT, 2011).

2.2 *Rickettsia rickettsii*

Na última década do século XIX, aconteceu a primeira menção clínica de rickettsiose no continente americano, quando recebeu o nome de “sarampo preto” (black measles), por seu exantema característico. Mais tarde, Edward E. Maxey relatou pela primeira vez um caso clínico de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) transmitida por carrapato (MAXEY, 1899; GUGEL et al., 2009). Sete anos depois em 1906, Dr. Howard Taylor Ricketts, considerado como um dos microbiologistas e patologistas mais famosos da história da medicina, foi capaz de detectar o agente etiológico (*R. rickettsii*) da FMMR no sangue das pessoas infectadas e a transmissão pelo carrapato como vetor. Em 1909, ele viajou até a Cidade do México para estudar o agente infeccioso de um grande surto de tifo exantemático. No ano seguinte, enquanto isolava a bactéria causadora da doença (*R. prowazekii*) se infectou e morreu pouco depois (GROB; SCHAFER, 2011).

No Brasil, a doença foi descrita pela primeira vez pelo médico e pesquisador José Toledo Piza em 1929, em São Paulo (PIZA, 1932). Em Minas Gerais, Octávio de Magalhães descreve sucintamente os trabalhos realizados desde a década de 30 até 1956, dando valiosas contribuições ao estudo do tifo exantemático no Brasil (MAGALHÃES, 1957). Nestas três décadas de pesquisa foi possível elucidar pontos importantes sobre a epidemiologia da FMB.

No inicio da década de 1930, em São Paulo - SP, as pesquisas demonstraram pela primeira vez que o carrapato *Amblyomma cajennense* foi infectado experimentalmente com o agente causador da doença, quando alimentado em cobaia doente, experimentalmente infectada (LEMOS-MONTEIRO, FONSECA; PRADO, 1932a). No mesmo ano, demonstraram a transmissão intra-estadial e vertical do agente da FMB pelo carrapato *A. cajennense* (LEMOS-MONTEIRO; FONSECA, 1932). No ano seguinte, o agente etiológico foi isolado em cobaia a partir de um exemplar de *A. aureolatum (*Sin. *A. ovale striatum)* adulto coletado de um cão (GOMES, 1933). Segundo Pinter (2007), este representa o primeiro isolamento da bactéria causadora da FMB realizado a partir de carrapatos no Brasil. Após sete décadas, o isolamento e a manutenção em cultura de células Vero de *R. rickettsii* cepa Taiaçu ocorreu a partir de *A. aureolatum*, em São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006). Até o presente momento, na América Latina, *R. rickettsii* nunca foi isolada diretamente de *A.*

cajennense em cultivo celular pela técnica de *shell vial*, devido a sua baixa taxa de infecção na população de *A. cajennense*. Entretanto, recentemente, Krawzack et al. (2014) obtiveram com sucesso pela primeira vez, um isolado viável de *R. rickettsii* cepa Itu em cultivo celular, a partir de tecidos de cobaia infectada com macerado de *A. cajennense* infectado por *R. rickettsii* em meio de cultura BHI (brain-heart infusion).

Carrapatos adultos de *A. aureolatum* se alimentam preferencialmente em espécies da ordem Carnívora (principalmente cães domésticos em áreas peri-urbanas), mas os carrapatos imaturos, larvas e ninfas, preferem se alimentar em aves passeriformes e algumas espécies de roedores (GUGLIELMONE et al., 2003; GUGLIELMONE et al., 2006). É importante salientar que nas zonas rurais próximas de áreas remanescentes de mata Atlântica, os cães domésticos desempenham um papel importante, levando *A. aureolatum* adultos de dentro da floresta para as residências e podendo ser acidentalmente transferidos dos cães para as pessoas (GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004). Resultados de pesquisas têm corroborado as observações históricas de casos humanos de FMB na área metropolitana da grande São Paulo, onde o principal vetor incriminado é *A. aureolatum* (OGRZEWALSKA et al., 2012).

Outro vetor importante para a FMB no Brasil é o *A. cajennense*, que tem a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e o cavalo (*Equus caballus*) como hospedeiros primários nas áreas endêmicas para FMB. No entanto, uma vez que a população deste carrapato aumente em uma determinada área, outras espécies de hospedeiros acidentais como os cães e os seres humanos tornam-se mais frequentemente infestados por larvas, ninfas e adultos, mas a maioria sem competência biológica para sustentar uma população de *A. cajennense* (ARAGÃO, 1936; VIEIRA et al., 2004; GUGLIELMONE et al., 2006a). Porém, devido a grande área de distribuição do *A. cajennense* na América e experimentos de cruzamentos de diferentes populações deste carrapato, foi proposto que este seria um complexo de seis espécies (LABRUNA et al., 2011a; MASTROPAOLO et al., 2011), sendo confirmado por Nava et al. (2014).

No Brasil, duas espécies deste complexo são bem distribuídas, onde a presença de *A. cajennense* (*A. cajennense* sensu stricto) está relacionado com "*Ca.* R. amblyommii" no bioma Amazônico e *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) está relacionado com *R. rickettsii* em áreas degradadas dos biomas Mata Atlântica e Cerrado em Minas Gerais, São

Paulo e Rio de Janeiro (LABRUNA et al., 2004c; GUEDES et al., 2005; AMORIM-FILHO, 2012; KRAWZACK et al., 2014; MOURA-MARTINIANO et al., 2014).

R. sanguineus é o principal vetor de *R. conorii* no Mediterrâneo, e infecção humana por *R. rickettsii* transmitida pelo *R. sanguineus* já foi relatada nos EUA e México (DEMMA et al., 2005; EREMEEVA et al., 2011). Szabó, Pinter e Labruna (2013) chamam a atenção para as diferentes populações de carrapatos envolvidos com esta riquetsiose, já que estudos com diferentes populações de *R. sanguineus* têm mostrado pela análise genética, morfologia, biologia e geografia, duas distintas espécies sob o táxon *R. sanguineus* na América do Sul, sendo uma encontrada em áreas tropicais e subtropicais e outra no cone sul da América do Sul (Sul do Brasil, Uruguai, Chile e Argentina) (OLIVEIRA et al., 2005; SZABÓ et al., 2005; MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2012).

Recentemente, novos dados epidemiológicos têm colocado *R. sanguineus* como um vetor suspeito em área endêmica para FMB (MORAES-FILHO et al., 2009; OGRZEWALSKA et al., 2012). Desta forma, supõe-se que em locais com altas densidades de *R. sanguineus* e cães, a infecção por *R. rickettsii* possa ser introduzida por espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, sendo que a transmissão para os humanos pode ocorrer acidentalmente por picadas do *R. sanguineus* ou por esmagamento no momento da coleta sobre os cães, com maior probabilidade de ocorrer em pessoas que lidam com estes animais com frequência, como por exemplo, trabalhos em canis públicos (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013).

Outros países do continente americano reportaram casos de febre maculosa causada por *R. rickettsii*, como México (Febre Manchada), Canadá, Colômbia (Febre de Tobia), Argentina, Costa Rica e Panamá (PATINO; AFANADOR; PAUL, 1937; DIAS, 1939; BUSTAMANTE; VARELA 1947; MAGALHÃES, 1957; RODANICHE, 1953; PHILIP et al., 1978; DUMLER; WALKER, 2005; PADDOCK et al., 2008).

2.3 *Rickettsia parkeri*

No final da década de 30, o Dr. R. R. Parker e colaboradores reportaram o isolamento de uma bactéria do carrapato *A. maculatum* no Texas, sudoeste do Estados Unidos da

América (EUA). Depois inoculou o “agente maculatum” em cobaias e, estas desenvolveram sinais clínicos como febre moderada que lembra as outras rickettsioses do GFM e da febre maculosa do Mediterrâneo (FMM) (PARKER et al., 1939; PARKER, 1940). Vinte e oito anos depois, Lackman et al. (1965) denominaram este agente como *R. parkeri* em homenagem ao Dr. Parker. Por 67 anos, *R. parkeri* foi considerada como não patogênica para humanos. Somente no início deste século, registraram o primeiro caso clínico em humanos por *R. parkeri* transmitida por *A. maculatum*, o principal vetor desta riquetsiose nos EUA (PADDOCK et al., 2004) e sua ocorrência reportada atualmente em nove Estados, sendo eles: Alabama, Arkansas, Flórida, Georgia, Kentucky, Missisipi, Oklahoma, Carolina do Sul, Texas e Virginia (FORNADEI et al., 2011). Provavelmente, muitos casos pregressos de riquetsioses humana por *R. parkeri* foram equivocadamente atribuídos a casos leves de riquetsiose por *R. rickettsii* (PADDOCK et al., 2009).

Na América do Sul, os primeiros casos da doença por *R. parkeri* foram registrados no Uruguai (VENZAL et al., 2000; CONTI-DIAZ et al., 2009). Durante a década de 90, neste país, casos de rickettsiose transmitida por carrapatos foram diagnosticados com base em análises sorológicas utilizando antígenos de *R. conorii* (CONTI-DIAZ, 2003). Porém, nenhum método direto de diagnóstico foi realizado na época e *R. conorii* nunca foi encontrada no continente americano, sendo assim, outras riquétsias podem ter sido responsáveis pelos casos relatados no Uruguai. Além disso, os sinais clínicos são muito similares aos da febre maculosa causada por *R. parkeri* nos EUA (PARKER et al., 1939; PADDOCK et al., 2005; PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005). Desta forma, Venzal et al. (2004) publicaram pela primeira vez *R. parkeri* infectando *A. triste* (carrapato mais comum parasitando humanos) no Uruguai, sugerindo como o agente mais provável da FM. Mais tarde, Pacheco et al. (2006) isolaram *R. parkeri* de *A. triste* neste país.

Portillo et al. (2013) relataram o primeiro caso confirmado por análises moleculares de infecção humana por *R. parkeri* no Uruguai, após uma paciente retornar à Espanha depois de uma viagem de 7 dias a Colonia Suiza (sudoeste do Uruguai), apresentando febre (39ºC), calafrios e duas escaras (*tache noire-like*) rodeado por um halo eritematoso endurecido no lado interno do tornozelo esquerdo, além de uma erupção maculopapular nas pernas. Após o tratamento com doxiciclina durante 7 dias, o paciente ficou totalmente recuperado. Infecção por *R. parkeri* foi diagnosticada pela detecção molecular baseada em um *swab*’ no local da escara, assim como pela soroconversão entre as amostras da fase aguda e convalescente.

R. parkeri foi encontrada em carrapato *A. triste* por Nava et al. (2008) na Argentina, onde ocorreram dois casos humanos, mas sem identificação do vetor envolvido na transmissão (ROMER et al., 2011). Na Bolívia, uma pesquisa demonstrou uma taxa de infecção de 50% (22/44) por *R. parkeri* em carrapatos *A. tigrinum* (TOMASSONE et al., 2010a).

No Brasil, diferentes cepas próximas a *R. parkeri* foram descritas em carrapatos *A. dubitatum* de Pedreira, SP (cepa COOPERI), *A. nodosum* de Teodoro Sampaio, SP e Campo Grande, MS (cepa NOD), *A. triste* de Paulicéia, SP (cepa At24), *A. ovale* e *R. sanguineus* em Santa Catarina e São Paulo, e *A. aureolatum* em Santa Catarina (cepa Mata Atlântica) (LABRUNA et al., 2004b; SILVEIRA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2009; SPOLIDORIO et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; SILVA, et al., 2011; BARBIERI, 2012; OGRZEWALSKA et al., 2013).

Recentemente no Brasil, uma nova rickettsiose humana (Febre Maculosa da Mata Atlântica - FMMA) foi descrita por Spolidorio et al. (2010) em um paciente que foi picado por um carrapato, apresentando no local do ataque do ixodídeo uma lesão papular típica de "escara de inoculação" (*tache noire*), a qual é frequentemente observada em infecções por diferentes riquétsias do GFM. Após amplificação e sequenciamento de DNA de *Rickettsia* da amostra da pele no local da picada, provaram a existência de uma nova riquetsia do GMF em maio de 2009, no litoral sul do Estado de São Paulo, no município de Peruíbe, numa área de reserva de Mata Atlântica. Os autores denominaram este novo patógeno como *Rickettsia* sp cepa Mata Atlântica, a qual se mostrou filogeneticamente próxima a *R. parkeri*, *R. africae* e *R. sibirica* (SPOLIDORIO et al., 2010). Neste mesmo local, em Peruíbe, Szabó et al. (2013a) isolaram a cepa Mata Atlântica a partir de carrapatos adultos da espécie *A. ovale* coletados sobre cães, que continham altos títulos sorológicos anti-*R. parkeri*. Os autores concluíram que *A. ovale* é o vetor de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica para humanos e cães.

2.4 "*Candidatus* Rickettsia amblyommii"

No ano de 1974 na América do Norte, "*Ca.* R. amblyommii" foi isolada pela primeira vez no Tennessee - EUA de carrapatos *A. americanum*, sendo referida como cepas 85-1034,

WB-8-2 e MOAa (BURGDORFER et al., 1981; WELLER et al., 1998). Este carrapato é um importante vetor de doenças, que tem aumentado drasticamente em abundância e distribuição geográfica nos últimos anos, por causa da expansão da população do veado de cauda branca nos EUA (CHILDS; PADDOCK, 2003, PADDOCK; YABSLEY, 2007) e todos os estágios parasitários deste artrópode são agressivos para humanos. Em algumas áreas dos EUA, 40% ou mais de *A. americanum* podem estar infectados por "*Ca.* R. amblyommii" (GODDARD; NORMENTE, 1986; KELLY et al., 2005).

Em 2008 e 2009, no Estado de Maryland nos EUA, Zhang et al. (2012) coletaram mais de 500 *A. americanum* adultos não alimentados de 19 populações deste Estado para pesquisar a presença de "*Ca.* R. amblyommii", e relataram que as frequências de infecção variavam em média de 33 a 100%, com uma média de taxa de infecção de 60% em 2008 e 69% em 2009. Além disso, isolaram e cultivaram com sucesso "*Ca.* R. amblyommii" em células (Sua5B) de mosquitos *Anopheles gambiae*.

Logo no início do século XXI, já se suspeitava de que esta riquétsia era estritamente associada ao gênero *Amblyomma*, pois morfologicamente não diferia de outras bactérias do GFM quando cultivada em células de carrapatos, além de reagir com anticorpos monoclonais específicos para *R. rickettsii* e na análise filogenética sendo relacionanda com *R. montanensis* e *Rickettsia* sp. cepas ISS e Cooleyi (WELLER et al., 1998; MEDIANNIKOV et al., 2007).

O papel de "*Ca.* R. amblyommii" como um agente patogênico para humanos tem sido sugerido num estudo, no qual, 12 membros de uma unidade militar, desenvolveram doenças brandas e anticorpos reativos contra riquétsias do GFM pela técnica de Western Blot, quando frequentaram campos infestados por carrapatos em Arkansas e Virgínia. Os investigadores determinaram, em cinco destes pacientes perfis específicos de reatividade para os principais antígenos de proteínas de superfície de um isolado de "*Ca.* R. amblyommii" denominado de cepa 85-1034, sugerindo infecção com este agente (DASCH et al., 2003). Billeter et al. (2007) relatam em 2006, um caso de uma paciente que desenvolveu uma erupção cutânea no local de fixação do carrapato *A. americanum* infectado com "*Ca.* R. amblyommii", sendo tratada com doxiciclina por nove dias, entretanto não foi possível neste estudo, provar que a enferma teve contato com o agente do GFM e indica que estudos são necessários para avaliar a patogenicidade desta riquétsia.

Permanece ainda especulativo o papel de "*Ca.* R. amblyommii" como causa de doença leve para humanos, visto que antígenos específicos ou DNA ainda não foram demonstrados a

partir de amostras humanas (NICHOLSON et al., 2009). Segundo estes autores, é possível que exposição a "*Ca.* R. amblyommii" ou outro membro do grupo da GFM possam induzir reação cruzada em ensaios sorológicos usando antígenos de *R. rickettsii*, chamando a atenção para casos de doença branda, devido a outras riquétsias do GFM ser sorologicamente classificada como FMMR e ter resultados falsos-positivos para a vigilância epidemiológica.

As riquétsias do grupo da febre maculosa estão intimamente relacionadas geneticamente, assim como compartilham antígenos LPS da parede celular e proteínas da membrana externa A e B de riquétsia. Desta forma, antígenos de *R. rickettsii* têm detectado presença de anticorpos em muitas pessoas saudáveis, que não tiveram histórico de FM ou doença clinicamente compatível (WILFERT et al., 1984; TAYLOR et al., 1985). A presença de "*Ca.* R. amblyommii" nos EUA já foi identificada nos seguintes Estados: Florida; Georgia; Iowa; Louisiana; Mississipi; New Jersey; New York; North Carolina; Oklahoma, Rhode Island; South Carolina e Tennessee, variando de 3 a 60% em *A. americanum* e *D. variabilis* (MIXSON et al., 2006; CASTELLAW et al., 2010; MONCAYO et al., 2010; SMITH et al., 2010; LEYDET; LIANG, 2013).

Na América Latina, os países que já relataram a presença de "*Ca.* R. amblyommii" foram Brasil, Argentina, Guiana Francesa, Panamá, Costa Rica e Paraguai (LABRUNA et al., 2004c; LABRUNA et al., 2007a; PAROLA et al., 2007; BERMÚDEZ et al., 2009; HUN et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2013).

Hun et al. (2011) realizaram com sucesso o isolamento e manutenção em cultivo celular de riquétsias presentes em três carrapatos da espécie *A. cajennense*, coletados em Cahuita e Turrialba, na Costa Rica. Estes três isolados foram designados como cepas AcCR (9-CC-1), AcCR(9-CC-3-1) e AcCR(11-TC-1-1) e na caracterização molecular pelos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* foram identificadas como "*Ca.* R. amblyommii". Rivas et al. (2013) evidenciaram infecção, desenvolvimento de anticorpos e doença branda em cobaias quando inoculadas com "*Ca.* R. amblyommii", entretanto mais estudos são necessários para avaliar a patogenicidade desta bactéria.

No Brasil, já foi descrita em cinco biomas a ocorrência de "*Ca.* R. amblyommii" com distribuição nos seguintes Estados: Maranhão, Pará, Paraná, Pernambuco, Rôndonia e São Paulo em diferentes biomas como Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (LABRUNA et al., 2004a; PACHECO et al., 2012; OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA,

2010; MELO et al., 2011; AMORIM-FILHO, 2013; OGRZEWALSKA et al., 2013; SARAIVA et al., 2013).

Em 2004, evidencia-se pela primeira vez em um pool de dois carrapatos *A. longirostre* no Estado de Rondônia, oeste da Amazônia, uma riquétsia designada como cepa Aranha pela análise da sequência parcial do gene *ompA*, sendo filogeneticamente agrupada com "*Ca.* R. amblyommii" cepas WB-8-2 e MOAa (BURGDORFER et al., 1981; WELLER et al., 1998; LABRUNAet al., 2004a). Neste mesmo ano, Labruna et al. (2004c) encontraram carrapatos *A. coelebs* e *A. cajennense* com "*Ca.* R. amblyommii". Nesta última espécie de carrapato, isolaram e estabeleceram "*Ca.* R. amblyommii" em cultivo pela primeira vez na América do Sul. Poucos anos depois, um estudo realizado em Nazaré Paulista - SP, Ogrzewalska et al. (2008) coletaram em aves carrapatos identificados como *A. longirostre* que estavam infectados por uma riquétsia filogeneticamente próxima "*Ca.* R. amblyommii" cepa Aranha. Neste mesmo estudo, em um carrapato adulto de *A. longirostre*, isolaram esta riquétsia que foi denominada como cepa AL.

No período de 2006 a 2008, Pacheco et al. (2012) encontraram (32,3% de taxa de infecção) em carrapatos *A. longirostre* infectados com "*Ca.* R. amblyommii" cepa AL no bioma Mata Atlântica. Posteriormente, no bioma Amazônico Norte do Brasil, relataram dentre 67 carrapatos da espécie *A. longirostre* uma taxa de infecção de 56,7% e de 7 *A. geayi* com 57,1% de taxa de infecção para "*Ca.* R. amblyommii" (OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2010).

Outros pesquisadores como Saraiva et al. (2013) isolaram "*Ca.* R. amblyommii" de *A. auricularium*, sendo o primeiro relato para a região Nordeste do Brasil, além de investigar por três gerações consecutivas (ovos, larvas, ninfas e adultos) a perpetuação desta riquétsia pela transmissão transovariana e transestadial. Outra ocorrência desta riquétsia foi encontrada no Maranhão (Baixada Maranhense), onde carrapatos da espécie *A. cajennense* coletados em "cavalos baixadeiros" apresentaram uma taxa de infecção de 20% (3/15) para "*Ca.* R. amblyommii" (AMORIM-FILHO, 2013).

Visto que esta riquétsia é largamente distribuída no país, faz-se necessário chamar a atenção aos testes sorológicos quando se usa antígeno bruto, pois pode ocorrer reação cruzada com outros antígenos de riquétsia patogênica do GFM, como exemplos: *R. rickettsii* e *R. parkeri* (PIRANDA et al., 2008; HORTA et al., 2010).

2.5 *Ricketssia rhipicephali*

Em uma pesquisa sobre *Rickettsia* em carrapatos do cão (*Rhipicephalus sanguineus*), uma nova riquétsia relacionada ao GFM, mas distinta de *R. rickettsii* foi detectada em 167/884 (18.9%) destes carrapatos no centro e norte do Mississipi, EUA, em 1975 (BURGDORFER et al., 1975). Três anos depois, foi nomeada como *R. rhpicephali* em um estudo que mostraram esta riquétsia invadindo tanto glândulas salivares quanto ovários de *R. sanguineus*, além de produzir um baixo grau de histopatologia, o qual não parece afetar fêmeas ingurgitadas e sua descendência (BURGDORFER et al., 1978; HAYES et al., 1979).

Outras espécies de carrapatos nos EUA já foram detectadas com *R. rhipicephali*, tais como *Dermacentor occidentalis* na Califórnia, *D. andersoni* em Montana e *D. variabilis* na Carolina do Sul (BURGDORFER et al., 1978; LANE et al., 1981; PHILIP; CASPER et al., 1981), além de estudos mostrarem que estes carrapatos são incapazes de manter esta bactéria por transmissão transovariana por mais do que uma geração (MACALUSO et al., 2002).

Os primeiros relatos no continente americano, fora dos EUA, ocorreram no Brasil em 2005, na região norte do país, no Estado de Rondônia, sendo detectado pela análise molecular em *Haemaphysalis juxtakochi* e denominada como *Rickettsia* cepa R300. Neste mesmo ano, no Estado de São Paulo, numa área de Mata Atlântica no Parque Estadual de Intervales, realizou-se uma coleta de carrapatos *H. juxtakochi*, tanto de vida livre, quanto sobre hospedeiro (*Mazama guazoubira*). No Parque Jaraguá, posteriormente foi isolado em cultivo celular *R. rhipicephali* cepa HJ#5 do carrapato *H. juxtakochi* (LABRUNA et al., 2005a; LABRUNA et al., 2007b).

No Velho Mundo, *R. rhipicephali* foi relatada em carrapatos na França, Portugal, Grécia, Croácia e República Centro-Africana (DRANCOURT et al., 1992; DUPONT; CORNET; RAOULT, 1994; BACELLAR et al., 1995; DUH et al., 2003; PSAROULAKI et al., 2003). No entanto, todos esses relatos carecem de confirmação, pois não foram comprovados por uma devida caracterização molecular que distinguisse *R. rhipicephali* de outras espécies mais próximas, tais como *R. massiliae* e *R. aeshlimmanni*.

2.6 *Rickettsia bellii*

R. bellii é amplamente distribuída nas Américas, infectando um grande número de carrapatos das famílias Ixodidae e Argasidae. Embora possa ser encontrada em diversas espécies de carrapatos, não há evidencia de infecção em humanos.

Esta bactéria foi identificada e nomeada como cepa 369-C, isolada em ovos embrionados de galinhas, a partir de um pool triturado de *D. variabilis* adultos não alimentados e coletados sobre a vegetação próxima a Fayette-Ville, Arkansas - EUA, em oito de junho de 1966 (PHILIP et al., 1983). Entretanto, este isolado de riquétsia cepa 369-C possuía antígenos distintos de outras riquétsias como determinado pela reação cruzada em teste de immunofluorescência, mas possui um ou mais antígenos que reagem com soros de camundongos imunes para febre maculosa, tifo epidêmico e pacientes com tifo murino (PHILIP et al., 1983).

Outros isolados caracterizados como *R. bellii* usando tipagem por immunofluorescência e reação em cadeia pela polimerase/ polimorfismo dos fragmentos de restrição (PCR/RFLP), têm sido relatados de várias espécies de Ixodidae e Argasidae, incluindo *D. andersoni*, *D. albopictus*, *D. occidentalis*, *H. leporispalustris*, *Ornithodoros concanensis* e *Argas cooleyi* nos EUA, nos seguintes Estados: Arkansas, California, Maryland, Monatana, North Carolina, Ohio, Oklahoma e Carolina do Sul (PHILIP et al., 1983; CAGE et al., 1994; AZAD; BEARD, 1998).

Na América Central, quatro carrapatos identificados como *A. sabanerae* coletados de uma tartaruga (*Kinosternon* sp) em San Miguel, El Salvador, foram encontrados pela análise molecular DNA de *R. bellii*, fornecendo o primeiro relato de *R. bellii* na América Central e o primeiro de uma riquétsia em El Salvador (BARBIERI et al., 2012).

Na América do Sul, *R. bellii* tem sido amplamente distribuída em diferentes biomas e espécies de carrapatos na região Neotropical, sendo digno de nota, que alguns destes carrapatos infectados têm importância na Saúde Pública, por parasitar humanos. Países que já relataram esta bactéria foram Argentina em *A. neumani* e *A. tigrinum*; Brasil, *A. aureolatum*, *A. cajennense*, *A. dubitatum*, *A. humerale*, *A. incisum*, *A. nodosum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. rotundatum*, *A. scalpturatum*, *H. juxtakochi* e *I. loricatus*; Colômbia, larvas de

Amblyomma sp e Peru com *A. varium* (LABRUNA et al., 2004a,b; HORTA et al., 2006a; PINTER; LABRUNA, 2006; LABRUNA et al., 2007b; PACHECO et al., 2008; SABATINI et al., 2010; TOMASSONE et al., 2010b; OGRZEWALSKA et al., 2012; MIRANDA; MATAR, 2013).

Como tem acontecido para outras riquétsias que tinham patogenicidade desconhecida (por exemplo: *R. parkeri*), e muito tempo depois passaram a ser consideradas como patogênicas, um estudo demonstrou que inoculação via subcutânea de *R. bellii* produziu escaras em coelhos e cobaias, sugerindo que seu potencial patogênico para humanos deveria ser futuramente estudado (OGATA et al., 2006).

2.7 "*Candidatus* Rickettsia andeanae"

Entre maio e outubro de 2002, casos febris, incluindo duas mortes, foram relatados em uma área em torno da cidade de Sapillica, no norte do Peru. Um grupo de pesquisadores com representantes do Ministério da Saúde e do Centro Médico de Pesquisa Naval Peruana do destacamento de Lima documentaram uma alta prevalência de anticorpos para as espécies de *Rickettsia* e *Leptospira* (BLAIR et al., 2004a). Amostras de DNA dos carrapatos *A. maculatum* e *I. boliviensis* foram amplificados pela PCR, as quais geraram sequências de 2484pb para o gene *ompB*. Estas amostras mostraram 97% de homologia com riquétsias próximas ao grupo da *R. massiliae*. Análises filogenéticas de quatro genes para *Rickettsia* (17-kDa, *gltA*, *ompA* e *sca4*) confirmaram que os dois isolados são pertencentes ao GFM, e que já tinha sido nomeada de "*Ca*. R. andeanae" em reconhecimento a área onde foi primeiramente detectada, que fica a 2.700m acima do nível do mar (BLAIR et al., 2004b; JIANG et al., 2005). DNA de "*Ca.* Rickettsia andeanae" foi encontrado em *R. sanguineus* na região de Piura, no Peru, por Flores-Mendoza et al. (2013).

Outros relatos foram observados na América do Sul, como a primeira evidência de carrapatos *A. parvum* infectados por uma riquétsia denominada de *Rickettsia* sp cepa Argentina e o terceiro relato dentro da ixodofauna Argentina de carrapatos infectados com *riquétsia* (PACHECO et al., 2007). Mais tarde, Tomassone et al. (2010b) coletaram carrapatos (*A. parvum, A. tigrinum* e *A. pseudoconcolor*) de vida livre, seres humanos, animais selvagens

e mamíferos domésticos em uma área rural do semi-árido Chaco argentino no final da primavera de 2006, sendo identificados uma riquétsia (*Rickettsia* sp. cepa Argentina) do GFM de patogenicidade desconhecida em *A. parvum* e *A. pseudoconcolor* pela análise molecular. Abarca et al. (2012), em novembro de 2010, coletaram três carrapatos sobre cães vivendo numa área rural de Arica, no Norte do Chile, os quais foram classificados como *A. triste*, sendo que um deles estava infectado por *Ca*. Rickettsia andeanae.

Paddock et al. (2010) relataram pela primeira vez em *A. maculatum* uma riquétsia próxima àquelas encontradas no Peru (*Ca*. Rickettsia andeanae) e Argentina (*Ca*. Rickettsia sp. cepa Argentina) pela PCR. Desde então, outros carrapatos infectados com *Ca*. Rickettsia andeanae foram identificados em Vírginia, Florida e Mississipi nos EUA em *A. maculatum* (FERRARI et al., 2013; NADOLNY et al., 2014).

Para avaliar a transmissão e a patogenicidade em vertebrados por *Ca*. R. andeanae, bem como descrever as características biológicas e cumprir os critérios para criação como uma nova espécie, a disponibilidade de um isolado estável é essencial. Até o momento, *Ca*. R. andeanae, em grande parte, continua descaracterizada por falta de um isolado estável. Entretanto, o isolamento de *Ca*. R. andeanae foi recentemente descrito em células DH82, células Vero, células de Drosophila S2 e células de ISE6 (Ixodes scapularis embrionário), mas a sua estabilidade nestas linhagens celulares não foi mostrada (LUCE-FEDROW et al., 2012; FERRARI et al., 2013).

Nieri-Bastos et al. (2014) fez o primeiro relato de "*Ca*. Rickettsia andeanae" em *A. parvum* em dois biomas do Brasil, sendo um coletado sobre cavalos no cerrado do Piauí e o outro no Pantanal, coletado sobre a vegetação. Em *A. tigrinum* coletado sobre lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no Parque Nacional da Serra da Canastra, em Minas Gerais, foi encontrado DNA desta riquétsia (ARRAIS, 2013).

2.8 *Rickettsia felis*

Atualmente, *Rickettsia felis* é um patógeno emergente pertencente às riquétsias do GTr. Descrito pela primeira vez em 1990, infecções por *R. felis* foram descritas em todo o mundo em pulgas, mamíferos e seres humanos (PEREZ-OSÓRIO et al., 2008). *R. felis* tem

sido difícil de posicionar filogeneticamente, porque exibe algumas características genotípicas e fenotípicas peculiares tanto do GT quanto do GFM, por exemplo, associação com insetos e ácaros, atividade hemolítica, motilidade à base de actina, manutenção transovariana no vetor e reatividade sorológica cruzada. Além disso, revelam características morfológicas, tais como a presença de plasmídeos e *pili* conjugativo, bem como características genéticas atípicas da maioria das riquétsias. (OGATA et al., 2005a,b).

Entre os países que primeiro relataram *R. felis* em pulgas de gatos (*Ctenocephalides felis*) estão os Estados Unidos da América (WILLIANS et al., 1992), Brasil (OLIVEIRA et al., 2002), México (ZAVALA-VELÁZQUEZ et al., 2002) e Espanha (MARQUEZ et al., 2002). Após 2002, houve um aumento no interesse por esta bactéria, após um interim de cinco anos, 28 relatos surgiram em todo o mundo (PÉREZ-OSORIO et al., 2008).

Com os crescentes relatos desta riquétsia, novos potenciais vetores infectados com *R. felis* foram descobertos, como seguem: pulgas como *C. canis*, *Anomiopsyllus nudata*, *Archaeopsylla erinacei*, *Ctenophthalmus* sp. e *Xenopsylla cheopis*; carrapatos *H. flava*, *R. sanguineus* e *I. ovatus*; e ácaros (ISHIKURA et al., 2003; STEVENSON et al., 2005; BITAM et al., 2006; CARDOSO et al., 2006; DE SOUSA et al., 2006; HORTA et al., 2006b; JIANG et al., 2006; VENZAL et al., 2006; CHOI et al., 2007).

Schriefer et al. (1994) relataram o primeiro caso humano de infecção com uma nova riquétsia da pulga do gato nos Estados Unidos, provando pela primeira vez que *R. felis* é um potencial patógeno para o ser humano. Esta infecção por *R. felis* teve manifestação clínica semelhante ao tifo murino (incluindo febre alta, mialgia e erupção cutânea). Outros países têm relatado a ocorrência de *R. felis* em humanos pelos métodos de PCR e sorologia como segue: México, Brasil, Alemanha, Tailândia, Coréia do Sul, Tunísia, Laos e Espanha (ZAVALA-VELAZQUEZ et al., 2000; RICHTERet al., 2002; PAROLA et al., 2003; CHOI et al., 2005; BERNABEU-WITTEL, et al., 2006; GALVÃO et al., 2006; PHONGMANY et al., 2006; ZNAZEN et al., 2006). No entanto, amostras viáveis de *R. felis* nunca foram isoladas de humanos enfermos, assim o papel de pulgas como vetor permanece obscuro.

2.9 *Rickettsia monteiroi*

De um espécime de *A. incisum* coletados de vida livre no bioma de Mata Atlântica, no Parque Estadual de Intervales no município de Ribeirão Grande – SP, durante o período de 2004 a 2006, foi isolado uma riquétsia com sucesso em cultivo de células Vero por meio da técnica de *shell vial*. O isolamento desta bactéria foi confirmado por microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e PCRs alvejando fragmentos dos genes *gltA*, *htrA*, *rrs* e *sca1* em células infectadas do cultivo. Após análises moleculares e filogenéticas, foi proposta uma nova espécie, designada como *Rickettsia monteiroi* em homenagem ao Rickettsiologista Dr. José Lemos Monteiro que contribuiu muito para o conhecimento da Rickettsiologia brasileira. Esta riquétsia é muito próxima a *R. canadensis* e "*Ca*. R. tarasevichiae" da América do Norte (PACHECO et al., 2011).

2.10 *Rickettsia massiliae*

Em 1992, uma espécie de riquétsia foi isolada de um ixodídeo *R. sanguineus* coletado próximo a Marselha na França, sendo posteriormente caracterizado como uma espécie distinta dentro do GFM e nomeada como *R. massiliae* (BEATI et al., 1992; BEATI; RAOULT, 1993). Entretanto, o primeiro isolado de *R. massiliae* foi realizado em 1985, quando um homem de 45 anos de idade, com febre e uma erupção cutânea, deu entrada no hospital de Palermo na Itália em seis de junho, e durante o período que ficou hospitalizado, amostra de sangue foi inoculada em garrafas contendo células Vero, sendo positiva para imunofluorescência, 7 dias depois. Esta cepa foi estocada por mais de vinte e cinco anos, e somente em 2005 foi realizada a análise molecular com identificação de *R. massiliae* (VITALE et al., 2006).

Ainda na Europa e África, esta riquétsia foi encontrada em carrapatos como *R. muhsamae*, *R. lunulatus e R. sulcatus* na República Central da África (BEATI et al., 1996), *R. sanguineus* na Grécia (BABALIS et al., 1994), *R. turanicus* em Portugal (BACELLAR et al., 1995), *R. muhsamae* coletado sobre gado, em Mali. Quatro anos depois do primeiro isolado em 1996 a partir de carrapatos, uma *R. massiliae* cepa (Bar29) foi isolada de *R. sanguineus* na

Catalonia (BEATI et al., 1996), sendo identificada também em carrapatos removidos de humanos em Castilla na Espanha (FERNANDEZ-SOTO et al., 2006), em *R. turanicus* coletados de aves em Portugal (SANTO-SILVA et al., 2006) e no sul da Suécia (BERNASCONI et al., 2002).

Em 2004, *R. massiliae* foi relatada infectando carrapatos *R. sanguineus* em Buenos Aires, Argentina (CICUTTIN et al., 2004) . Alguns anos depois, um paciente na Espanha foi diagnosticado com a doença da FM caracterizada por febre, erupção purpúrica palpável nas extremidades superiores e inferiores, e uma escara na perna direita. A análise molecular confirmou que a doença foi causada por *R. massiliae* (GARCIA-GARCIA et al., 2010) e este paciente havia recém-chegado de Buenos Aires, concluindo que ele havia se infectado na Argentina, sugerindo o primeiro caso de rickettsioses causadas por *R. massiliae* na América do Sul. Como já foi abordado acima nesta revisão, populações de *R. sanguineus* da porção sul da América do Sul são geneticamente derivadas da área do Mediterrâneo (MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2012), onde *R. massiliae* foi relatada infectando carrapatos e os seres humanos (PAROLA et al., 2008). Portanto, é possível que a distribuição de *R. massiliae* no cone sul da América do Sul seja muito mais ampla do que é atualmente conhecida.

A primeira descrição de *R. massiliae* em carrapatos na América do Norte foi em 2006, sendo detectada em *R. sanguineus* (EREMEEVA et al., 2006). Mais tarde, relatou-se a ocorrência nesta mesma espécie de ixodídeo coletado sobre cães na Califórnia e Carolina do Norte (FORNADEL et al., 2011) entretanto, a distribuição e frequência de *R. massiliae* em carrapatos na América do Norte e Centro são pobremente descritas, contudo pesquisas preliminares indicam que a sua ocorrência é esporádica e focal (GARRISON et al., 2007; WIKSWO et al., 2007; BEELER et al., 2011). Infecções humanas nunca foram confirmadas nos Estados Unidos ou na América Central (PAROLA et al., 2013).

Atualmente, do ponto de vista de saúde pública, as riquétsias do GFM de grande relevância na América Latina e Caribe são *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. massiliae* e *R. africae*, assim como uma riquétsia denominada cepa Mata Atlântica relacionada a *R. parkeri* foi diagnosticada como patogênica no Brasil nos Estados da Bahia e São Paulo (SABATINI et al., 2010; SPOLIDORIO et al., 2010). É digno de nota que outras riquétsias emergentes devem ser levadas em consideração como *R. felis*, "*Ca.* R. amblyommii" e "*Ca.* Rickettsia andeanae", para as quais não se sabe a patogenicidade para humanos.

2.11 VETORES

A maioria das espécies de *Rickettsia* está associada a carrapatos, sendo estes considerados os seus reservatórios e vetores (FOURNIER; RAOULT, 2009). O Brasil possui uma riquíssima ixodofauna devido a sua numerosa fauna silvestre. Atualmente, 65 espécies estão distribuídas em nove gêneros em duas famílias: Ixodidae e Argasidae. Todavia, carrapatos do gênero *Amblyomma* são os mais representativos com 30 espécies e muitos destes de importância para a Saúde Pública e animal (BARROS-BATTESTI et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2009; LABRUNA; VENZAL, 2009; NAVA et al., 2012; MARTINS et al., 2014; NAVA et al., 2014). Porém, mais espécies ainda estão sendo descobertas, como exemplo, carrapatos do complexo *A. maculatum* no Maranhão (COSTA et al., 2013).

No Brasil, as 21 espécies de carrapatos descritas com riquétsias são dos gêneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*: *A. aureolatum*, *A. auricularium*, *A. cajennense*, *A. calcaratum*, *A. coelebs*, *A. dubitatum*, *A. geayi*, *A. incisum*, *A. humerale*, *A. longirostre*, *A. nodosum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. parvum*, *A. rotundatum*, *A. scalpturatum*, *A. tigrinum* e *A. triste*; *H. juxtakochi*; *I. loricatus* e *R. sanguineus* (LEMOS-MONTEIRO; FONSECA; PRADO, 1932b; GOMES, 1933; LABRUNA et al., 2004a,b,c; LABRUNA et al., 2007a,b; SILVEIRA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2009; SPOLIDORIO et al., 2010; OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2010; SILVA et al., 2011; PACHECO et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011; BARBIERI, 2012; LOPES, 2012; ARRAIS, 2013; OGRZEWALSKA et al., 2013; SARAIVA et al., 2013).

A ixodofuana maranhense é pouco estudada e os trabalhos realizados relataram as seguintes espécies de carrapatos *R. sanguineus*, *R.* (*Boophilus*) *microplus*, *Dermacentor nitens* (publicado como *Anocentor nitens*), *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. parvum*, *A. dissimile*, *A. rotundatum* (GUERRA; ABREU-SILVA; SERRA-FREIRE, 2000; GUERRA; BRITO, 2004; BRITO; SANTOS; GUERRA, 2005; LOPES; ANDRADE; COSTA-JÚNIOR, 2010; FIGUEIREDO; SANTOS; GUERRA, 2010; COSTA et al., 2013; REIS et al., 2013). Recentemente, no Maranhão, a ocorrência de humanos sendo parasitados por carrapatos *A. cajennense* e *A. parvum* na região leste foram reportados (REIS et al., 2013).

2.12 HOSPEDEIROS

Os animais domésticos e silvestres estão frequentemente expostos a diferentes espécies de carrapatos, dependendo da distribuição destes no ambiente, podem possuir um papel fundamental na transmissão de bioagentes patogênicos para humanos e animais de forma excepcional (JORGE et al., 2010).

Embora a possibilidade da participação de animais silvestres no ciclo da FMMR já ter sido sugerida por Ricketts em 1909, é importante salientar que nos EUA, várias espécies de pequenos roedores foram apontados como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii*, como por exemplo: *Microtus pennsylvanicus* para *D. variabilis* na parte oriental do país (BURGDORFER; FRIEDHOFF; LANCASTER, 1966; MCDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988). Em colaboração com o Dr. Cornellius B. Philips em abril de 1937, foi enviado ao Dr. Octavio de Magalhães duas partidas de *D. andersoni* para fins de pesquisa com o agente do tifo exantemático. Este carrapato se alimentou em cobaias infectadas com sangue de um paciente com tifo exantemático (o primeiro de 1937 em Minas Gerais - MG), sendo posteriormente capaz de transmitir (por picada) o agente às cobaias, sugerindo que não há uma especificidade nos vetores para a bactéria (MAGALHÃES, 1937).

No Brasil, pela primeira vez uma amostra do agente causador da FMB a partir de um animal silvestre foi de Moreira e Magalhães em 1935. Através de um experimento, os autores conseguiram reproduzir a doença em cobaias, após inoculação de sangue colhido de um gambá *Didelphis* sp. Estes pesquisadores, utilizando a técnica de diagnóstico indireto de Weil-Felix, listaram como prováveis reservatórios do agente da FMB, o gambá (*D. aurita*), o cão (*Canis familiaris*), o cachorro do mato (*Dusicyon* sp - Sin. *Canis brasiliensis*), o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis* - Sin. *Sylvilagus minensis*), o preá (*Cavia aperea*), a cutia (*Dasyprocta azarae*), capivara (*Hydrochaerus hydrochaerus*) e as aves, que de acordo com seus trabalhos podem albergar o vírus do tifo exantemático (MOREIRA; MAGALHÃES, 1937; TRAVASSOS; VALLEJO, 1947; MAGALHÃES, 1957).

Outros hospedeiros que devem ter especial atenção são as aves, porque podem transportar agentes patogênicos zoonóticos, tanto como hospedeiro reservatório quanto por dispersão de carrapatos infectados. Além disso, a migração de aves pode fornecer um

mecanismo de novos focos endêmicos de doença a grandes distâncias de onde uma infecção foi adquirida (HOOGSTRAAL, 1961; SMITH et al., 1996; ELFVING et al., 2010; HILDEBRANDT et al., 2010). No Brasil, as aves já tinham sido apontadas como papel importante na FMB desde a década de 30. Estudos com aves têm demonstrado carrapatos infectados com riquétsias (OGRZEWALSKA et al., 2008).

A importância do cão como reservatório para FM vem sendo estudada desde 1930 com os trabalhos realizados por Durand (1930) sobre a FMM para *R. conorii*. Levin, Killmaster e Zemtsova (2012) demonstraram que os cães são capazes de adquirir *R. conorii* a partir de carrapatos *R. sanguineus* infectados, assim como competentes hospedeiros em transmitir a riquétsia para *R. sanguineus* não infectados, confirmando pela primeira vez que os cães são realmente reservatórios competentes para *R. conorii*.

Cães domésticos que foram infectados com *R. conorii israelenses* permaneceram infectantes para os carrapatos durante pelo menos 3 semanas, enquanto que cães previamente infectados quer com *R. massiliae* ou *R. conorii* teve a sua competência, como reservatório da riquétsia, significativamente diminuída. No entanto, nem a imunização homóloga nem heteróloga afetou significativamente a eficiência da transmissão *R. conorii* entre ninfas infectadas e larvas não infectadas pela co-alimentação (LEVIN et al., 2013).

No continente Americano, os relatos da doença induzida por *R. rickettsii* em cães têm sido restritas para os Estados Unidos, onde as seguintes anormalidades clínicas observadas foram febre, letargia, anorexia, prostração, petéquias cutâneas e equimoses, epistaxe, conjuntivite, corrimento ocular, linfadenopatia, diarréia, perda de peso, desidratação e envolvimento do sistema nervoso central (paralisia, ataxia e síndrome vestibular), anormalidades hematológicas incluindo anemia, trombocitopenia e leucopenia moderada no início da febre seguida de leucocitose (KEENAN et al., 1977a,b; BREITSCHWERDT et al., 1988; COMER, 1991).

O papel do cão no tifo exantemático neotrópico do Brasil foi pela primeira vez destacado e apontado realmente como digno de atenção, a partir das observações feitas entre 1935 a 1937 através de títulos relativamente altos pela técnica de Weil-Felix em cães suspeitos nos focos da doença (MAGALHÃES, 1957). Posteriormente, Piranda et al. (2008), relataram em seus resultados que os cães infestados por carrapatos infectados com a *R. rickettsii* cepa Taiaçu, apresentaram sinais clínicos como anorexia, febre, letargia, além de

riquetsemia, sugerindo que a *R. rickettsii* é patogênica para os cães, além de permanecerem com títulos de 4096 por um período de 6 meses. Um ano depois, a doença clínica foi descrita por Labruna et al. (2009) a partir da confirmação dessa enfermidade em dois animais naturalmente infectados procedentes do município de Itu, área endêmica para FMB no Estado de São Paulo.

Ao se investigar os cães domésticos como possíveis animais envolvidos na epidemiologia da FMB, observa-se que eles, além de fornecer uma ponte para bioagentes patogênicos entre ambientes naturais e antrópicos (QUEIROGAS et al., 2010), podem atuar como sentinela para estudos epidemiológicos, uma vez que cães com sorologia positiva têm sido frequentemente registrados em regiões endêmicas (PADDOCK et al., 2003; SANGIONI et al., 2005; PINTER et al., 2008).

Muitos estudos sobre a soroprevalência para *R. rickettsii* em cães em determinadas áreas geográficas se aproxima da encontrada em seres humanos (BREITSCHWERDT et al., 1987). Desta forma, vários estudos têm sido realizados em diferentes Estados do Brasil para investigar evidências de anticorpos anti-*Rickettsia* em cães como no Maranhão, Mato Grosso e São Paulo (PINTER et al., 2008; COSTA, 2011; MELO et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2012).

3 **OBJETIVOS**

Com o intuito de conhecer melhor a epidemiologia de *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do Estado do Maranhão, o presente estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- Determinar e comparar a ocorrência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em cães de áreas urbanas e rurais de oito municípios, compreendendo as cinco mesoregiões geopolíticas que compõe o Estado do Maranhão;
- Determinar a ocorrência de carrapatos em cães de áreas urbanas e rurais do Estado do Maranhão;
- Detectar a infecção por *Rickettsia* spp em carrapatos colhidos de cães de áreas urbanas e rurais do Estado do Maranhão;
- Determinar fatores de risco para infecção por *Rickettsia* spp em cães de áreas urbanas e rurais do Estado do Maranhão.

4 **MATERIAL E MÉTODOS**

4.1 ÁREA DE ESTUDO

O Estado do Maranhão possui cinco mesorregiões geopolíticas: Norte, Sul, Leste, Oeste e Centro Maranhense, sendo subdivididas em 21 microrregiões geográficas, compreendendo um total de 217 municípios com diferentes ecossistemas. O Estado situa-se numa zona de transição dos climas semi-áridos do interior do Nordeste para os superúmidos equatoriais da Amazônia que, em virtude dessa posição, possui condições edafoclimáticas com grande variabilidade, proporcionando o surgimento de diversos ecossistemas que vão desde ambientes salinos, com presença de manguezais, vegetação secundária, grandes áreas com babaçuais, até vegetação de grande porte com características do sistema amazônico. O Maranhão apresenta uma temperatura média anual, umidade relativa do ar e precipitação pluviométrica de 26,2°C, 70 a 85% e 1000 a 2500 mm, respectivamente (MARANHÃO, 2002).

O estudo abrangeu os seguintes ecossistemas (município e região do Estado em parênteses) do Estado do Maranhão (Figura 1):

-Amazônia ou Floresta Equatorial (Açailândia, oeste);

-Cerrado (Balsas, sul; Grajaú, centro; São Domingos, leste);

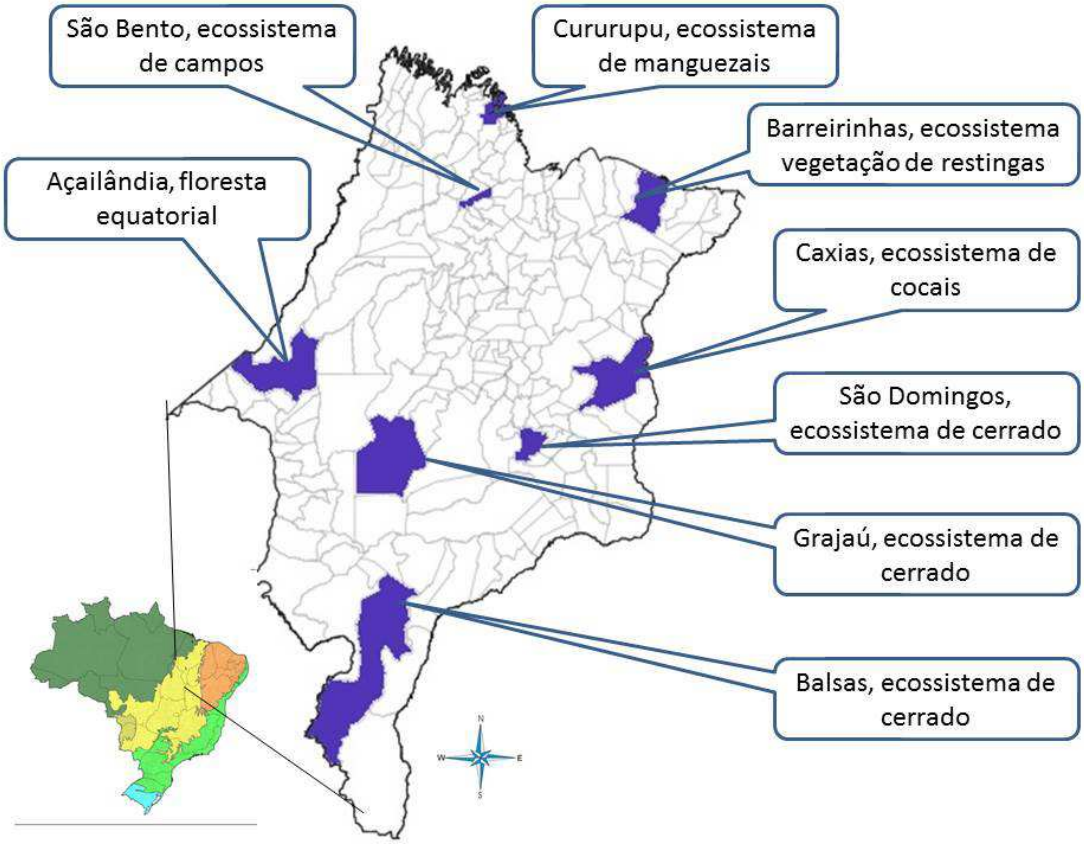
-Manguezal (Cururupu, norte);

-Restinga (Barreirinhas, norte);

-Baixada Maranhense ou Campos Alagados (São Bento, norte);

-Mata dos Cocais (Caxias, leste).

Figura 1 - Mapa da localização geográfica dos municípios de Açailândia, Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento e São Domingos do Maranhão



Fonte: (COSTA, F. B., 2014).

4.2 AMOSTRAGEM, QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO E COLETA DE MATERIAIS

4.2.1 **Amostragem**

A quantidade de animais amostrados foi obtida por conveniência em áreas urbanas e rurais com uma meta de 50 cães/dia. Para fins de comparação, foram amostrados cães da área rural, distante pelo menos 10 km da sede da cidade e cães pertencente à área urbana, sem nenhuma escolha prévia para os bairros amostrados. Os municípios escolhidos para participar no estudo apresentavam uma estrutura mínima para o armazenamento e processamento das amostras no final do dia de cada etapa da coleta e, no mínimo, uma cidade por ecossistema.

Os cães foram amostrados em três momentos, totalizando 1560 animais. A primeira amostragem foi de julho a agosto de 2011 com um total de 600 cães, em Balsas (100 cães urbanos e 100 cães rurais), Grajaú (100 urbanos e 100 rurais), Barreirinhas (50 urbanos e 50 rurais) e São Bento (50 urbanos e 50 rurais). A segunda e terceira coletas foram realizadas em colaboração com outro projeto de pesquisa de doutorado com cães, aprovado pelo comitê de Ética da FMVZ/USP, como segue a descrição abaixo. Segunda coleta foi da metade do mês de agosto ao início de setembro de 2012 com 480 cães: São Bento (71 cães urbanos e 89 rural), Cururupu (105 urbanos e 55 rurais) e Caxias (59 urbanos e 101 rurais). A terceira coleta foi em agosto de 2013 com 480 cães: Açailândia (116 cães urbanos e 44 rurais), São Domingos (86 urbanos e 74 rurais) e Barreirinhas (160 rurais e nenhum da área urbana). Estes períodos do ano (julho a setembro) foram selecionados por causa das melhores condições das estradas das zonas rurais, além de ser o período de alta atividade das ninfas de *A. cajennense* no Brasil (LABRUNA et al., 2002; BRITES-NETO et al., 2013).

O tamanho mínimo da amostra de cães por município teve como base de cálculo 95% grau de confiança com 6.2% de probabilidade de erro. A população de cães foi estimada a partir de 10% da população humana por município. A prevalência esperada usada foi de 18.9%, obtida num inquérito sorológico para *Rickettsia* spp em cães da microrregião de Chapadinha, Estado do Maranhão (COSTA, 2011). Para isso, foi utilizada a fórmula de estimativa de proporções (THRUSFIELD, 2007): $P = 1{,}96^2$ (Pesp (1 – Pesp)/E^2, em que: Pesp = prevalência esperada; E = erro esperado.

4.2.**2 Questionário epidemiológico**

Os proprietários assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido declarando que foi informado a respeito dos procedimentos a serem realizados. Concomitante aos procedimentos de coleta dos carrapatos e do sangue dos cães foi aplicado um questionário epidemiológico (Apêndices A) para o levantamento de dados sobre o animal (ambiente – zona urbana ou rural, sexo, raça, idade, presença de carrapatos, acesso à mata e atividade de caça).

4.2.3 **Coleta de materiais – carrapatos e sangue**

Todos os 1560 cães amostrados neste estudo foram submetidos à inspeção para presença de carrapatos e coleta de sangue venoso. Durante a coleta de sangue, os cães foram inspecionados para verificar se estavam infestados por carrapatos, os quais foram coletados manualmente, numerados e acondicionados em frascos individuais por hospedeiro amostrado. Não houve durante a coleta dos Ixodídeos um tempo fixo para cada animal amostrado, devido ao temperamento do cão e a disponibilidade do proprietário na contenção dos mesmos. Posteriormente, no final de cada etapa de coleta por município, os carrapatos foram enviados vivos em frascos vedados com pano dentro de um caixa de isopor úmida (para mantê-los vivos) ao Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Os que morreram foram acondicionados em frascos com álcool 96%. As identificações taxonômicas dos carrapatos seguiram as chaves taxonômicas de Aragão e Fonseca (1961), Onofrio et al. (2006) e Martins et al. (2012).

Para realização do teste sorológico, as amostras de sangue foram coletadas em tubos de polipropileno sem anticoagulante devidamente numerado de acordo com cada animal, através da punção das veias cefálica ou jugular e conservada à temperatura ambiente até o término da coleta. Em seguida, no final do dia, realizou-se a centrifugação das amostras com recuperação dos soros em microtubos de 1,5 mL devidamente identificados e mantidos congelados até processamento laboratorial.

4.3 DIAGNÓSTICO DIRETO - PESQUISA DE RIQUÉTSIA EM CARRAPATOS

4.3.1 **Teste de Hemolinfa**

Os carrapatos adultos que chegaram vivos ao laboratório foram submetidos ao teste de hemolinfa para uma triagem, que permite identificar organismos morfologicamente compatíveis com o gênero *Rickettsia* nas células da hemolinfa dos carrapatos (BURGDORFER, 1970). Para cada carrapato, a porção distal de uma das pernas dianteiras foi cortada com tesoura e uma a duas gotas de hemolinfa foram colhidas em lâminas de vidro de 12 poços, previamente limpas e desengorduradas, sendo um poço para cada carrapato. Após este procedimento, os carrapatos foram acondicionados individualmente em microtubos de 1,5ml e mantidos congelados a -80°C. As lâminas foram fixadas à temperatura ambiente e coradas com corantes fucsina e verde malaquita através do método de Giménez (1964). Posteriormente, as lâminas foram examinadas ao microscópio óptico com aumento de 1000x com óleo de imersão.

4.3.2 **Técnica de isolamento em "Shel-vial"**

Carrapatos positivos e negativos ao teste de hemolinfa foram descongelados para tentativas de isolamento de *Rickettsia* em cultura de células Vero pela técnica de "shell vial", conforme descrito por Espejo-Arenas (1989) e Marrero e Raoult (1989) sendo adaptada por Labruna et al. (2004c). Para isto, cada carrapato foi imerso por 10 minutos em álcool iodado e posteriormente lavados em água estéril em abundância. Em seguida, os carrapatos foram triturados individualmente com pinças e tesouras estéreis em microtubos de 1,5mL contendo 0,6mL de meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion). Posteriormente, o homogenizado foi aspirado com seringa de insulina e 250 µL foram inoculados em monocamada de células Vero (linhagem celular derivada do rim de macaco verde africano) presentes no fundo de dois tubos do tipo "Shell vial" para cada amostra, os quais foram centrifugados a 700 *g* por uma 1h a 22ºC. Após esta etapa, a monocamada de células Vero foi lavada adicionando-se 1 mL de meio "Minimum Essential Medium" (MEM, Gibco) contendo 5% de soro de terneiro bovino e aspirando-o gentilmente. Finalmente, Foi adicionado em cada tubo 1mL de MEM contendo 5% de soro de terneiro bovino e 1% de solução comercial de penicilina/estreptomicina com anfotericina B, com posterior incubação em estufa a 28°C.

Após três dias, o meio com antibiótico foi retirado e substituído por meio sem antibiótico, sendo o meio antigo checado para riquétsias. A cada três dias, amostra do meio

contendo células em suspensão foi observada para verificar a presença de estruturas compatíveis com riquétsias, através da coloração de Gimenez (GIMENEZ, 1964).

Quando estruturas compatíveis com riquétsias foram observadas, as células do fundo do tubo foram raspadas com a ponta de uma pipeta e inoculadas em uma garrafa de 25 cm^2, também contendo monocamada de células Vero, na tentativa de estabelecer o isolado em laboratório. Quando negativos, os tubos continuavam incubados, sendo examinados a cada três dias, até que a monocamada estivesse naturalmente destruída.

Após cada carrapato ter sido triturado e inoculado em células Vero, na etapa previamente descrita, uma alíquota desta suspensão, contendo o remanescente do carrapato, foi submetida à extração de DNA e PCR conforme descrito abaixo para os demais carrapatos.

4.3.3 **Extração de ácidos nucléicos (DNA)**

Os carrapatos mantidos em álcool a 96% e os com resultados negativos no teste de hemolinfa foram secados em temperatura ambiente e descongelados, respectivamente. A extração de DNA foi realizada de acordo com o protocolo Isotiocianato de Guanidina (GT) previamente modificado (CHOMKZYNSKI, 1993). Neste caso, cada carrapato foi colocado em um microtubo contendo 150 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7,4) e triturado com ponteira queimada, após sofrer pequenos furos através de uma agulha estéril. Em seguida, foi homogeneizado no vortex por 10 segundos e centrifugado por seis segundos. Foi então adicionado 450 µL de Isotiocianato de Guanidina e incubado por 10 minutos em temperatura ambiente homogeneizando brevemente no vortex a cada dois minutos. Posteriormente, 100 µL de clorofórmio foram acrescentados, fazendo a inversão deste por algumas vezes e deixando descansar por dois minutos. O microtubo foi então centrifugado a 12.000 *g* por cinco minutos para separar a fase aquosa, a qual foi pipetada e transferida para outro microtubo previamente identificado. Foram incorporados à fase aquosa 600 µL de isopropanol com posterior incubação a -20ºC de duas a 18 horas. Na etapa seguinte, o microtubo foi centrifugado a 12.000 *g* a 4ºC por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 800 µL de etanol a 70%. Novamente o microtubo foi centrifugado a 12.000 *g* por cinco minutos a 4ºC, o sobrenadante foi desprezado e o pellet no microtubo aberto ficou secando a 56ºC por 15 minutos no termobloco. O pellet foi ressuspendido em TE,

de 30-60 µL de acordo com a necessidade, sendo incubado novamente, porém com o microtubo fechado, a 56ºC por 15 minutos no termobloco. O microtubo contendo DNA foi armazenado a -20ºC até sua utilização na PCR.

4.3.4 **Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)**

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

O gene da proteína externa de membrana 190-kDa (*ompA*), presente apenas nas riquétsias do GFM, foi utilizado para a confirmação do agente nas amostras positivas na primeira reação, empregando-se oligonucleotídeos iniciadores Rr190.70 e Rr190.602 e/ou Rr190.70 e Rr190.701 que amplificam fragmentos de aproximadamente 532pb e/ou 632pb, respectivamente (REGNERY et al., 1991; ROUX; FOURNIER; RAOULT, 1996; FOURNIER; ROUX; RAOULT, 1998). Para cada reação eram utilizados controles negativos (água MilliQ livre de DNA) e positivos (*Rickettsia parkeri* cepa NOD). Os oligonucleotídeos iniciadores ("primers") estão representados no quadro 1.

Quadro 1 - Lista dos primers utilizados nas reações da PCR para a identificação das riquétsias nos carrapatos e nos isolados em cultivo celular

Gene alvo e pares de primers	**Especificidade**	**Sequência dos primers (5' → 3')**	**Fragmento amplificado (pb)**	**Referência**
gltA CS-78 CS- 323	Gênero *Rickettsia*	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401	Labruna et al., 2004b
ompA Rr 190.70 Rr 190.602	Grupo da Febre Maculosa	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	532	Regnery et al., 1991
ompA Rr 190.70 Rr 190.701	Grupo da Febre Maculosa	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	632	Roux et al., 1996
ompB 59 807	Gênero *Rickettsia**	CCGCAGGGTTGGTAACTGC CCTTTTAGATTACCGCCTAA	820	Roux; Raoult, 2000
htrA 17K5 17K3	Gênero *Rickettsia*	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA TGTCTATCAATTCACAACTTGCC	549	Labruna et al., 2004c

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

A reação de amplificação para o gene *gltA* foi realizada em microtubos de 200µL adicionando 2,5µL de DNA extraído acrescido de 22,5µL de Mix (12,6µL de água de miliqui;

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

Dos isolados de riquétsia foi feita a extração de DNA seguida de caracterização molecular. Para isto, uma alíquota de células Vero infectadas da terceira passagem do isolado foi submetida à extração de DNA, técnica de PCR e seqüenciamento gênico dos fragmentos amplificados, visando caracterizar a espécie de *Rickettsia* isolada. Neste caso, foram utilizados os mesmos primers descritos no quadro 1, visando amplificar fragmentos dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB* (LABRUNA et al., 2004a,b).

4.3.5 **Eletroforese**

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

4.3.6 **Purificação e Sequenciamento**

Os produtos da PCR foram purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation), que consiste em Exonuclease I (*Exo* I) para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Para tal, em microtubo identificado colocou-se 4 µL de ExoSAP e adicionou-se 10 µL da amostra amplificada na PCR, em seguida as amostras foram colocadas no termociclador, nas temperaturas de 37°C por 15 minutos e 80°C por mais 15 minutos.

Após a purificação os nucleotídeos estavam prontos para serem utilizados na reação de seqüenciamento com o kit comercial BigDye TM Terminator (Perkin Elmer) de acordo com especificações do fabricante: 5µL de DNA purificado – concentração máxima de 100 ng, 1µL de água MilliQ, 1 µL de "Big Dye", 1µL de oligonucleotídeos iniciadores específicos senso e anti-senso (5 pmoles/µL), e 2 µL de buffer. As amostras foram seqüenciadas em sequenciador automático modelo ABI 377 (Applyed Biosystem, Foster, CA), disponível no Departamento da FMVZ/USP.

4.3.7 **Análise das sequências**

As sequências obtidas foram editadas no computador usando o programa SeqMan (Lasergene, DNAstar, Madison, Wis.), e submetidas a analise de similaridade através do programa Basic Local Alignment Search Tool (*BLAST two sequences analysis)* (ALTSCHUL et al., 1990) para verificar homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank, e desta forma, efetuar a identificação genética dos produtos amplificados nas amostras testadas.

4.3.8 **Frequência de carrapatos infectados**

Após os resultados da técnica de PCR, seqüenciamento gênico e dos dados moleculares dos isolados obtidos dos carrapatos em células Vero pela técnica Shell-vial foi determinada a freqüência de carrapatos infectados por região amostrada.

4.4 DIAGNÓSTICO INDIRETO - PESQUISA DE ANTICORPOS PARA RIQUÉTSIA NOS SOROS DOS CÃES

4.4.1 **Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)**

Os soros caninos foram descongelados em temperatura ambiente e processadas para RIFI usando lâminas de antígeno produzidas no laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP para cinco riquétsias isoladas no Brasil: *R. rickettsii* cepa Taiaçu (PINTER; LABRUNA, 2006), *R. parkeri* cepa At24 (SILVEIRA et al., 2007), "*Ca.* R. amblyommii" cepa Ac37 (LABRUNA et al., 2004c), *R rhipicephali* cepa HJ5 (LABRUNA et al., 2005a) e *R. bellii* cepa Mogi (PINTER; LABRUNA, 2006), seguindo protocolo previamente descrito por Horta et al. (2004). Em cada lâmina, soros conhecidamente negativos e positivos foram utilizados como controles. Os soros reativos na diluição 1:64 para qualquer espécie de riquétsia foram testados em diluições seriadas (1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048...) para determinação do título final de reatividade. Os soros que demonstraram para uma determinada espécie de riquétsia um título quatro vezes maior que para as demais espécies testadas, foi considerado homólogo para a primeira espécie de riquétsia, conforme padrões previamente definidos (HORTA et al. 2004).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir das informações obtidas no questionário epidemiológico foram realizadas análises descritiva e analítica dos dados. Regressão logística foi realizada com os resultados da sorologia dos cães. Todas as análises foram realizadas usando SPSS Statistics versão 17.

As variáveis foram coletadas de forma qualitativa como ambiente em que vivem (zona urbana ou zona rural), idade (≤ 1 ano ou > 1 ano), sexo, raça (com raça definida ou sem raça definida), animais de caça (sim ou não), proximidade de mata (sim ou não), presença de carrapatos (*R. sanguineus* ou outra espécie). As frequências das variáveis foram comparadas em função de quatro possíveis variáveis dependentes: sorologia positiva ou negativa para alguma das cinco riquétsias testadas, sorologia positiva com título de 64, 512 e 4 vezes para "*Ca.* R. amblyommii". Cada variável independente foi comparada quanto à frequência de ocorrência das variáveis dependentes através do teste de qui-quadrado ou teste exato de Fisher, quando necessário.

As variáveis que apresentaram níveis de significância menores que 20% ($p<0,20$) quando comparadas com a sorologia positiva nos diferentes critérios, foram submetidas a uma análise múltipla, de regressão logística, pelo método *forward selection*. Foram criados quatro modelos, um para cada variável dependente. Em todos os modelos, foram mantidas apenas as variáveis que apresentaram níveis de significância menores que 5% ($p<0,05$). As variáveis que, ao serem adicionadas ao modelo, ocasionaram mudanças maiores que 10% no beta de alguma das demais variáveis foram excluídas.

4.6 COLETAS ADICONAIS DE CARRAPATOS

Com o intuito de obter carrapatos adultos de *A. cajennense* s.l. para isolamento de *Rickettsia,* coletas extras foram realizadas em suínos (agosto de 2013) e equinos (julho de 2011) naturalmente parasitados no muncípio de Viana (Baixada Maranhense) e Balsas (Cerrado), respectivamente. Os carrapatos foram trazidos vivos e submetidos à técnica de shell vial para isolamento de *Rickettsia* em células Vero, conforme descrito acima.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO CANINA DA ZONA URBANA E RURAL DE OITO MUNICÍPIOS DO MARANHÃO

A população canina da área urbana e rural dos oito municípios amostrados foi caracterizada segundo sexo, idade, raça, proximidade de mata, acesso à rua, atividade de caça, uso de carrapaticida, vacinação e vermifugação (Tabela 1).

Do total de animais, 919 cães eram machos (58,9%), 394 (42,9%) da zona urbana e 525 (57,1%) da zona rural e 641 fêmeas (36,2%), sendo 298 (46,5%) da zona rural e 343 (53,5%) da zona urbana. Verificou-se que há diferenças significativas em relação à proporção macho e fêmea. Quanto à faixa etária, 89 (5,7%) da população canina apresentava idade inferior ou igual a 1 ano, distribuídos da seguinte forma: 47 (52,8%) e 42 (47,2%) das zonas urbana e rural, respectivamente. Os animais com idade acima de um ano constituíam 1471 (94,3%) indivíduos, sendo 690 (46,9%) para área urbana e 781 (53,1%) para área rural. Observou-se quanto ao tipo racial que sete (0,4%) cães tinham raças definidas (CRD), sendo três na zona urbana e quatro na zona rural, entretanto a maioria dos cães eram sem raça definida (SRD), totalizando1553 (99,6%), com 734 (47,3%) na zona urbana e 819 (52,7%) na zona rural.

Em relação aos cães que vivem próximos a mata, foi verificada que 1005 (64,4%) pertenciam a este grupo, com 199 (19,8%) na área urbana e 806 (80,2%) na área rural, e 555 (35,6%) dos cães não viviam próximos a mata, com 538 (96,9%) na zona urbana e 17 (3,1%) na zona rural. Com relação ao acesso a rua, um total de 1199 (76,9%) tinham livre acesso a rua, sendo 564 (47%) na área urbana e 635 (53%) na área rural, e 361 (23,1%) dos cães eram domiciliados, sendo 173 (52,3%) da zona urbana e 188 (52,1%) da zona rural.

Quanto à atividade de caça, 213 (13,7%) dos cães exerciam essa atividade, sendo 32 (15%) viviam na área urbana e 181 (85%) na área rural, diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) dos animais da zona urbana. Observou-se que na zona rural, os proprietários recorriam à

caça por motivos econômicos como alternativa de alimentação ou lazer, onde os cães geralmente os acompanhavam.

Quanto aos cuidados que os proprietários tinham com seus animais de estimação, foi perguntado em relação ao tratamento dos cães com carrapaticida. Em 262 (61,1%) cães urbanos e 167 (38,9%) rurais, foi utilizado algum tipo de carrapaticida, totalizando 429 (27,5%) cães. Para os animais vacinados, 545 (51,7%) eram da área urbana e 510 (48,3%) da área rural. Quanto aos cães vermifugados, 236 (55,7%) eram de área urbana e 188 (44,3%) eram de área rural, totalizando 424 cães vermifugados (27,2%). Em relação aos cuidados de saúde dos animais, observa-se diferenças estatísticas dentro de cada grupo como tratamento carrapaticida, vacinação e vermifugação dos cães.

Tabela 1 - Caracterização da população canina das áreas urbana e rural de oito municípios do Estado do Maranhão

Variável		Urbana		Rural		Total		x^2	P
		N	%	N	%	N	%		
Sexo	Fêmea	343	53,5	298	46,5	641	36,2	a	< 0,05
	Macho	394	42,9	525	57,1	919	58,9		
Idade (ano)	≤ 1	47	52,8	42	47,2	89	5,70	-	> 0,05
	> 1	690	46,9	781	53,1	1471	94,3		
Raça	Não	734	47,3	819	52,7	1553	99,6	-	>0,05
	Sim	3	42,9	4	57,1	7	0,40		
Próximo à mata	Não	538	96,9	17	3,1	555	35,6	a	<0,01
	Sim	199	19,8	806	80,2	1005	64,4		
Acesso á rua	Não	173	47,9	188	52,1	361	23,1	-	>0,05
	Sim	564	47	635	53	1199	76,9		
Caça	Não	705	52,3	642	47,7	1347	86,3	a	<0,01
	Sim	32	15	181	85	213	13,7		
Carrapaticida	Não	475	42	656	58	1131	72,5	a	<0,01
	Sim	262	61,1	167	38,9	429	27,5		
Vacinados	Não	192	38	313	62	505	32,4	a	<0,01
	Sim	545	51,7	510	48,3	1055	67,6		
Vermífugos	Não	501	44,1	635	55,9	1136	72,8	a	<0,01
	Sim	236	55,7	188	44,3	424	27,2		

a- Teste exato de Fischer; ≤ menor ou igual e > maior; N número de animais

5.2 CARRAPATOS

Um total de 959 carrapatos foi coletado de 150 cães de oito municípios do Estado do Maranhão. As frequências de ocorrências das espécies são: *R. sanguineus*, a espécie mais representativa com 652 (68%) espécimes distribuídos segundo os estágios: 307 machos, 252 fêmeas, 88 ninfas e cinco larvas; *A. cajennense*, a mais representativa do gênero, com 124 (12,9%) espécimes distribuídos em 13 machos, 12 fêmeas e 99 ninfas; 88 *A. parvum* (9,2%), sendo 17 machos, 68 fêmeas e três ninfas; 50 *A. ovale* (5,2%) distribuídos em 14 machos e 36 fêmeas; 29 (3%) larvas de *Amblyomma* sp; nove *A. oblongoguttatum* (0,9%), sendo dois machos e sete fêmeas; um (0,1%) fêmea de *A. rotundatum* que estava andando sobre o corpo do cão; cinco (0,5%) fêmeas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* e uma (0,1%) ninfa de *H. juxtakochi* (Tabela 2).

Tabela 2 - Ocorrência de carrapatos em cães das áreas urbanas e rurais de oito municípios do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil

Espécie	Estágios									
	Macho		Fêmea		Ninfas		Larvas		Total	
	N	%	n	%	n	%	n	%	N	%
R. sanguineus	307	47,1	252	38,6	88	13,5	5	0,8	652	68,0
A. cajennense	13	10,5	12	9,7	99	79,8	0	0	124	12,9
A. parvum	17	19,3	68	77,3	3	3,4	0	0	88	9,2
A. ovale	14	28	36	72	0	0	0	0	50	5,2
Amblyomma sp	0	0	0	0	0	0	29	100	29	3,0
A. oblongoguttatum	2	22,2	7	77,8	0	0	0	0	9	0,9
A.rotundatum	0	0	1	100	0	0	0	0	1	0,1
R. (*B*) *microplus*	0	0	5	100	0	0	0	0	5	0,5
H. juxtakochi	0	0	0	0	1	100	0	0	1	0,1
Total	353	36,8	381	39,7	191	19,9	34	3,5	959	100

n número de carrapatos; *R. Rhipicephalus*; *A. Amblyomma*; *H. Haemaphysalis*; (*B*) *Boophilus*

Um total de 150 (9,6%) dos 1560 cães amostrados estava infestado por carrapatos, sendo 45/737 (6,1%) cães de áreas urbanas e 105/823 (12,8%) de áreas rurais, apresentando diferenças significativas ($p<0.05$). Os municípios de Açailândia e Caxias foram os únicos que apresentaram diferenças significativas ($p<0,05$), onde nas áreas rurais, as ocorrências de cães infestados foram maiores do que nas áreas urbanas (Tabela 3).

Tabela 3 - Ocorrência de cães infestados por carrapatos das áreas urbanas e rurais de oito municípios do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil

Municípios	Nº de Cães Infestados						
	Área urbana		Área rural		Total		
	N/Nt	%	N/Nt	%	N/Nt	%	P
Açailândia	1/116[a]	0,9	12/44[b]	27,3	13/160	8,1	<0,05
Balsas	16/100[a]	16	16/100[a]	16	32/200	16	>0,05
Barreirinhas	10/50[a]	20	40/210[a]	19	50/260	19,2	>0,05
Caxias	1/59[a]	1,7	11/101[b]	10,9	12/160	7,5	<0,05
Cururupu	10/105[a]	9,5	9/55[a]	16,4	19/160	11,9	>0,05
Grajaú	2/100[a]	2	8/100[a]	8	10/200	5	>0,05
São Bento	4/121[a]	3,3	8/139[a]	5,7	12/260	4,6	>0,05
São Domingos	1/86[a]	1,2	1/74[a]	1,4	2/160	1,3	>0,05
Total	45/737[a]	6,1	105/823[b]	12,8	150/1560	9,6	<0,05

Números seguidos por letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

N: Número de cães infestados; Nt: Número total de cães.

As infestações pelos carrapatos do gênero *Amblyomma* foram mais frequentes na zona rural, onde o *A. cajennense* foi mais significativo (p<0,05), apesar de também ter sido encontrado em áreas urbanas. Entretanto, *A. oblongoguttatum*, *A. parvum*, *A. rotundatum* e larvas de *Amblyomma* sp foram coletados sobre os cães somente em área rural, sendo que *A. rotundatum* não estava fixado sobre o corpo do cão. *A. ovale* foi coletado tanto de ambiente rural quanto urbano, porém estes animais que se encontravam infestados na área urbana eram cães que praticavam atividade de caça. Outros gêneros foram coletados, como *Haemaphysalis* representado pela espécie *Haemaphysalis juxtakochi* coletado na área rural e *Rhipicephalus* subgênero *Boophilus*, este último encontrado nas duas áreas (Tabela 4).

Tabela 4 - Ocorrência de carrapatos coletados sobre os cães das áreas urbanas e rurais de oito municípios do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil

Ectoparasitos	Cães					
	Urbano		Rural		Total	
	+/Exposto	%	+/Exposto	%	+/Exposto	%
R. sanguineus	35/737[a]	4,7	66/823[b]	8	101/1560	6,5
A. cajennense	2/737[a]	0,3	22/823[b]	2,7	24/1560	1,50
A. ovale	10/737[a]	1,4	13/823[a]	1,60	23/1560	1,50
A. oblongoguttatum	-	-	3/823	0,40	3/1560	0,20
A. parvum	-	-	28/823	3,40	28/1560	1,80
Amblyomma sp	-	-	3/823	0,40	3/1560	0,20
A. rotundatum	-	-	1/823	0,10	1/1560	0,06
H. juxtakochi	-	-	1/823	0,10	1/1560	0,06
R. (*B*) *microplus*	1/737[a]	0,10	1/823[a]	0,10	2/1560	0,01

Números seguidos por letras diferentes, na mesma linha, diferem estatisticamente entre si (p<0,05).

R. Rhipicephalus; *A. Amblyomma*; *H. Haemaphysalis*; (*B*) *Boophilus*; + Animais infestados.

A frequência de infestação de cães somente pelo *R. sanguineus* foi maior nas áreas rurais do que nas áreas urbanas com diferenças estatísticas ($p<0,05$) (Tabela 4). Porém, infestações mistas (dupla) de *R. sanguineus* com mais uma espécie de carrapato foram identificadas associações com *A. cajennense*, *A. parvum*, *A. ovale*, *A. oblongoguttatum* ou *R.* (*B*) *microplus*. Associações de *R. sanguineus* com duas espécies (infestação tripla) foram observadas com *A. cajennense* e *A. ovale*, *A. cajennense* e *A. oblongoguttatum*, *A. cajennense* mais larvas de *Amblyomma* sp, ou com *A. parvum* mais larvas de *Amblyomma* sp., mostrando que *R. sanguineus* está intimamente relacionado com área rural, onde condições favoráveis nas residências beneficiam o desenvolvimento do *R. sanguineus*. Pode-se constatar associações somente entre o gênero *Amblyomma*, como *A. cajennense* mais *A. ovale* em cães infestados na área urbana, ou com infestação tripla, *A. cajennense* mais *A. ovale* e larvas de *Amblyomma* sp., e finalmente uma associação dupla de *A. parvum* mais *H. juxtakochi*, conforme Tabela 5.

Tabela 5 - Infestação simples e mista por carrapatos em cães das áreas urbanas e rurais de oito municípios do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil

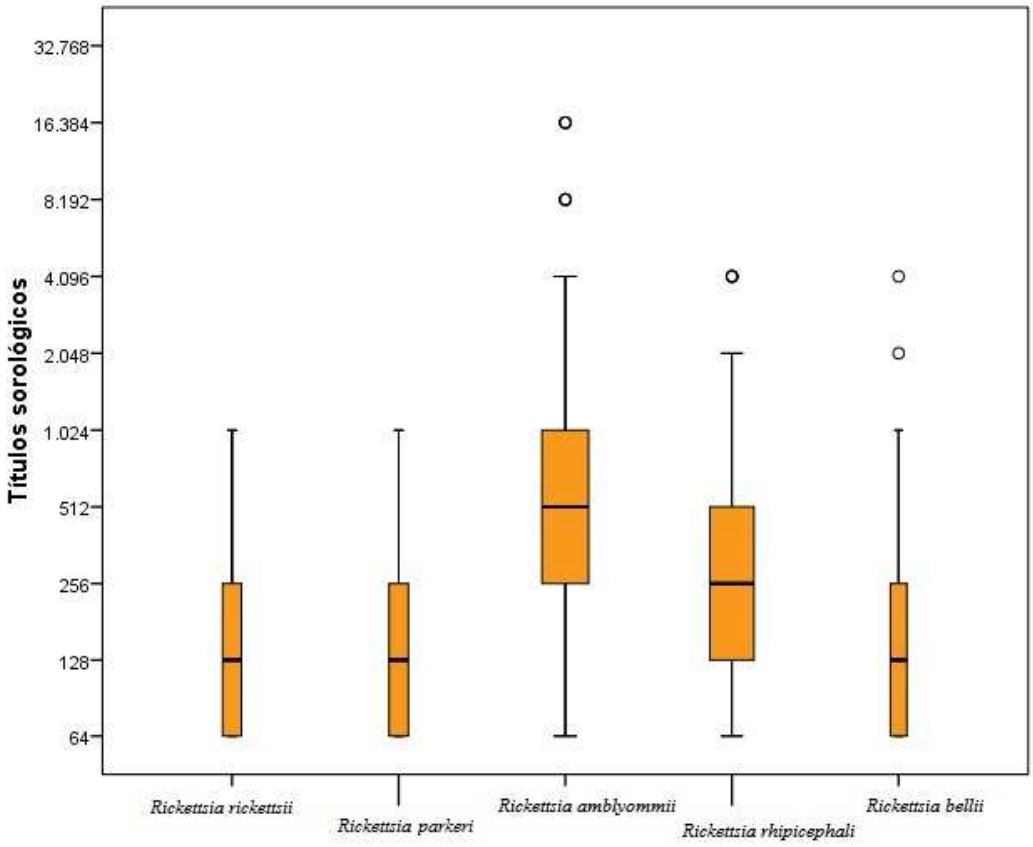
Ectoparasitos[1]	Nº de cães infestados					
	Urbano		Rural		Total	
	+/Exposto	%	+/Exposto	%	+/Exposto	%
	Uma espécie					
R. sanguineus	34/737	4,61	41/823	4,98	75/1560	4,80
A. cajennense	0	0	10/823	1,21	10/1560	0,64
A. oblongoguttatum	0	0	1/823	0,12	1/1560	0,06
A. ovale	8/737	1,08	8/823	0,97	16/1560	1,02
A. parvum	0	0	17/823	2,06	17/1560	1,09
A. rotundatum	0	0	1/823	0,12	1/1560	0,06
	Duas espécies					
Rsangu+Acajen	0	0	7/823	0,85	7/1560	0,44
Rsangu+Aoval	0	0	3/823	0,36	3/1560	0,19
Rsangu+Aoblon	0	0	1/823	0,12	1/1560	0,06
Rsangu+Aparv	0	0	8/823	0,97	8/1560	0,51
Rsangu+Rbmic	1/737	0,13	1/823	0,12	2/1560	0,12
Acajen+Aoval	2/723	0,27	0/823	0,12	2/1560	0,12
Aparv+Hjuxt	0	0	1/823	0,12	1/1560	0,06
	Três espécies					
Rsangu+Acajen+Aoblon	0	0	1/823	0,12	1/1560	0.06
Rsangu+Acajen+Aoval	0	0	2/823	0,24	2/1560	0,12
Rsangu+Acajen+Ambly	0	0	1/823	0,12	1/1560	0,06
Rsangu+Aparv+Ambly	0	0	1/823	0,12	1/1560	0,06
Acajen+Aoval+Ambly	0	0	1/823	0,12	1/1560	0,06

[1]*R. Rhipicephalus*; Rsangu (*Rhipicephalus sanguineus*); *A* (*Amblyomma*); Acajen (*Amblyomma cajennense*); Aoblon (*Amblyomma oblongoguttatum*); Aoval (*Amblyomma ovale*); Aparv (*Amblyomma parvum*); Ambly (*Amblyomma* sp); Hjuxt (*Haemaphisalis juxtakochi*).
+ Animais infestados.

5.3 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA *Rickettsia* spp

Das 1560 amostras testadas pela RIFI para cinco antígenos de *Rickettsia* spp, 12,6% (196) continham anticorpos que reagiram pelo menos para uma espécie de *Rickettsia*, com títulos variando de 64 a 16384 (Gráfico 1).

Gráfico 1 – Boxplot dos títulos sorológicos para as cinco espécies de *Rickettsia* em cães de áreas urbanas e rurais do Estado do Maranhão, Nordeste do Brasil



Fonte: (COSTA, F. B., 2014).

Considerando-se os diferentes antígenos de *Rickettsia*, 64 (4,1%), 66 (4,2%), 160 (10,2%), 151 (9,7%) e 57 (3,6%) cães foram reagentes a *R. rickettsii*, *R. parkeri*, "*Ca*. R. amblyommii", *R. rhipicephali* e *R. bellii*, respectivamente. Para 92 (5,9%) soros, foi possível determinar o provável agente responsável por infecção natural, sendo dividido em 4,7% (73/1560), 0,4% (6/1560), 0,8% (12/1560) e 0,06% (1/1560) cães para "*Ca*. R. amblyommii", *R. rhipicephali*, *R. bellii* e *R. parkeri* respectivamente (Tabela 6). Em 104 (6,7%) soros caninos que reagiram para alguma espécie de *Rickettsia*, não foi possível discriminar qual o possível agente envolvido na infecção dos cães, porque estes tinham diferenças nos títulos menores que quatro vezes entre duas ou mais espécies de *Rickettsia* (Apêndice B).

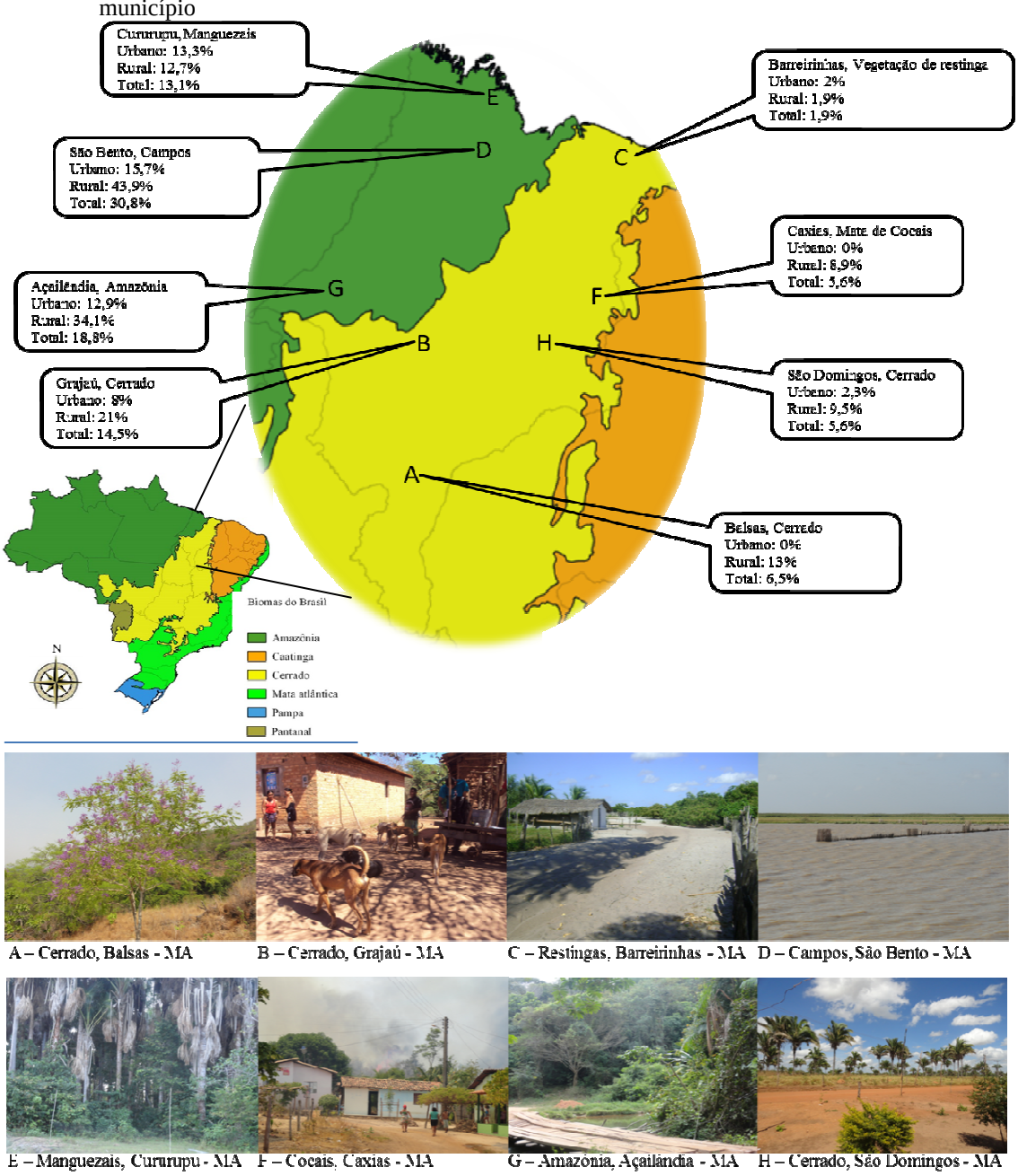
Tabela 6 - Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para os cinco antígenos de *Rickettsia* sp nos municípios de Açailândia, Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento e Saõ Domingos, Maranhão, Nordeste do Brasil

Município	Área	Nº Cães	Cães sororreagentes para pelo menos um dos cinco antígenos de *Rickttsia* sp (% soropositividade)					Nº de cães (PA)
			Rr	Rp	Ra	Rrh	Rb	
[1]Açailândia	Urbana	116	1(0,9)	1(0,9)	7(6)	4(3,4)	8(6,9)	12 (6 Ra, 6 Rb)
	Rural	44	5(11,3)	5(11,3)	10(22,7)	9(7,5)	6(13,6)	
[2]Barreirinhas	Urbana	50	0	0	1(2)	0	0	1 (1 Ra)
	Rural	210	1(0,48)	1(0,48)	4(1,9)	2(0,95)	0	
[2]Balsas	Urbana	100	0	0	0	0	0	5 (2 Ra, 3 Rrh)
	Rural	100	3(3)	2(2)	9(9)	11(11)	0	
[2]Caxias	Urbana	59	0	0	0	0	0	9 (9 Ra)
	Rural	101	2(1,9)	2(1,9)	9(8,9)	6(5,9)	1(0,9)	
[1]Cururupu	Urbana	105	3(2,8)	4(3,8)	12(11,4)	9(8,6)	5(4,8)	12 (10 Ra, 2 Rb)
	Rural	55	3(5,4)	3(5,4)	6(10,9)	6(10,9)	1(1,8)	
[2]Grajaú	Urbana	100	2(2)	2(2)	6(6)	6	0	8 (6 Ra 2 Rrh)
	Rural	100	10(10)	8(8)	18(18)	20(20)	0	
[1]São Bento	Urbana	121	9(7,4)	7(5,8)	19(15,7)	19(15,7)	9(7,4)	42 (38 Ra, 3 Rb, 1 Rrh)
	Rural	139	25(18)	27(19,4)	56(40,3)	55(39,5)	22(15,8)	
[2]São	Urbana	86	0	4(4,6)	0	0	0	3 (1 Ra, 1 Rb, 1 Rp)
Domingos	Rural	74	0	0	3(4)	4(5,4)	3(4)	
Total		1560	64 (4,1)	66 (4,2)	160 (10,2)	151 (9,7)	57 (3,6)	92 (73 Ra, 12 Rb, 6 Rrh, 1 Rp)

PA – Provável antígeno homólogo foi sugerida na reação para um título final de pelo menos quatro vezes para uma determinada *Rickettsia* sp em relação aos outros antígenos; 1 – Bioma Amazônico; 2 – Bioma Cerrado.
Rr: *Rickettsia rickettsii*; Rp: *Rickettsia parkeri*; Ra: *Rickettsia amblyommii*; Rrh: *Rickettsia rhipicephali*; Rb: *Rickettsia bellii*.

A distribuição espacial das amostras que reagiram a pelo menos uma espécie de *Rickettsia* nos oito municípios amostrados do Maranhão encontra-se na figura 2, de acordo com os ecossistemas. Vale salientar que dos 196 cães sororeativos, somente 36 não foram reagentes a "*Ca*. R. amblyommii".

Figura 2 - Distribuição dos soros caninos reagentes a *Rickettsia* spp segundo os ecossistemas amostrados. Os números percentuais nas caixas indicam a soropositividade de cães em áreas urbana e rural por município



Fonte: (COSTA, F. B., 2014).

As maiores frequências de ocorrências foram para "*Ca.* R. amblyommii" com títulos variando de 64 a 16384. Dentre todos os cães positivos, 160 (10,2%) soros de cães reagiram para "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 64, 99 (6,3%) animais tinham títulos ≥ 512 e 73(4,7%) tinham títulos 4x vezes maior em relação aos outros antígenos testados (Tabela 7).

Títulos para as outras espécies de riquétsias variaram de 64 a 1024 para *R. rickettsii* e *R. parkeri*, 64 a 4096 para *R. rhipicephali* e *R. bellii*, conforme gráfico 1.

Nas análises univariadas, as variáveis independentes (área urbana e rural, sexo, idade, atividade de caça, proximidade de mata, infestação por *Rhipicephalus sanguineus* e outros gêneros de carrapatos) foram associadas aos cães positivos na sorologia para triagem com título ≥ 64 para *Rickettsia*, e ≥ 64, ≥ 512 e título final de 4x (quatro vezes) para "*Ca.* R. amblyommii", respectivamente. Conforme tabela 7.

Tabela 7 - Resultados das análises univariadas (teste exato de Fisher) para associação entre variáveis independentes com os resultados sorológicos de cães domésticos, analisados através de quatro perfis sorológicos determinados pela da reação de imunofluorescência indireta: (i) cães reativos a *Rickettsia* spcom titulos ≥64; (ii) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 64; (iii) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 512; (iv) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos pelo menos quatro vezes maior que os títulos finais para as demais espécies de *Rickettsia* testadas - Maranhão - 2014

		Rickettsia≥64			"*Ca.* R. amblyommii" ≥ 64			"*Ca.* R. amblyommii" ≥ 512			"*Ca.* R. amblyommii" x4		
Variáveis independentes		+/E	-/E	*P*	+/E	-/E	*P*	+/E	-/E	*P*	+/E	-/E	*P*
Zona	Urbana	59/737	678/737	<0,01	45/737	692/737	<0,01	23/737	714/737	<0,01	19/737	718/737	<0,01
	Rural	137/823	686/823		115/823	708/823		76/823	747/823		54/823	769/823	
Sexo	Macho	121/919	798/919	>0,05	98/919	821/919	>0,05	65/919	854/919	>0,05	44/919	875/919	>0,05
	Fêmea	75/641	566/641		62/641	579/641		34/641	607/641		29/641	612/641	
Idade (ano)	<1	5/89	84/89	<0,05	3/89	86/89	<0,05	2/89	87/89	>0,05	1/89	88/89	>0,05
	≥1	191/1471	1280/1471		157/1471	1314/1471		97/1471	1374/1471		72/1471	1399/1471	
Caça	Não	142/1347	1205/1347	<0,01	113/1347	1234/1347	<0,01	67/1347	1280/1397	<0,01	48/1347	1299/1347	<0,01
	Sim	54/213	159/213		47/213	166/213		32/213	181/213		25/213	188/213	
Prox. mata	Não	44/555	511/555	<0,01	32/555	523/555	<0,01	17/555	538/555	<0,01	14/555	541/555	<0,05
	Sim	152/1005	853/1005		128/1005	877/1005		82/1005	923/1005		59/1005	946/1005	
R.sanguineus	Não	182/1459	1275/1459	>0,05	147/1459	1312/1459	>0,05	91/1459	1368/1459	>0,05	65/1459	1394/1459	>0,05
	Sim	14/101	87/101		13/101	88/101		8/101	93/101		8/101	93/101	
Carrapatos*	Não	173/1485	1312/1485	<0,01	138/1485	1347/1485	<0,01	87/1485	1398/1485	<0,01	62/1485	1423/1485	<0,01
	Sim	23/75	52/75		22/75	53/75		12/75	63/75		11/75	64/75	

+: Cães soropositivos; -: Cães soronegativos; E: animais expostos; *Ca. Candidatus*; *R. Rickettsia*
* Carrapatos diferentes do *Rhipicephalus sanguineus*

As variáveis independentes que foram significativas ($p<0,05$) na análise univariada como (i) área rural, (ii) idade maior que um ano, (iii) atividade de caça, (iv) áreas de mata e (v) parasitismo por carrapatos diferentes de *R. sanguineus*, foram selecionadas para uma análise multivariada, conforme a tabela 8.

Tabela 8 - Modelo final da regressão logística multivariada, com determinação de fatores de risco (odds ratio) associados a quatro perfis sorológicos de cães domésticos testados pela reação de imunofluorescência indireta: (i) cães reativos a *Rickettsia* sp com títulos ≥64; (ii) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 64; (iii) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos ≥ 512; (iv) cães reativos a "*Ca.* R. amblyommii" com títulos pelo menos quatro vezes maior que os títulos finais para as demais espécies de *Rickettsia* testadas - Maranhão - 2014

Rickettsia sp ≥64						
Fatores de risco	Casos	Expostos	*P*	OddsRatio	IC (95%)	r^2
Zona rural	137	823	0,000	1,843	[1,314 – 2,586]	
Caça	54	213	0,000	2,132	[1,465 – 3,104]	0,066
Carrapatos*	23	196	0,001	2,492	[1,433 – 4,334]	

"*Ca.* R. amblyommii" ≥64					
Fatores de risco	Casos	Expostos	*P*	OddsRatio	IC (95%)
Zona rural	115	823	0,001	1,952	[1,338 – 2,848]	
Caça	47	213	0,000	2,203	[1,476 – 3,290]	0,075
Carrapatos*	22	160	0,000	2,941	[1,670 – 5,180]	

"*Ca.* R. amblyommii" ≥512					
Fatores de risco	Casos	Expostos	*P*	OddsRatio	IC (95%)
Zona rural	76	823	0,000	2,453	[1,492 – 4,034]	
Caça	32	213	0,001	2,311	[1,437 – 3,717]	0,077
Carrapatos*	12	99	0,009	2,433	[1,246 – 4,751]	

"*Ca.* R. amblyommii" 4x					
Fatores de risco	Casos	Expostos	*P*	OddsRatio	IC (95%)
Zona rural	53	823	0,020	1,946	[1,111 – 3,409]	
Caça	25	213	0,000	2,606	[1,522 – 4,460]	0,068
Carrapatos*	11	73	0,010	2,576	[1,259 – 5,270]	

IC – Intervalo de confiança; * Carrapatos diferentes do *Rhipicephalus sanguineus*; *Ca. Candidatus*; *R. Rickettsia*

Os resultados mostram que cães que vivem em áreas rurais, que praticam atividade de caça e se apresentavam infestados por carrapatos diferentes de *R. sanguineus* tinham maiores chances de serem soropositivos na RIFI para triagem de *Rickettsia* sp, assim como para títulos ≥64 para "*Ca.* R. amblyommii", conforme a tabela 8.

Quando se avaliou o perfil dos cães que reagiram na RIFI para diluição dos soros ≥1:512, os cães de zona rural, de caça ou infestados por carrapatos diferentes do *R. sanguineus* tinham signficativamente mais chances de apresentar anticorpos reativos a "*Ca.* R. amblyommii". As mesmas associações significativas foram observadas na análise multivariada quando a variável dependente foi cães com títulos quatro vezes maiores para "*Ca.* R. amblyommii" em relação aos outros antígenos.

5.4 INFECÇÃO POR *Rickettsia* NOS CARRAPATOS E ISOLAMENTO PELA TÉCNICA DE "SHELL VIAL"

Um total de 99 carrapatos adultos (*A. cajennense*, *A. ovale* e *A. parvum*) foi processado pelo teste de hemolinfa, sendo 17 (17,1%) considerados positivos por apresentarem estruturas morfologicamente compatíveis com *Rickettsia* sp em seus hemócitos. Esses carrapatos positivos corresponderam a três *A. ovale* e 14 *A. parvum.*

Pela técnica de *Shell vial*, foram processados quatro carrapatos positivos na hemolinfa, assim como nove negativos. Destes, nenhum isolado foi estabelecido em cultivo, muito embora as carcaças de um *A. ovale* e um *A. parvum* (que tiveram seus conteúdos internos inoculados em *Shell vials*) foram positivas na PCR.

De um total de 959 carrapatos colhidos de cães neste estudo, 780 (81,33%) foram testados pela análise molecular de PCR (incluindo os 13 processados pelo Shell vial), sendo distribuídos da seguinte forma: 541/652 (82.97%) *R. sanguineus*, 100/124 (80,64%) *A. cajennense*, 58/88 (65,90%) *A. parvum*, 1/1 (100%) *A. rotundatum*, 5/5 (100%) *R.* (*B*) *microplus*, 1/1 (100%) *H. juxtakochi*, 44/50 (88%) *A. ovale*, 2/9 (22,2%) *A. oblongoguttatum* e 27/29 (93,10%) *Amblyomma* sp. DNA de riquétsias foram encontradas em 16 carrapatos, sendo 12 *A. parvum*, três *A. ovale*, um *A. rotundatum* e um ninfa de *A. cajennense sensu lato*. Após os sequenciamentos dos genes *glt*A e *omp*A, as frequências de infecção dos carrapatos

coletados sobre os cães para *Rickettsia* spp foram de 12/58 (20,7%) *A. parvum* para "*Ca.* Rickettsia andeane", 3/44 (6,8%) *A. ovale* e 1/1 (100%) *A. rotundatum* para *R. bellii*, respectivamente, e 1/100 (0,1%) *A. cajennense* s. l. para "*Ca.* R. amblyommii".

5.4.1 **Coletas adicionais de carrapatos para isolamento de *Rickettsia***

Foram coletados 41 adultos de *A. cajennense* s. l. de equinos em Balsas e 93 adultos de *A. cajennense* s. s. de suínos em Viana. Destes, 19 foram processados pela técnica de Shell vial, resultando em 2 isolados em células Vero, todos oriundos de Viana. Todos esses isolados foram confirmados como "*Ca*. R. amblyommii" por PCR e sequenciamento de framentos dos genes *gltA, ompA, ompB* e *htrA* através de células infectadas da segunda ou terceira passagem (Tabela 9). No entanto, somente um dos isolados pode ser mantido por várias passagens e por criopreservação, uma vez que os demais se perderam por contaminação por fungos ou bactérias extra-celulares. Das carcaças dos carrapatos inoculados nos Shell vials, somente cinco foram positivos na PCR para *Rickettsia*, correspondendo exatamente aos que geraram os isolados de "*Ca*. R. amblyommii" em células Vero. As sequências de DNA desses carrapatos também se confirmaram como "*Ca*. R. amblyommii".

Tabela 9 - Carrapatos testados pela técnica de Shell Vial e PCR nos municípios de Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento e Viana, Estado do Maranhão, Brasil

Município	Espécie	No. carrapatos testados	No. positivo no Shell vial	PCR	Espécie de *Rickettsia*
Balsas	*Rhipicephalus sanguineus*	1F	0	0	-
	Amblyomma cajennense	3M, 1F	0	0	-
	Amblyomma ovale	1F	0	0	-
Grajaú	*Amblyomma parvum*	1F	0	0	-
	Amblyomma ovale	1M	0	0	
	Amblyomma oblongoguttatum	1F	0	0	-
São Bento	*Rhipicephalus sanguineus*	3M	0	0	-
	Amblyomma cajennense	1F	0	0	-
Cururupu	*Amblyomma ovale*	1M, 5F	[a]1F	1F	*Rickettsia bellii*-
Caxias	*Amblyomma parvum*	2F	[a]1F	1F	"*Candidatus* Rickettsia andeane"
Viana	*Amblyomma cajennense*	9M, 6F	[a]3M, [a]1F, 1F	3M, 2F	"*Candidatus* R. amblyommii"

[a] Isolado, mas não estabelecido em cultivo celular; M macho; F fêmea

6 DISCUSSÃO

No presente estudo foram amostrados 1560 cães de áreas urbanas e rurais de seis ecossistemas do Estado do Maranhão, os quais se apresentaram com diferenças significativas na relação de machos e fêmeas, animais que vivem próximo a mata, praticam atividade de caça e que fazem uso de produtos carrapaticidas, vacinados e vermifugados. Os animais que vivem próximos à mata na área urbana foi bem inferior aos animais da área rural, contudo, uma parcela dos animais, mesmo vivendo em áreas rurais, não tinham acesso à mata, pois se tratava de vilas em que os cães ficavam presos nos quintais.

A frequência de animais que praticam atividade de caça na zona rural foi muito superior à área urbana, já que o seu habitat e as condições socioeconômicas de seus proprietários favoreciam a prática de caça. Porém alguns cães da área urbana praticavam esta atividade e isso se deve também pelas condições financeiras, sociais dos proprietários e/ou movido pelo simples prazer da prática da caça onde os cães acabam acompanhando os proprietários nessa atividade. Estes dados são similares aos encontrados na região norte do bioma Pantanal e na região leste do Estado do Maranhão, que apresentaram uma maior frequência de cães de caça na zona rural (COSTA, 2011; MELO et al., 2011).

Em relação à faixa etária, não foram observados diferenças significativas entre as áreas, entretanto a média de idade foi menor para a zona rural. Este dados corroboram outros estudos, em que a menor longevidade dos cães está relacionada às condições de criação, no qual grande parte dos animais tinham acesso irrestrito à rua, e falta de cobertura vacinal, levando ao risco mais elevado de contágio de doenças e morbimortalidade, como observado neste estudo (SILVA et al., 2010; COSTA, 2011; CANATTO, 2012).

A quantidade de animais que andavam livremente pelas ruas é preocupante, já que podiam ter acesso a outros domicílios, contatos com outros animais domésticos, assim como o risco de agressão às pessoas que podem levar à transmissão de doenças de caráter zoonótico como a raiva, disseminação de carrapatos e seus patógenos no ambiente por onde circulam, como *Babesia*, *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* (CARLOS et al., 2007; AGUIAR et al., 2007; COSTA-JÚNIOR et al., 2007; COSTA JÚNIOR et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012; SILVA et al., 2012; BARBIERI, 2012).

6.1 CARRAPATOS EM CÃES NO MARANHÃO

O presente estudo relata a presença de oito espécies de ixodídeos em cães no Estado do Maranhão: *R. sanguineus*, *A. cajennense*, *A. parvum*, *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. rotundatum*, *Amblyomma* sp, *R.* (*B.*) *microplus* e *H. juxtakochi*. *R. sanguineus* apresentou maior frequência de ocorrência em cães tanto na área urbana quanto na área rural, sendo estes resultados similares aos encontrados nas microrregiões de Chapadinha e Imperatriz (SILVA et al., 2012; COSTA et al., 2013), assim como para outros cenários no Brasil, principalmente em biomas de Mata atlântica, Cerrado e Pantanal descritos por Labruna et al. (2001), Szabó et al. (2010) e Melo et al. (2011). Como hospedeiros acidentais para *R. sanguineus*, já foram descritos o furão (*Galictis cuja*) na Ilha de São Luís, MA (FIGUEIREDO; SANTOS; GUERRA, 2010) e a ave (*Coereba flaveola*) numa pequena reserva de cerrado no município de Uberlândia, MG (SZABÓ et al., 2008). Esses achados, mesmo que isolados, podem significar rotas de disseminação pouco estudadas desta espécie de carrapato, podendo trazer graves consequências para a saúde pública e dos animais, quando possíveis patógenos estão envolvidos.

Atualmente *R. sanguineus* tem sido muito estudado quanto as suas características genéticas, biológicas, morfológicas e geográficas, visto que existem distintas espécies dentro do táxon *R. sanguineus* com implicações na competência vetorial de patógenos (OLIVEIRA et al., 2005; SZABÓ et al., 2005; LABRUNA et al., 2009; MORAES-FILHO et al., 2011; NAVA et al., 2012). Desta forma, *R. sanguineus* de São Luís no Maranhão pertence ao clado da América Latina tropical, sendo mais próximos dos espécimes africanos, além de apresentarem maiores frequências de carrapatos infectados por *Ehrlichia canis* e cães com maiores frequências de anticorpos quando comparados aos carrapatos deste táxon no cone sul da América do Sul (COSTA, 2011; KRAWCZAK et al., 2012; MORAES-FILHO et al., 2013).

A segunda maior frequência de carrapatos coletados sobre os cães pertence ao complexo *A. cajennense*, com ênfase para área rural. Resultados similares foram observados nos estudos de Melo et al. (2011) e Costa et al. (2013), contrastando com os achados de Labruna et al. (2001) e Vieira et al. (2013), que não encontraram ou encontraram apenas um

exemplar desta espécie em cães de áreas rurais do Estado do Paraná. Alguns relatos de carrapatos do complexo *A. cajennense* já foram descritos no Maranhão em diferentes hospedeiros, tais como equino, suíno, cão, gato, asinino e humano (FONSECA, 1958; GUERRA; BRITO, 2004; COSTA et al., 2013; REIS et al., 2013; MARTINS, 2014).

O táxon *A. cajennense* vinha sendo considerado uma única espécie de carrapato distribuída desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina. Trabalhos recentes, baseados numa avaliação morfológica e genética de diferentes populações de *A. cajennense* no continente americano, indicaram que *A. cajennense* é de fato um complexo de pelo menos seis espécies: 1) *A. cajennense* sensu stricto, 2) *Amblyomma mixtum*, revalidado, anteriormente conhecido como sinonímia de *A. cajennense*, 3) *Amblyomma sculptum*, revalidado, anteriormente conhecido como sinonímia de *A. cajennense*, 4) *Amblyomma interandinum* n. sp., 5) *Amblyomma patinoi* n. sp. e 6) *Amblyomma tonelliae* n. sp. (NAVA et al., 2014).

A espécie *A. cajennense* s. s., correspondente aos tipos descritos na Guiana Francesa, é distribuída na zona Norte ocidental da bacia amazônica. *A. interandinum* é estabelecida na região inter-andina do Peru. *A. mixtum* é encontrada do Sul dos Estados Unidos ao Norte-Oeste da Colômbia, Equador e Venezuela. A distribuição de *A. sculptum* compreende áreas das regiões Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Sul do Brasil, assim como áreas úmidas do Noroeste da Argentina (principalmente a região biogeográfica de Yungas). *A. tonelliae* é estabelecida na região do Chaco da Argentina e Paraguai. *A. patinoi* está presente no Oeste da Venezuela e Cordilheira Central na Colômbia (NAVA et al., 2014). A partir desses trabalhos recentes, as seis espécies citadas acima formam o complexo *A. cajennense* ou *A. cajennense* sensu lato (s.l.).

Uma pesquisa recente deste complexo no Brasil (Anexo A) indica duas espécies de *A. cajennense* s.l. no Maranhão (MARTINS, 2014): *A. cajennense* s.s. e *A. sculptum.* No geral, a primeira está distribuída principalmente na metade oeste do Estado, ao passo que a segunda espécie se distribui por todo o Estado, sendo muitas vezes a única na metade leste. O encontro das duas espécies de forma simpátrica, inclusive sobre o mesmo hospedeiro, foi um achado comum em vários municípios da metade oeste maranhenses (MARTINS, 2014). Segundo Martins (2014) o Maranhão é o único Estado da região Nordeste com registro para *A. cajennense* s. s., provavelmente pela área de floresta amazônica no oeste do Estado.

O carrapato Neotropical com a terceira maior frequência de ocorrência foi *A. parvum*, salientando que os estágios adultos foram mais evidentes que as fases imaturas, com a presença somente de três ninfas e nenhuma larva sobre os cães, sendo muito comum na região leste, uma região com características típicas de cerrado que apresentam três diferentes ecossistemas como vegetação de restingas, mata dos cocais e cerrado. Esta espécie já era conhecida da fauna ixodológica maranhense há 56 anos, quando relatos em *Myrmecophaga tridactyla tridactyla*, *Homo sapiens* e *mazama simplicicornis*, além de cão, cavalo, bovino, capivara, mocó (*Kerodon rupestres*) e rato silvestre (FONSECA, 1958). *A. parvum* é uma espécie que merece uma atenção na saúde pública, haja vista que já detectaram *Ehrlichia chaffeensis* na Argentina (TOMASSONE et al., 2008) e "*Ca*. Rickettsia andeanae" de patogenicidade desconhecida no Brasil e Argentina (PACHECO et al., 2007; NIERI-BASTOS et al., 2014). Recentemente vários trabalhos experimentais com *A. parvum* foram desenvolvidos com intuito de fornecer informações sobre divergência genética e biológica (NAVA et al., 2008a; OLEGÁRIO et al., 2011; GERARDI et al., 2013). O parasitismo desta espécie em humano no Brasil foi registrado na Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Piauí e Rio Grande do Norte, (FONSECA, 1958; GUIMARÃES et al., 2001; FERREIRA; REGO; AHID, 2008; REIS et al., 2013).

Os achados neste estudo de espécimes adultos de *A. ovale* coletados sobre os cães de área rural, já foram reportados na literatura para este hospedeiro (QUEIROGAS et al., 2010; SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; SZABÓ et al., 2012; COSTA et al., 2013), sendo um carrapato típico de carnívoros silvestres no Brasil (GUIMARÃES et al., 2001; RODRIGUES; DAEMON, 2004; LABRUNA et al., 2005b). Os exemplares achados na área urbana estão certamente relacionados ao fato dos animais serem de caça, com acesso à mata. *A. ovale* é um carrapato de grande distribuição em vários países da América, desde o norte da Argentina até o sul do México (GUGLIELMONE et al., 2003; BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006) com grande importância por atacar humanos e ser vetor de patógenos de importância para a saúde pública (LABRUNA et al., 2005b; GUGLIELMONE et al., 2006b; QUEIROGAS et al., 2010; SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; BARBIERI, 2012; KRAWCZAK, 2012).

Outras espécies de ixodídeos com menores frequências de ocorrências coletados sobre os cães foram *A. oblongoguttatum*, *R.* (*B.*) *microplus* e *H. juxtakochi*, sendo que outros estudos já relatavam registros para estes carrapatos neste hospedeiro, assim como em humanos (LABRUNA et al., 2000; MARTINS et al., 2009). Outras espécies de hospedeiro

como *Tapirus terrestris*, *Hidrochoerus hidrochaeris* já foram parasitadas por *A. oblongoguttatum* e junto com *A. ovale* são as principais espécies infestando carnívoros na Amazônia, além de parasitar humanos (LABRUNA et al., 2000; LABRUNA et al., 2005c; GUGLIELMONE et al., 2006b; MARTINS et al., 2014).

No presente estudo, em duas cidades (Açailândia e São domingos) foram observados cães infestados por *R.* (*B.*) *microplus*, sendo um achado acidental. Estes dados são semelhantes para outras pesquisas, principalmente quando os cães estão associados com fazendas de gado (LABRUNA et al., 2001). Pode-se inferir que os cães participavam do manejo dos bovinos, já que é um fato muito comum nas propriedades rurais e propriedades peri-urbanas. Além de bovinos, outras espécies de hospedeiros já foram parasitadas como equinos, caprinos e ovinos no Maranhão (GUERRA; BRITO, 2004; BRITO; SANTOS; GUERRA, 2005).

Durante as coletas, um fato raro foi observado, quando um carrapato *A. rotundatum* foi coletado sobre um cão, sem estar fixado. Esta espécie é conhecida por parasitar animais pecilotérmicos como répteis, anfíbios e raramente humanos (SERRA-FREIRE et al., 1995; GUERRA; ABREU-SILVA; SERRA-FREIRE, 2000; TEIXERA et al., 2003).

Um único exemplar de *H. juxtakochi* de fase imatura (ninfa) foi coletado sobre um cão da área rural no município de Caxias, que apresenta um ecossistema de cocais. Este carrapato é amplamente distribuído na América com relatos na Argentina parasitando cão doméstico (BOERO, 1957; GUGLIELMONE et al., 1992; BELDOMENICO et al., 2003) e acidentalmente pode parasitar humano (GUGLIELMONE et al., 2006b), além de ser potencialmente vetor de patógenos (LABRUNA et al., 2005a). Diante da escassa literatura para uma região tão pouca explorada do ponto de vista acarológica, é digno de nota que, pela primeira vez há registro de *A. oblongoguttatum* e *H. juxtakochi* no Maranhão.

Um total de 150 (9,6%) cães amostrados se apresentava parasitado por alguma espécie de carrapatos, conforme discutido acima, sendo que as frequências de ocorrências dos cães de área rural foram significativamente maiores em relação aos cães da área urbana ($p<0.05$). Para *R. sanguineus*, resultados similares foram encontrados aos de Costa et al. (2013), mas em outros lugares, observa-se maiores frequências de cães infestados por esta espécie de carrapato em diferentes biomas do país (LINARDI E NAGEN, 1973; RIBEIRO et al., 1997; LABRUNA et al., 2000; SZABO´ et al., 2001; BELLATO et al., 2003; DANTAS-TORRES et al., 2004; LABRUNA et al., 2005b, SOARES et al., 2006; MELO et al., 2011), já que se

adaptou muito bem às áreas urbanas pelo seu ciclo de vida nidícola, com hábito de penetrar em pequenos buracos ou frestas em superfícies de cimento ou madeira (DIPEOLU et al., 1982). Atualmente, com o avanço econômico do país, as residências rurais têm passado por transformações, com construções de alvenaria, e consequentemente não sendo um fator limitante ao ciclo de vida deste carrapato na zona rural, como já tinha sido relatado por Labruna et al. (2001). Infestações de cães na área urbana pelo *A. cajennense*, *A. ovale* e *R.* (B) *microplus* foram observadas, mas em menor frequência.

Infestações mistas de *R. sanguineus* com uma ou duas espécies diferentes do gênero *Amblyomma* foram identificadas em cães da zona rural, tem sido relatadas em outros trabalhos (QUEIROGAS et al., 2010; MELO et al., 2011; COSTA et al., 2013). Do ponto de vista de Medicina Veterinária Preventiva, *R. sanguineus* e/ou *Amblyomma* sp podem se infectar com outros patógenos durante o repasto sanguíneo e transmiti-los em uma determinada população de cães domésticos e/ou animais silvestres que nunca tiveram contato com outros agentes etiológicos (LABRUNA et al., 2008; MORAES-FILHO et al., 2009). Apenas um cão da zona urbana apresentou-se parasitado por *R. sanguineus* e *R.* (*B*) *microplus* ao mesmo tempo, sendo que este cão vivia próximo a área de pasto de bovinos.

Infestações com mais de uma espécie do gênero *Amblyomma* também foram frequentes no estudo com associações de *A. cajennense* s. l. mais *A. ovale* em dois cães dá área urbana, os quais se justificam por serem caçadores, um cão com *A. cajennense* s. l., *A. ovale* e *Amblyomma* sp na área rural, além de uma infestação mista de *A. cajennense* s. l. mais *H. juxtachoki*. Estas associações são frequentes em cães de áreas rurais, pois neste ambiente, os cães estão constantemente em contatos com carrapatos neotropicais, principalmente os que têm acesso à mata. Estes dados corroboram outros estudos realizados com cães em área rural (LABRUNA et al., 2000; 2001a; QUEIROGAS et al., 2010; FERREIRA et al., 2013).

6.2 SOROLOGIA DE CÃES PARA *Rickettsia* spp.

Do total de amostras, 196 (12,6%) dos cães apresentaram anticorpos para pelo menos uma espécie de *Rickettsia* dentre as cinco testadas, sendo a frequência de soropositivos significativamente maiores nos cães de áreas rurais, dos quais muitos apresentaram evidências

sorológicas (possíveis reações homólogas) de infecção causada por "*Ca.* R. amblyommii" ou uma espécie com características biológicas e/ou genéticas muito próxima. Na análise univariada, as variáveis independentes que tiverem associação significativa com sorologia positiva para *Rickettsia* sp. e "*Ca.* R. amblyommii" foram cães vivendo na zona rural, idade acima de um ano, atividade de caça, habitat próximo a mata e cães infestados por carrapatos diferentes de *R. sanguineus*. Resultados similares foram encontrados para outros trabalhos (COSTA, 2011; MELO et al., 2011). A análise multivariada mostrou que os fatores de riscos associado com a infecção por *Rickettsia* sp. e "*Ca.* R. amblyommii" eram cães vivendo na área rural, que praticavam atividade de caça e infestados por carrapatos diferentes de *R. sanguineus*, sendo que de fato estes três fatores são típicos de ambiente rural e intimamente relacionados, o que não se observa na área urbana, onde encontramos com maior frequência o carrapato *R. sanguineus*.

Dos oito municípios, as maiores frequências de ocorrências das possíveis reações homológas para "*Ca.* R. amblyommii" foram nos municípios de São Bento (Baixada Maranhense) e Açailândia (Amazônia) que pertencem ao bioma amazônico. Estes resultados estão intimamente relacionados à distribuição do *A. cajennense* s. s. (vide Anexo A) como mostrado nos estudo de Martins (2014) em que esta espécie de carrapato está praticamente restrita à região amazônica. Já para o bioma Cerrado, observou-se que a frequência de cães que apresentaram títulos para "*Ca*. R. amblyommii" foi menor, já que neste bioma observa-se a presença do carrapato *A. sculputum*, mostrando a diferença na sorologia quando há poucos vetores na região. Quando se compara os títulos de sorologia dos cães do sul e sudeste do Brasil, constata-se que nestas regiões, há uma tendência de maiores títulos para *R. parkeri* ou uma cepa muito próxima e *R. rickettsii*, onde predomina o *A. aureolatum*, *A. ovale* e *A. sculptum* (PINTER et al., 2008; SAITO et al., 2008; PACHECO et al., 2011a; SANGIONI et al., 2011; BARBIERI, 2012; SZABÓ et al., 2013a). Estes resultados são muito importantes para a ecologia das riquetsioses no Brasil, visto que pela primeira vez mostra claramente a diferença entre as frequências de títulos sorológicos em cães para "*Ca.* R. amblyommii" numa área de transição do complexo *A. cajennense*.

É importante salientar que uma pequena parcela dos cães apresentaram títulos sorológicos quatro vezes maiores para *R. parkeri*, *R. rhipicephali* e *R. bellii* ou uma espécie de riquétsia muito próxima geneticamente a estas, porém é importante futuros estudos testarem por técnicas moleculares e/ou de cultivo celular a partir carrapatos, principalmente do gênero

Amblyomma e *Haemaphysalis* para provar a circulação destas riquétsias e os seus potenciais risco para a saúde pública.

6.3 INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp EM CARRAPATOS

As frequências de infecção dos carrapatos coletados sobre os cães para *Rickettsia* sp foram de 12/58 (20,7%) *A. parvum* para "*Ca.* Rickettsia andeanae", 3/44 (6,8%) *A. ovale* e 1/1 (100%) *A. rotundatum* para *R. bellii*, e 1/100 (0,1%) *A. cajennense* s. l. para "*Ca.* R. amblyommii". No entanto, dos carrapatos *A. cajennense* (confirmados como *A. cajennense* s. s.) coletados sobre suínos em Viana, a frequência foi de 8/57 (14.0%).

"*Ca.* Rickettsia andeanae" foi encontrada em *A. parvum* no Maranhão, coletado sobre os cães de Caxias, um município muito próximo ao local do primeiro relato desta riquétsia no Piauí (NIERI-BASTO et al., 2014). Ressalta-se que quatro espécies de carrapatos já foram encontradas infectadas por "*Ca.* Rickettsia andeanae" no continente americano, em diferentes condições ambientais, desde os Andes até a América do Norte (BLAIR et al., 2004b; PACHECO et al., 2007; PADDOCK et al., 2010; ABARCA et al., 2012; FLORES-MENDOZA et al., 2013; ARRAIS, 2013; NIERI-BASTO et al., 2014). A frequência de infecção em *A. parvum* encontrada neste estudo é muito alta em relação aos outros estudos e não se obteve com sucesso o isolamento desta riquétsia em cultivo celular.

A. ovale e *A. rotundatum* foram encontrados infectados com *R. bellii*, uma riquétsia amplamente distribuída nas Américas, infectando um grande número de carrapatos das famílias Ixodidae e Argasidae (PHILIP et al., 1983; CAGE et al., 1994; AZAD; BEARD, 1998; BARBIERI et al., 2012). Estes dados são similares aos encontrados em áreas de floresta amazônica e Mata Atlântica (LABRUNA et al., 2004c; SZABÓ et al., 2013). Isolou-se *R. bellii* em cultivo celular a partir de um *A. ovale*, mas sem sucesso de estabelecer a cultura em laboratório.

Dos carrapatos *A. cajennense* s.l. coletados de cães, apenas uma ninfa do complexo *A. cajennense* apresentou-se infectada por "*Ca*. R. amblyommii" coletada sobre cães em Balsas que está inserida no bioma amazônico. Segundo Martins (2014), somente *A. sculptum* foi encontrado neste município, o que corrobora com os encontrados neste estudo, quando foi

possível identificá-los nos estágios adultos, porém os estágios imaturos como ninfas não foi possível, portanto sendo identificados como *A. cajennense* s. l. Esta região é uma área de transição entre estas duas espécies do complexo *A. cajennense*, ou seja entre o bioma da Amazônia e o Cerrado, por conseguinte esta identificação deve ser minuciosamente cautelosa, utilizando-se análise morfológica das fêmeas ou ferramentas moleculares (MARTINS, 2014). Este resultado de carrapato infectado por "*Ca.* R. amblyommii" corrobora os já descritos em todos os biomas do Brasil como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica (LABRUNA et al., 2004a; OGRZEWALSKA; UEZU; LABRUNA, 2010; MELO et al., 2011; PACHECO et al., 2012; AMORIM-FILHO, 2013; OGRZEWALSKA et al., 2013; SARAIVA, et al., 2013).

O cão é considerado um hospedeiro acidental para os carrapatos do complexo *A. cajennense* existentes no Brasil (LABRUNA; PEREIRA, 2001), consequentemente a frequência de cães infestados por estes carrapatos adultos e a coleta dos mesmos foi baixa durante o estudo. Aproximadamente 80% dos carrapatos deste complexo *A. cajennense* foram negativos para presença de DNA de riquétsia e quando se tentou o isolamento, o sucesso foi insatisfatório, pois todos os carrapatos testados foram negativos.

Partindo deste princípio, numa coleta paralela em Viana - MA, uma região típica de campos alagados, conhecida como "Baixada Maranhense", coletaram-se sobre os suínos, criados em sistema extensivo, carrapatos *A. cajennese* sensu stricto (68 machos, 25 fêmeas). Apenas 61% (57/93) carrapatos adultos foram testadas pela PCR, com 14% (8/57) positivos para os genes *gltA* e *ompA*, corroborando com os resultados de Amorim-Filho (2013) para esta região. Destes carrapatos, isolou-se "*Ca.* R. amblyommii" apenas em dois, e mantendo um isolado no laboratório, uma vez que o outro foi perdido por contaminação por fungos ou bactérias extra-celulares. *Ca.* R. amblyommii foi isolada a partir de *A. cajennense* s. s. no Brasil por Labruna et al. (2004c) no bioma amazônico em Rondônia, assim como recentemente já foi isolada em Pernambuco na Caatinga a partir de *A. auricularium* e na Mata Atlântica em Nazaré Paulista - SP a partir de *A. longirostre* (OGRZEWALSKA et al., 2013; SARAIVA et al., 2013). Desta forma, pode-se afirmar que esta riquétsia possui uma ampla distribuição dentro do território brasileiro por diferentes espécies de carrapatos.

No mesmo ecossistema em que foi isolado "*Ca.* R. amblyommii", em São Bento - MA, que faz parte do bioma da Amazônia, foi observado que dentre os municípios estudados, foi o que obteve maiores frequências de ocorrências de anticorpos anti-"*Ca.* R. amblyommii"

nos soros dos cães, contrastando com baixos valores de soroprevalência para o município de Balsas – MA, que pertence ao bioma de Cerrado. É digno de nota que segundo Martins (2014), a distribuição de carrapatos do complexo *A. cajennense* no Maranhão se caracteriza pela presença de *A. sculptum* por todo o Estado, porém a espécie *A. cajennense* s. s. está bem distribuída apenas no oeste do Estado (área predominantemente amazônica), com raros relatos na parte leste (área predominantemente de Cerrado). Uma vez que os achados prévios de "*Ca.* R. amblyommii" em carrapatos deste complexo no Brasil se restrigem à espécie *A. cajennense* s. s. em Rondônia (LABRUNA et al., 2004c; NAVA et al., 2014) e Maranhão (presente estudo), os resultados sorológicos dos cães condizem com a distribuição dessas espécies de carrapatos no Maranhão. Por fim, este estudo apresenta o primeiro relato de um isolamento bem sucedido em cultura de células Vero de uma espécie de *Rickettsia* a partir de carrapatos da ixodofauna Maranhense.

7 CONCLUSÃO

- Cães residentes em áreas urbanas e rurais dos oito municípios amostrados, estão expostos à infecção natural por agentes do GFM, principalmente para "*Ca*. R. amblyommii" ou uma cepa muito próxima a esta no bioma amazônico.
- Há uma alta variedade de carrapatos infestando cães de áreas rurais do Maranhão. Registra-se *A. oblongoguttatum* e *H. juxtakochi* para o Estado.
- O espécie de carrapato *A. cajennense* s.s. está naturalmente infectada por "*Ca*. R. *amblyommii*"no Estado do Maranhão.
- No Maranhão, a soropositividade canina para riquétsias do grupo da febre maculosa, sobretudo para "*Ca*. R. *amblyommii*", está associada a áreas rurais, atividades de caça e infestações por carrapatos diferentes de *R. sanguineus*.

REFERÊNCIAS

ABARCA, K.; LOPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; LEPE, P.; SOARES. J. F.; LABRUNA, M. B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne rickettsia in Chile**. Journal of Medical Entomology,** v. 49, n, 1, p. 219–222, 2012.

AB'SABER, A. N. Os domínios morfoclimáticos na América do Sul. **Geomorfologia**, v. 52, p. 1-21, 1997.

AGUIAR, D. M.; SAITO, T. B.; HAGIWARA, M. K.; MACHADO, R. Z.; LABRUNA, M. B. Diagnóstico sorológico de erliquiose canina com antígeno brasileiro de *Ehrlichia canis*. **Ciência Rural,** v. 37, n. 3, p. 796-802, 2007

ALMEIDA, A. B. P. F.; PAULA, D. A. J.; DAHROUG, M. A. A.; FREITAS, A. G.; SILVA, J. N.; DUTRA, V.; NAKAZATO, L.; SOUSA, V. R. F. *Ehrlichia canis* e *Anaplasma platys* em carrapatos de cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias,** v. 33, n. 3, p. 1123-1126, 2012.

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

AMORIM-FILHO, E. F. **Pesquisa de *Rickettsia* em cavalos baixadeiros e ectoparasitas potencialmente vetores de patógenos**. 2013. 65 f. (Mestrado em Ciência animal) - Universidade Estadual do Maranhão, Maranhão, 2013.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns paises limitrofes. **Memórias do Instituto Osvaldo Cruz,** v. 31, n. 4, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. **Memórias Instuto Oswaldo Cruz**, v. 59, p.119-129, 1961.

ARRAIS, R. C. **Ocorrência de patógenos transmitidos por carrapatos (*Anaplasma* spp, *Babesia* spp, *Ehrlichia* spp, *Hepatozoon* spp e *Rickettsia* spp) em lobos guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cães domésticos na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil.** 2013. 81 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases,** v. 4, n. 2, p. 179–186, 1998.

BABALIS, T.; TSELENTIS, Y.; ROUX, V.; PSAROULAKI, A.; RAOULT, D. Isolation and identification of a rickettsial strain related to *Rickettsia massiliae* in Greek ticks. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 50, n. 3, p, 365–372, 1994.

BACELLAR, F.; REGNERY, R. L.; NUNCIO, M. S.; FILIPI, A. R. Genotypic evaluation of rickettsial isolates recovered from various species of ticks in Portugal. **Epidemiology and Infection,** v.114, n. 1, p. 169–178, 1995.

BARBIERI, A. R.; ROMERO, L.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia bellii* infecting *Amblyomma sabanerae* ticks in El Salvador. **Annals of Tropical Medicine And Parasitology**, v. 106, n. 3, p. 188-189, 2012.

BARBIERI, A. R. M. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa da Mata Atlântica em um foco endêmico no município de Blumenau, Santa Catarina.** 2012. 91 f. Dissertação

(Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BARRE´, N.; UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Revue Scientifique et Technique de l Office International des Epizooties,** v. 29, p. 149–160, 2010.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância Médico-Veterinário da região neotropical**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. p. 223.

BEATI, L.; FINIDORI, J. P.; GILOT, B.; RAOULT, D. Comparison of microimmunofluorescence serologic typing, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and polymerase chain reaction followed by restriction fragment length polymorphism analysis for identification of rickettsiae: characterization of two new rickettsial strains. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 30, n. 8, p. 1922-1930, 1992.

BEATI, L.; RAOULT, D. *Rickettsia massiliae* sp. nov., a New Spotted Fever Group Rickettsia. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 43, n. 4, p. 839-840, 1993.

BEATI, L.; ROUX, V.; ORTUÑO, A.; CASTELLA, J.; PORTA, F. S.; RAOULT, D. Phenotypic and genotypic characterization of spotted fever group rickettsiae isolated from Catalan *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 34, n. 11, p. 2688–2694, 1996.

BEELER, E.; ABRAMOWICZ, K. F.; ZAMBRANO, M. L.; STURGEON, M. M.; KHALAF, N.; HU, R.; DASCH, G. A.; EREMEEVA, M. E. A focus of dogs and *Rickettsia massiliae*-infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v.84, n. 2, p. 244–249, 2011.

BELDOMENICO, P. M.; BALDI, C. J.; ANTONIAZZI, L. R.; ORDUNA, G. M.; MASTROPAOLO, M.; MACEDO, A. C.; RUIZ, M. F.; ORCELLET, V. M.; PERALTA, J. L.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) present at Parque Nacional El Rey, Argentina. **Neotropical Entomology**, v. 32, n. 2, p. 273-277, 2003.

BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; SOUZA, A. P.; RAMOS. B. C. Ectoparasitos em caninos do município de Lages, Santa Catarina Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria,** v. 12, n. 3, p. 95-98, 2003.

BERMUDEZ, S. E.; EREMEEVA, M. E.; KARPATHY, S. E. SAMUDIO, F.; ZAMBRANO, M. L.; ZALDIVAR, Y.; MOTTA, J. A; DASCH, G. A. Detection and Identification of Rickettsial Agents in Ticks From Domestic Mammals in Eastern Panama. **Journal of Medical Entomology,** v. 46, n. 4, p. 856-861, 2009.

BERNABEU-WITTEL, M.; DEL TORO, M. D.; NOGUERAS, M. M.; MUNIAIN, M. A.; CARDEÑOSA, N.; MÁRQUEZ, F. J.; SEGURA, F.; PACHÓN, J. Seroepidemiological study of *Rickettsia felis, Rickettsia typhi, and Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases,** v. 25, n. 6, p. 375-381, 2006.

BERNASCONI, M. V.; CASATI, S.; PÉTER, O.; PIFFARETTI, J. C. *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). **Infection, Genetics and Evolution,** v.2, n. 2, p. 111–120, 2002.

BILLETER, S. A.; BLANTON, H. L.; LITTLE. S. E.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Detection of "*Rickettsia amblyommii*" in Association with a Tick Bite Rash. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases,** v.7, n. 4, p. 607-610, 2007.

BITAM, I.; PAROLA, P.; DE LA CRUZ, K. D.; MATSUMOTO, K.; BAZIZ, B.; ROLAIN, J. M.; BELKAID, M.; RAOULT, D. First molecular detection of *Rickettsia felis* in fl eas from Algeria. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v.74, n. 4, p. 532–535, 2006.

BLAIR, P. J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CACEDA, R.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; HUAMAN, A.; LUCKETT, R.; MENDOZA, L.; RICHARDS, A. L.; RIOS, Z.; SUMNER, J. W.; VILLASECA, P.; OLSON, J. G. Evidence of rickettsial and leptospira infections in Andean Northern Peru. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v.70, n. 4, p. 357–363, 2004a.

BLAIR, P. J.; JIANG, J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; MENDOZA, L.; VILLASECA, P.; SUMNER, J. W.; RICHARDS, A. L.; OLSON, J.G. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. **Journal of Clinical Microbiology,** 42, n. 11, p. 4961–4967, 2004b.

BOERO, J. J. **Las garrapatas de la República Argentina (Acarina:Ixodidae)**. Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires, Depto. Editorial, 1957. 113 p.

BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; BURGDORFER, W.; CORBETT, W. T.; HURLBERT, S. A. Clinical, hematologic, and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. **American Journal of Veterinary Research,** v.6, p. 49-70, 1987.

BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; BURGDOFER, W.; COBERTT, W. T.; HURLBERT, S. A.; STEBBINS, M. E.; CURTINS, B. C.; ALLEN, D. A. Clinical, hematologic and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. **American Journal of Veterinary Research,** v. 49, n. 1, p. 70-76, 1988.

BRITES-NETO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; BRASIL, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F.; VERÍSSIMO, C. J.; BARBIERI, A. R. MAR.; LABRUNA, M. B. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in an area endemic for Brazilian spotted fever. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 22, n. 3, p. 367-372, 2013.

BRITO, D. R. B.; SANTOS, A. C. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. Ectoparasitos em rebanhos de caprinos e ovinos na microrregião do Alto Mearlim e Grajaú, Estado do Maranhão. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v.14, n. 2, p. 59-63, 2005.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 6, p. 1010-1014, 1970.

BURGDORFER, W.; SEXTON, D. J.; GERLOFF, R. K.; ANACKER, R. L R.; PHILIP, N.; THOMAS. L. A. *Rhipicephalus sanguineus*: vector of a new spotted fever group rickettsia in the United States. Infect. Immun., v. 12, p. 205-210, 1975.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L. P.; KRINSKY, W. L.; PHILIP, R. N. ***Rickettsia rhipicephali*: a new spotted fever group rickettsia from the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus***. In: KAZAR, J.; ORMSBEE, R. A.; TARASEVICH, I. V. (Ed.). Rickettsiae and Rickettsial Diseases. Bratislava: House of the Slovak Academy of Sciences, 1978. p. 307-316.

BURGDORFER, W.; HAYES, S. F.; THOMAS, L. A.; LANCASTER, J. L. **A new spotted fever group rickettsia from the lone star tick, *Amblyomma americanum*.** In: BURGDORFER, W.; NACKER, R. L. (Ed.). Rickettsiae and Rickettsial Diseases. New York: Academic Press, 1981. p. 595–602.

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

BURGDORFER, W.; FRIEDHOFF, K. T.; LANCASTER, J. L. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. Susceptibility of small mammals to virulent *Rickettsia rickettsii*. **Bulletin of the World Health Organization,** v.35, n. 2, p. 149-153, 1966.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribuicion de las rickettsiasis en Mexico. **Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 8, p. 13-14, 1947.

CAGE, K. L.; SCHRUMPF, M. E.; KARSTENS, R. H.; BURGDORFER, W.; SCHWAN, T. G. DNA typing of rickettsiae in naturally infected ticks using a polimerase chain reaction/restriction fragment length polimorphism system.**The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 50, n. 2, p. 247-260, 1994.

CANATTO, B. D.; SILVA, E. A.; BERNARDI, F.; MENDES, M. C. N. C.; PARANHOS, N. T.; DIAS, R. A. Caracterização demográfica das populações de cães e gatos supervisionados do município de São Paulo. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 64, n. 6, p. 1515-1523, 2012.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V.; FIGUEIRA, F. C.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silente peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil [in Portuguese]. **Cadernos Saude Pública,** v.22, n. 3, p. 495–501, 2006.

CARLOS, R. S.; MUNIZ NETA, E. S.; SPAGNOL, F. H.; OLIVEIRA, L. L.; DE BRITO, R. L.; ALBUQUERQUE, G. R.; ALMOSNY, N. R. Frequency of antibodies anti-*Ehrlichia canis, Borrelia burgdorferi* and *Dirofilaria immitis* antigens in dogs from microrregion Ilhéus- Itabuna, State of Bahia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 16, n. 3, p. 117-120, 2007.

CASTELLAW, A. H.; SHOWERS, J.; GODDARD, J.; CHENNEY, E. F.; VARELA-STOKES, A. S. Detection of vector-borne agents in lone star ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae), from Mississippi**. Journal of Medical Entomology,** v.47, n. 3, p. 473-476, 2010.

CHILDS, J. E.; PADDOCK, C. D. The ascendancy of *Amblyomma americanum* as a vector of pathogens affecting humans in the United States. **Annual Review of Entomology,** v. 48, p. 307-337, 2003.

CHOI, Y. J.; JANG, W. J.; RYU, J. S.; LEE, S. H.; PARK, K. H.; PAIK, H. S.; KOH, Y. S.; CHOI, M. S.; KIM, I. S. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. **Emerging Infectious Diseases,** v. 11, n. 2, p. 237-244, 2005.

CHOI, Y. J.; LEE, E. M.; PARK, J. M.; LEE, K. M.; HAN, S. H.; KIM, J. K.; LEE, S. H.; SONG, H. J.; CHOI, M. S.; KIM, I. S.; PARK, K. H.; JANG, W. J. Molecular detection of various rickettsiae in mites (Acari: Trombiculidae) in southern Jeolla Province, Korea. **Microbiology and Immunology,** v.51, n. 3, p. 307-12, 2007.

CHOMEKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques,** v. 153, n. 3, p. 532-537, 1993.

CICUTTIN, G. L.; RODRÍGUEZ, V. M.; JADO, I.; ANDA, P. Primera detección de *Rickettsia massiliae* en la Ciudad de Buenos Aires. Resultados preliminares. **Revista Argentina de Zoonosis,** v.1, n.1, p. 8-10, 2004.

COMER, K. M. Rocky Mountain spotted fever. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice,** v.21, n. 1, p. 27-44, 1991.

CONTI-DÍAZ, I. A. Rickettsiosis caused by *Rickettsia conorii* in Uruguay. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 990, p. 264-266, 2003.

CONTI-DÍAZ, I. A.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B. Serological evidence of Rickettsia parkeri as the etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 51, n. 6, p. 337-339, 2009.

COSTA, A. P. **Aspectos epidemiológicos de *Babesia canis*, *Ehrlichia canis* e *Ricktettsia* sp. em cães de ambiente urbano e rural da mesorregião do leste maranhense, microrregião de Chapadinha-MA, Brasil.** 2011. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Maranhão, 2011.

COSTA, A. P.; SILVA, A. B.; COSTA, F. B.; XAVIER, G. S.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; GUERRA, R. M. S. N. C. A survey of ectoparasites infesting urban and rural dogs of Maranhão state, Brazil. **Journal of Medical Entomology,** v. 50, n. 3, p. 674-678, 2013.

COSTA, F. B.; COSTA, A. P.; MARTINS, F. F.; GUERRA, R. M. S. N. C.; LABRUNA, M. B. Presença de carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum* no Estado do Maranhão. In.: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 4., 2013, Bento Gonçalves. **Anais...** Rio Grande do Sul: Infobibos, 2013.

COSTA-JÚNIOR, L. M. C.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K.; RABELO, E. M. L.; ZAHALER-RINDLER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Sero-prevalence and risk indicators for canine ehrlichiosis in three rural areas of Brazil. **Veterinary Journal,** v. 174, n. 3, p. 673-676, 2007.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; RIBEIRO, M. F. B.; REMBECK, K.; RABELO, E. M. L.; ZAHALER-RINDLER, M.; HIRZMANN, J.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Canine babesiosis caused by *Babesia canis vogeli* in rural areas of the Stateof Minas Gerais, Brazil and factors associated with its seroprevalence. **Research in Veterinary Science,** v. 86, p. 257–260, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L. A.; FAUSTINO, M. A. G. Ectoparasitos de cães provenientes de alguns municípios da região metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 13, n. 4, p. 151-154, 2004.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology,** v. 14, p. 30-46, 2009.

DASCH, G. A.; KELLY, D. J.; RICHARDS, A. L.; SANCHEZ, J. L.; RIVES, C. C. Program and abstracts of the Joint Annual Meeting of the American Society of Tropical Medicine and Hygiene and the American Society of Parasitologists, Atlanta, USA. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 49, p. 220, 2003. Supplement, 3.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON JR., J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.

DE SOUSA, R.; EDOUARD-FOURNIER, P.; SANTOS-SILVA, M.; AMARO, F.; BACELLAR, F.; RAOULT, D. Molecular detection of *Rickettsia felis, Rickettsia typhi* and two genotypes closely related to *Bartonella elizabethae.* **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v.75, n. 4, p. 727–31, 2006.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 19, p. 103-108, 1939.

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

DRANCOURT, M.; KELLY, P. J.; REGNERY, R. L.; RAOULT, D. Identification of spotted fever group rickettsiae using polymerase chain reaction and restriction-endonuclease length polymorphism analysis. **Acta Virologica,** v. 36, n. 1, p. 1–6, 1992.

DUH, D.; PETROVEC, M.; TRILAR, T.; PUNDA-POLIĆ, V.; BRADARIĆ, N.; KLISMANIĆ, Z.; AVSIC-ZUPANC, T. A follow-up study on newly recognized spotted fever group rickettsiae in ticks collected in southern Croatia. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 990, p. 149–151, 2003.

DUH, D.; PUNDA-POLIC, V.; AVSIC-ZUPANC, T.; BOUYER, D.; WALKER, D. H.; POPOV, V. L.; JELOVSEK, M.; GRACNER, M.; TRILAR, T.; BRADARIC, N.; KURTTI, T. J.; STRUS, J. *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard- and soft-bodied ticks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 60, n. 4, p. 977–984, 2010.

DUMLER, J. S.; WALKER, D. H. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting and virulence. **The New England Journal of Medicine,** v. 353, n. 6, p. 551-553, 2005.

DUPONT, H. T.; CORNET, J. P.; RAOULT, D. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v.50, n. 3, p. 373–380, 1994.

DURAND, P. La fièvre boutonneuse en Tunisie. In: DURAND, P. **Le rôle du chien comme reservoir de virus dans la fièvre boutonneuse**. [S.L]: Tunisie Médicale, 1930. p. 239–251.

ELFVING, K.; OLSEN, B.; BERGSTROM, S.; WALDENSTROM, J.; LUNDKVIST, A.; SJOSTEDT, A.; MEJLON, H.; NILSSON, K. Dissemination of spotted fever Rickettsia agents in Europe by migrating birds. **Plos One,** v. 5, p. e8572, 2010.

EREMEEVA, M. E.; BOSSERMAN, E. A.; DEMMA, L. J.; ZAMBRANO, M. L.; BLAU, D. M.; DASCH, G. A. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. **Applied And Environmental Microbiology,** v.72, n. 8, p. 5569-5577, 2006.

EREMEEVA, M. E.; ZAMBRANO, M. L.; ANAYA, L.; BEATI, L.; KARPATHY, S. E.; SANTOS-SILVA, M. M.; SALCEDA, B.; MACBETH, D.; OLGUIN, H.; DASCH, G. A.; ARANDA, C. A. Rickettsia rickettsii in Rhipicephalus Ticks, Mexicali, Mexico. Journal of Medical Entomology, v.48, n. 2, p. 418-421, 2011.

ESPEJO-ARENAS, E.; RAOULT, D. First isolates of *Rickettsia conorii* in Spain using a contrifugation-shell vial assay. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 6, p. 1158-1159, 1989.

EUZÉBY, J. Validation list no. 108. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v.56, p. 499-500, 2006.

FERNANDEZ-SOTO, P.; PEREZ-SANCHEZ, R.; DIAZ MARTIN, V.; ENCINAS-GRANDES, A.; ALAMO SANZ, R. *Rickettsia massiliae* in ticks removed from humans in Castilla y Leon, Spain. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases,** v. 25, n. 12, p. 811-813, 2006.

FERRARI, F. A. G.; GODDARD, J.; MORARU, G. M.; SMITH, W. E.; VARELA-STOKES, A. S. Isolation of "Candidatus Rickettsia andeanae" (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Embryonic Cells of Naturally Infected Amblyomma maculatum (Ixodida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology,** v.50, n. 5, p. 1118-1125, 2013.

FERREIRA, C. G. T.; REGO, I. G.; AHID, S. M. M. Parasitismo em humano por *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) em Pau dos Ferros, Rio Grande do Norte, Brasil. **PUBVET,** Londrina, v. 3, n. 1, p. 1-6, 2008.

FERREIRA, C. G. T.; BEZERRA, A. C. D. S.; CARVALHO, O. V.; ALMEIDA, M. R.; MAFRA, C. First occurrence of *Amblyomma ovale* in the state of Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 167-170, 2013.

FIGUEIREDO M. A.; SANTOS, A. C. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. Ectoparasites of wild animals in Maranhão. **Pesquisa Veterinária Brasileira,** v. 30, n. 11, p. 988-990, 2010.

FLORES-MENDOZA, C.; FLORIN, D.; FELICES, V.; POZO, E. J.; GRAF, P. C.; BURRUS, R. G.; RICHARDS, A. L. Detection of Rickettsia parkeri from within Piura, Peru, and the First Reported Presence of *Candidatus* Rickettsia andeanae in the Tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases,** v. 13, n. 7, p. 505-508, 2013.

FORNADEL, C. M.; ZHANG, X.; SMITH, J. D.; PADDOCK, C. D.; ARIAS, J. R.; NORRIS, D. E. High rates of *Rickettsia parkeri* infection in Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) and identification of "*Candidatus* Rickettsia andeanae" from Fairfax County, Virginia. **Vector Borne and Zoonotic Diseases,** v.11, n. 12, p. 1535–1539, 2011.

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

FOURNIER, P. E.; TAKADA, N.; FUJITA, H.; RAOULT, D. *Rickettsia tamurae* sp. nov., isolated from *Amblyomma testudinarium* ticks. . **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 56, p. 1673-1675, 2006.

FOURNIER, P. E. ; RAOULT, D. Bacteriology, Taxonomy and Phylogeny of Rickettsia. In: RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial diseases**. New York: Healthcare. p. 379, 2009.

FUJITA, H.; FOURNIER, P. E.; TAKADA, N.; SAITO, T.; RAOULT, D. *Rickettsia asiatica* sp. nov., isolated in Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 56, p, 2365-2368, 2006.

GALVAO, M. A.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; ZAVALA-CASTRO, J. E.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in the Americas. **Annals of The New York Academy of Sciences,** v. 1078, p. 156-158, 2006.

GARCIA-GARCIA, J. C.; PORTILLO, A.; NUNEZ, M. J.; SANTIBANEZ, S.; CASTRO, B.; OTEO, J. A. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 82, n. 4, p. 691–692, 2010.

GARRISON, L. E.; KELLY, R.; NICHOLSON, W.L.; EREMEEVA, M. E. Tick surveillance notes: *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* from Gordon County. **Georgia Epidemiology *Rep*.**, v. 23, p, 1-2, 2007.

GERARDI, M.; MARTINS, M. M.; NAVA, S.; SZABÓ, M. P. J. Comparing feeding and reproductive parameters of *Amblyomma parvum* tick populations (Acari: Ixodidae) from Brazil and Argentina on various host species. **Veterinary Parasitology,** v. 197 n. 1, p. 312-317, 2013.

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

GODDARD, J.; NORMENT, B. R. Spotted fever group rickettsiae in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology,** v. 23, n. 5, p. 465-472, 1986.

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

GROB, D.; SCHAFER, G. 100th Anniversary of the death of Ricketts: Howard TaylorRicketts (1871–1910). The namesake of the Rickettsiaceae family. **Microbes and Infection,** v. 13, n. 1, p. 10–13, 2011.

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

GUERRA, R. M. S. N. C.; ABREU-SILVA, A. L.; SERRA-FREIRE, N. M. *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) in *Kinosternon scorpioides* (Chelonia: Kinosternidae) in Maranhão state, Brasil. **Entomologia y Vectores,** v. 7, n. 3, p. 335-338, 2000.

GUERRA, R. M. S. N. C.; BRITO, D. R. B. Ixodofauna de mamiferos domesticos da Ilha de Sao Luis, Estado do Maranhao, Brasil. **Entomologia y Vectores,** v.11, n. 3, p. 435-444, 2004.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; AUFRANC, C. R. *Haemaphysalis juxtakochi*, *Ixodes pararicinus* (Ixodidae) and *Otobius megnini* (Argasidae) in relation to the phytogeography of Argentina. **Annales de Parasitologie Humaine et Comparee**, v. 67, n. 3, p. 91-93, 1992.

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

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & applied acarology,** v.40, n. 3, p. 83-100, 2006a.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABO´, M. P. J.; MARTINS, J. R.;D. GONZALEZ-ACUNA.; ESTRADA-PENA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & applied acarology,** v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006b.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. *Ectoparasitos de importância veterinária*. São Paulo: Plêiade, 2001.

GURGEL, C. B. F. M.; COUTINHO, E. R.; FAVORITTO, P. C.; RAMOS, F.; PROQUERE, L. P.; MAGDALENA, C. V.; PRIOLI, L. F. Rickettsiosis investigations: contributions of Brazilian scientists. **Revista Sociedade Brasileira Clinica Medica**, v. 7, p. 256-260, 2009.

HAYES, S. F.; BURGDORFER, W. Ultrastructure of *Rickettsia rhipicephali*, a New Member of the Spotted Fever Group Rickettsiae in Tissues of the Host Vector *Rhipicephalus sanguineus*. **Journal of Bacteriology**, v. 137, n. 1, p. 605-613, 1979.

HILDEBRANDT, A.; FRANKE, J.; MEIER, F.; SACHSE, S.; DORN, W.; STRAUBE E. The potential role of migratory birds in transmission cycles of Babesia spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. **Ticks and Tick-Borne Diseases,** v. 1, n. 2, p. 105–107, 2010.

HOOGSTRAAL, H. Migrating birds and their ectoparasites in relation to disease. **East African Medical Journal,** v. 38, p. 221–226, 1961.

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

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

HORTA, M. C.; CHIEBAO, D. P.; DE SOUZA, D. B.; FERREIRA, F.; PINHEIRO, S. R.; LABRUNA, M. B.; SCHUMAKER, T. T. Prevalence of *Rickettsia felis* in the fl eas *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from two Indian villages in São Paulo Municipality, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1078, p. 361–363, 2006b.

HORTA, M.C.; SABATINI, G. S.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, 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,** v. 10, p. 959-967, 2010.

HUN, L.; TROYO, ADRIANA.; TAYLOR, LIZETH.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. First report of the isolation and molecular characterization of Rickettsia amblyommii and Rickettsia felis in central america. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1395-1397, 2011.

ISHIKURA, M.; ANDO, S.; SHINAGAWA, Y.; MATSUURA, K.; HASEGAWA, S.; NAKAYAMA, T.; FUJITA, H.; WATANABE, M. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae based on *gltA*, 17-kDa, and rOmpA genes amplified by nested PCR from ticks in Japan. **Microbiology and Immunology,** v. 47, n. 11, p. 823-32, 2003.

JIANG, J.; BLAIR, P. J.; FELICES, V.; MORON, C.; CESPEDES, M.; ANAYA, E.; SCHOELER, G. B.; SUMNER, J. W.; OLSON, J. G.; RICHARDS, A. L. Phylogenetic analysis of a novel molecular isolate of spotted fever group Rickettsiae from northern Peru: *Candidatus* Rickettsia andeanae. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1063, p. 337-342, 2005.

JIANG, J.; SOEATMADJI, D. W.; HENRY, K. M.; RATIWAYANTO, S.; BANGS, M. J.; RICHARDS, A. L. *Rickettsia felis* in *Xenopsylla cheopis*, Java, Indonesia. **Emerging Infectious Diseases,** v. 12, n. 8, p. 1281-1283, 2006;

JORGE, R. S. P.; ROCHA, F. L.; JÚNIOR, J. A. M.; MORATO, R. G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e Saúde Pública. **Oecologia Australis,** v. 14, n. 3, p. 686-710, 2010.

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C.; HUXSOLL JR., D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K. Studies on the pathogenesis of *Rickettsia rickettsii* in the dog: clinical and clinicopathologic changes of experimental infection. **American Journal of Veterinary Research,** v. 38, n. 6, p. 851-856, 1977a.

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C.; HUXSOLL Jr, D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K.; CAMPBELL, J. M.; STEPHENSON, E. H. Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of Infectious Diseases,** v. 135, n. 6, p. 911-917, 1977b.

KELLY, D. J.; CARMICHAEL, J. R.; BOOTON, G. C.; POETTER, K. F.; FUERST, P. A. Novel spotted fever group Rickettsiae (SFGR) infecting *Amblyomma americanum* ticks in Ohio, USA. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1063, p. 352-355, 2005.

KRAWCZAK, F. S. **Avaliação da dinâmica da infecção por Rickettsia parkeri cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos Amblyomma ovale Koch, 1844 naturalmente infectados**. 2012. 88 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. S.; SOARES, J. F.; LOPES, S. T. Serological survey on Ehrlichia sp. among dogs in the central region of Rio Grande do Sul. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology,** v. 21, n. 4, p. 415-417, 2012.

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 and Vectors.** v. 7, n. 7, p. 1-7. 2014.

LABRUNA, M. B.; HOMEM, V. S.; HEINEMANN, M. B.; FERREIRA NETO, J. S. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruará, eastern Amazon, Brazil. **Journal of medical entomology,** v. 37, n. 5, p. 774-776, 2000.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapato em cães no Brasil. **Clínica Veterinária,** v. 30, p. 24-31, 2001.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES JR., J. S.; PACHECO, R. C.; PINTER, A.; GENNARI, S. M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 53, n. 5, p.553-556, 2001.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo Brazil. **Veterinary Parasitology,** v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH,T.; 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, 2004b.

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

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

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JACOMO, A. H. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS JR, T. S.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; GOMES, A. A. B.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C. R. BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F. V.; MORATO, R. L. G.; ALHO, C. J. R.; PINTER, A.; PATRICIA, M. F.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, p. 149–163, 2005b.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T. S.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, p. 17-32, 2005c.

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. **Microbial Ecology,** v. 54, n. 1, p. 126-133, 2007a.

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

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. Prevalence of Rickettsia infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, western Amazon, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249-255, 2007c.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of larval stages of Amblyomma aureolatum, Amblyomma cajennense, and Rhipicephalus sanguineus to infection by Rickettsia rickettsii. **Journal of Medical Entomology,** v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008.

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.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging Infectious Diseases,** v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

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

LABRUNA, M. B.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; CABRERA, R.R. Cross-matingexperiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology,** v. 54, n. 1, p. 41–49, 2011a.

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

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Cordoba**, v. 16, p. 2435-2457, 2011c.

LACKMAN, D. B.; BELL, E. J.; STOENNER, H. G.; PICKENS, E. G. The Rocky Mountain spotted fever group rickettsias. **Health Laboratory Science,** v. 2, p. 135-141, 1965.

LANE, R. S.; EMMONS, R. W.; DONDERO, D. V.; NELSON, B. C. Ecology of tick borne agents in California: further observations on rickettsiae. In: BURGDORFER, W.; ANACKER, R. L. (Ed.). **Rickettsiae and Rickettsial diseases**. New York: Academic Press, 1981. p. 575–584.

LÉGER, E.; VOURC'H, G.; VIAL, L.; CHEVILLON, C.; MCCOY, K. D. Changing distributions of ticks: causes and consequences. **Experimental and Applied Acarology,** v. 59, n. 1-2, p. 219-244, 2013.

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

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

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

LEVIN, M. L KILLMASTER, L. F.; ZEMTSOVA, G. E. Domestic Dogs (Canis familiaris) as Reservoir Hosts for Rickettsia conorii**. Vector Borne and Zoonotic Diseases,** v. 12, n. 1, p. 28-33, 2012.

LEVIN, M. L.; ZEMTSOVA, G. E.; MONTGOMERY, M.; KILLMASTER, L. F. Effects of homologous and heterologous immunization on the reservoir competence of domestic dogs for Rickettsia conorii (israelensis). **Ticks and Tick-borne Diseases,** v. 5, n. 1, p. 33-40, 2013.

LEYDET, B. F. JR.; LIANG, F. T. Detection of human bacterial pathogens in ticks collected from Louisiana black bears (*Ursus americanus luteolus*). **Ticks and Tick-Borne Diseases,** v. 4, n. 3, p. 191-196, 2013.

LINDGREN, E.; TÄLLEKLINT, L.; POLFELDT, T**.** Impact of climatic change on the northern latitude limit and population den- sity of the disease-transmitting European tick Ixodes ricinus. **Environmental Health Perspectives,** v. 108, n. 2, p. 119-123, 2000.

LOPES, S. G.; ANDRADE, G. V.; COSTA-JÚNIOR, L. M. A first record of *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) parasitizing the lizard *Ameiva ameiva* (Teiidae) in Brazil. **Revista Brasasileira Parasitologia Veterinária,** v. 19, n. 4, p. 262-264, 2010.

LUCE-FEDROW, A.; WRIGHT, C.; GAFF, H. D.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; RICHARDS, A. L. In vitro propagation of *Candidatus* Rickettsia andeanae isolated from *Amblyomma maculatum*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology,** v. 64, n. 1, p. 74-81, 2012.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. **Journal of Medical Entomology,** v. 39, n. 6, p. 809-813, 2002.

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

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

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento das doenças do grupo “tifo exantemático” no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 2, n. 55, p. 191-208, 1957.

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

MARQUEZ, F. J.; MUNIAIN, M. A.; PEREZ, J. M.; PACHON, J. Presence of *Rickettsia felis* in the cat flea from southwestern Europe. **Emerging Infectious Diseases,** v. 8, n. 1, p. 9-91, 2002.

MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever Rickettsia in blood culture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 2, p. 197-199, 1989.

MARTINS, T. F.; SPOLIDORIO, M. G.; BATISTA, T. C. A.; OLIVEIRA, I. A. S.; YOSHINARI, N. H.; LABRUNA, M. B. Ocorrência de carrapatos (Acari: Ixodidae) no município de Goiatins, Tocantins. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 18, n. 2, p. 50-52, 2009.

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

MARTINS, T. F. **Estudo do complexo *Amblyomma cajennense* no Brasil**. 2013. 113 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

MARTINS, T. F.; VENZAL, J. M. ; TERASSINI, F. A.; COSTA, F. B. ; MARCILI, A.; CAMARGO, L. M. A.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Experimental and Applied Acarology.** v. 62, n.1, p. 121-128, 2014.

MASTROPAOLO, M.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. Biological differences between two allopatric populations of *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae) in Argentina. **Experimental and Applied Acarology,** v. 53, n. 4, p. 371-375, 2011.

MATSUMOTO, K.; OGAWA, M.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. **Medical and Veterinary Entomology,** v. 19, n. 3, p. 263-270, 2005.

MAXEY, E. E. Some observations on the so-called Spotted Fever of Idaho. **Medical Sentinel,** v. 10, p. 433-438, 1899.

MCKIEL, Y. A.; BELL, E. J.; LACKMAN, D. B. **Rickettsia canada:** a new member of the typhus group of rickettsiae isolated from Haemaphysalis leporispalustris ticks in Canada. **Canadian Journal Microbiology**, v. 13, p. 503–510, 1967.

MEDLOCK, J. M.; HANSFORD, K. M.; BORMANE, A.; DERDAKOVA, M.; ESTRADA-PEÑA, A.; GEORGE, J. C.; GOLOVLJOVA, I.; JAENSON, T. G.; JENSEN, J. K.; JENSEN, P. M.; KAZIMIROVA, M.; OTEO, J. A.; PAPA, A.; PFISTER, K.; PLANTARD, O.; RANDOLPH, S. E.; RIZZOLI, A.; SANTOS-SILVA, M. M.; SPRONG, H.; VIAL, L.; HENDRICKX, G.; ZELLER, H.; VAN BORTEL, W. Driving forces for changes in geographical distribution of Ixodes ricinus ticks in Europe. **Parasites and Vectors,** v. 6, n. 1, p. 2013.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P. de; MOURA, A. B. de; LAVINA, M. S.; BELATTO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group ***Rickettsia*** infecting ticks (Acari: ***Ixodidae***) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 926-930, 2011.

MEDIANNIKOV, O.; PADDOCK, C. D.; PAROLA, P. Other rickettsiae of possible or undetermined pathogenicity. In: RAOULT, D.; PAROLA, P. (Ed.). **Rickettsial diseases**. New York: Informa Healthcare, 2007. p. 163-177.

MEDIANNIKOV, O.; MATSUMOTO, K.; SAMOYLENKO, I.; DRANCOURT, M.; ROUX, V.; RYDKINA, E.; DAVOUST, B.; TARASEVICH, I.; BROUQUI, P.; FOURNIER, P. E. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology,** v. 58, p. 1635-1639, 2008.

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

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biology Review**, v. 86, p. 379-405, 2011.

MIRANDA, J.; MATTAR, S. Molecular detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia* sp. strain Colombianensi in ticks from Cordoba, Colombia. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v. 5, n. 2, p. 208-212, 2013.

MIXSON, R.*;* CAMPBELL, S. R.*;* GILL, J. S.*;* GINSBERG, H. S.*;* REICHARD, M. V.*;* SCHULZE, T. L.*;* DASCH, G. A. Prevalence of Ehrlichia, Borrelia, and Rickettsial Agents in Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae) Collected from Nine States. **Jounal of Medical Entomology,** v. 43, n. 6, p. 1261-1268, 2006.

MONCAYO, A. C.; COHEN, S. B.; FRITZEN, C. M.; HUANG, E.; YABSLEY, M. J.; FREYE, J. D.; DUNLAP, B. G.; HUANG, J.; MEAD, D. G.; JONES, T.F.; DUNN, J. R. Absence of *Rickettsia rickettsii* and Occurrence of Other Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks from Tennessee**. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 83, n. 3, p. 653-657, 2010.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T.B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A.; MURARO, M. A.; CECÍLIO S. R.; LABRUNA, M. B. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil**. Vector Borne and Zoonotic Diseases,** v. 9, n. 1, p. 73-78, 2009.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica,** v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.

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

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

MOURA-MARTINIANO, N. O.; MACHADO-FERREIRA, E.; CARDOSO, K. M.; GEHRKE, F. S.; AMORIM, M.; FOGAÇA, A. C.; SOARES, C. A.; GAZÊTA, G. S.; SCHUMAKER, T. T. Rickettsia and vector biodiversity of spotted Fever focus, atlantic rain forest biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases,** v. 20, n. 3, p. 498-500, 2014.

NADOLNY, R. M.; WRIGHT, C. L.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W. L.; GAFF, H. D. Ticks and spotted fever group rickettsiae of southeastern Virginia. **Ticks and Tick Borne Diseases,** v. 5, n. 1, p. 53-57, 2014.

NAVA, S.; ELSHENAWY, Y.; EREMEEVA, M. E.; SUMNER, J. W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK, C. D. Rickettsia parkeri in Argentina. **Emerg Infectious of Diseases**. v. 14, n. 12, p. 1894-7, 2008.

NAVA, S.; SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Distribution, hosts, 16S rDNA sequences and philogenetic position of theNeotropical tick Amblyomma parvum (Acari: Ixodidae). **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 102, n. 5, p. 409-425, 2008a.

NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. **Veterinary Parasitology,** v. 190, n. 3-4, p. 547-555, 2012.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; UGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma ajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patino*n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases,** v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NICHOLSON, W. L.; MASTERS, E.; WORMSER, G. P. Preliminary serologic investigation of 'Rickettsia amblyommii' in the aetiology of Southern tick associated rash illness STARI). **Clinical Microbiology and Infection**. v. 15, Supl. 2, p. 235-236, 2009.

NIERI-BASTOS, F. A.; LOPES, M. G.; CANÇADO, P. H.; ROSSA, G. A.; FACCINI, J. L.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Candidatus Rickettsia andeanae, a spotted fever group agent infecting Amblyomma parvum ticks in two Brazilian biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 109, n. 2, p. 259-61. 2014.

OGATA, H.; ROBERT, C.; AUDIC, S.; ROBINEAU, S.; BLANC, G.; FOURNIER, P. E.; RENESTO, P.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D. *Rickettsia felis*, from culture to genome sequencing. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1063, p. 26-34, 2005a.

OGATA, H.; RENESTO, P.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; BLANC, G.; FOURNIER, P. E.; PARINELLO, H.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D. The genome sequence of *Rickettsia felis* identifies the first putative conjugative plasmid in na obligate intracellular parasite. **PLoS Biology,** v. 3, n. 8, p. e248, 2005b.

OGATA, H.; LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; RENESTO, P.; BLANC, G.; ROBERT, C.; FOURNIER, P. E.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracelular pathogens. **PLoS Genet,** v. 2, p. e76.2006. doi:10.1371/journal.pgen.0020076. Disponível em: <http://www.plosgenetics.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pgen.0020076>. Acesso em: 12 set. 2013.

OGDEN, N. H.; LINDSAY, R. L.; SOCKETT, P. N.; MORSHED, M.; ARTSOB, H. Emergence of Lyme disease in Canada. **Canadian Medical Association Journal,** v. 180, n. 12, p. 1221-1224, 2009.

OGDEN, N. H.; MECHAI, S.; MARGOS, G. Changing geographic ranges of ticks and tick-borne pathogens: drivers, mechanisms and consequences for pathogen diversity. **Frontiers Cellular and Infection Microbiology,** v. 3, n. 46, p. 1-11, 2013.

OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; CARDENAS-CALLIRGOS, J. M.; CAPEK, M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. **Ticks and Tick Borne Diseases,** v. 3, n. 4, p. 254-256, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; MARTINS, T.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections in the ticks form wild birds in Paraguay. **Ticks and Tick Borne Diseases,** v. 5, n. 2, p. 83-89, 2014.

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. 2-4, 145- 147, 2013.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting Wild Birds in an Atlantic Forest Area in the State of São Paulo, Brazil, with Isolation of *Rickettsia* from the Tick *Amblyomma longirostre*. **Journal of Medical Entomology,** v. 45, n. 4, p. 770-774, 2008.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in an Atlantic rain forest region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p. 1225–1229, 2009.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; LABRUNA, M. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research,** v. 106, n. 4, p. 809-816, 2010.

OLEGÁRIO, M. M. M.; GERARDI, M.; TSURUTA, S. A.; SZABÓ, M. P. J.; Suitabilityof domestic hosts and life cycle of the tick Amblyomma parvum, Aragão1908 (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology,** v. 179, n 1-3. p. 203-208, 2011.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; SAITO, K. C.; NUNES, E. T.; SZABÓ, M. P. J.; MATHIAS, M. I. C. Comparison of the external morphology of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) ticks from Brazil and Argentina. **Veterinary Parasitology,** v. 129, n. 1-2, p. 139-147, 2005.

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

ONOFRIO, V. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F. G.; BARROS-BATTESTI, D. M. Comentários e chaves para as espécies do gênero Amblyomma. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical:** um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Instituto Butantan, 2006a. p. 53-113.

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

PACHECO, R. C.; ARZUA, M.; NIERI-BASTOS, F. A.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J. BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected on Birds in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology,** v. 49, n. 3, p. 710-716, 2012.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of Rickettsia rickettsii from Rhipicephalus sanguineus ticks. **Medical and Veterinary Entomology,** v. 25, n. 2, p. 148-155, 2011a.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABO´, M. P. J.; CATROXO, M. H. B.; BOUYER, D. H.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., Infecting the Tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology,** v. 77, n. 15, p. 5207-5211, 2011.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; NAVA, S.; BRANDAO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma*

parvum ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Experimental Applied Acarology,** v. 43, p. 63-71, 2007.

PACHECO, R. C.; VENZAL, J. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Emerging Infectiuos Diseases,** v. 12, n. 11, p. 1804-1805, 2006.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the Western Hemisphere. **Annals of the New York Academy of Sciences,** v. 1063, p. 315-326, 2005.

PADDOCK, C. D. The science and fiction of emerging rickettsioses. **Annals of The New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 133-143, 2009.

PADDOCK, C. D.; FERNANDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMNER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKI, S. R.; REMONDEGUI, C. E. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 78, n. 4, p. 687-692, 2008.

PADDOCK, C. D.; FOURNIER, P. E.; SUMNER, J. W.; GODDARD, J.; ELSHENAWY, Y.; METCALFE, M. G.; LOFTIS, A. D.; VARELA-STOKES, A. Isolation of *Rickettsia parkeri* and Identification of a Novel Spotted Fever Group Rickettsia sp from Gulf Coast Ticks (*Amblyomma maculatum*) in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 76, n. 9, p. 2689-2696. 2010

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

PADDOCK, C. D.; YABSLEY, M. J. Ecological havoc, the rise of white-tailed deer, and the emergence of Amblyomma americanum-associated zoonoses in the United States. **Current Topics in Microbiology and Immunology,** v. 315, p. 289-324, 2007.

PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; KOSS, T.; SINGLETON JR., J.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; CHERRY, B.; CHILDS, J. E. Rickettsialpox in New York City: a persistent urban zoonosis. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 36-44, 2003.

PARKER, R. R. A pathogenic rickettsia from the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum.* In: THIRD INTERNATIONAL CONGRESS FOR MICROBIOLOGY, 3., 1940, New York. **Proceedings…** New York, NY: International Association of Microbiologists, 1940. p. 390-391.

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

PAROLA, P.; MILLER, R. S.; MCDANIEL, P.; TELFORD, S. R III.; ROLAIN, J. M.; WONGSRICHANALAI, C.; RAOULT, D. Emerging rickettsioses of the Thai-Myanmar border. **Emerging Infectious Diseases,** v. 9, n. 5, p. 592-595, 2003.

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

PAROLA, P.; MATSUMOTO, K.; SOCOLOVSCHI, C.; PARZY, D.; RAOULT, D. A tick-borne rickettsia of the spotted-fever group, similar to *Rickettsia amblyommii*, in French Guyana. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology,** v. 101, n. 2, p. 185-188, 2007.

PAROLA, P.; SOCOLOVSCHI, C.; JEANJEAN, L.; BITAM, I.; FOURNIER, P. E.; SOTTO, A.; LABAUGE, P.; RAOULT, D. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe rickettsioses. **Plos Neglected Tropical Diseases,** v. 2, n. 11, p. e338, 2008.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSCHI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, PIERRE-EDOUARD; RAOULT, D. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the world: a Geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews,** v. 26, n. 4, p. 657-702, 2013.

PATINO, L.; AFAFANADOR, A.; PAUL, J. H. A spotted fever in Tobia, Colombia. Preliminary report. **American Journal Tropical Medicine**, v. 17, p. 639-653, 1937.

PEREZ-OSORIO, C. E.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; ARIAS LEON, J. J.; ZAVALA-CASTRO, J. E. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. **Emerging of Infectious Diseases,** v. 14, p. 1019-1023, 2008.

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

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in western Montana. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v. 30, n. 1, p. 230-238, 1981.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A.; ANACKER, R. L.; CORY, J.; HAYES, S. F.; BURGDORFER, W.; YUNKER, E. *Rickettsia bellii* sp. nov.: a Tick-Borne Rickettsia, widely distributed in the United States, That is distinct from the spotted fever and typhus biogroups. **International Journal of Systematic Bacteriology,** v. 33, n. 1, p. 94-106, 1983.

PHONGMANY, S.; ROLAIN, J. M.; PHETSOUVANH, R.; BLACKSELL, S. D.; SOUKKHASEUM, V.; RASACHACK, B.; PHIASAKHA, K.; SOUKKHASEUM, S.; FRICHITHAVONG, K.; CHU, V.; KEOLOUANGKHOT, V.; MARTINEZ- USSEL, B.; CHANG, K.; DARASAVATH, C.; RATTANAVONG, O.; SISOUPHONE, S.; MAYXAY, M.; VIDAMALY, S.; PAROLA, P.; THAMMAVONG, C.; HEUANGVONGSY, M.; SYHAVONG, B.; RAOULT, D.; WHITE, N. J.; NEWTON, P. N. Rickettsial infections and fever, Vientiane, Laos. **Emerging Infectious Diseases,** v. 12, n. 2, p. 256-262, 2006.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specifi city of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology,** v. 41, n. 3, p. 324-332, 2004.

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.

PINTER, A. DOS. **Aspectos ecológicos da febre maculosa brasileira em um foco endemic do Estado de Sãp Paulo**. 2007. 86 p. Tese (Doutorado em Epidemiolgia Experimental e

Aplicada às Zoonoses) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PINTER, A.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Caderno de Saúde Pública,** v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.

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

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

PORTILLO, A.; GARCIA-GARCIA, C.; SANZ, M. M.; SANTIBÁÑEZ, S.; VENZAL, J. M.; OTEO, J. A. Case Report: A Confirmed Case of *Rickettsia parkeri* Infection in a Traveler from Uruguay. **American Journal of Tropical Medicine and Medicine**. v. 89, n. 6, p. 1203-1205, 2013.

PSAROULAKI, A.; SPYRIDAKI, I.; IOANNIDIS, A.; BABALIS, T.; GIKAS, A.; TSELENTIS, Y. First isolation and identification of *Rickettsia conorii* from ticks collected in the region of Fokida in Central Greece. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 41, n. 7, p. 3317-3319, 2003.

QUEIROGAS, V.L.; MARTINS-OLIVEIRA, L.; LEAL-MARQUES, R.; OLIVEIRA, D.S.F.; SZABÓ, M.P.J. Ticks (Acari: Ixodidae) on domestic dogs in Serra de Caldas Novas State Park, Goiás: epidemiological aspects**. Biota Neotropica,** v.10, n. 1, p. 347-349, 2010.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; MONTOYA, V.; MARTÍNEZ, A.; PÉREZ, J. E.; MERCADO, M.; DE LA OSSA, A.; VÉLEZ, C.; ESTRADA, G.; CORREA, M. I.; DUQUE, L.; ARIZA, J. S.; HENAO, C.; VALBUENA, G.; HIDALGO, M. Molecular detection of Rickettsia felis in different flea species from Caldas, Colombia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene,** v.89, n. 3, p. 453-459, 2013.

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

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v.173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

REIS, F. S.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C.; SANTOS, A. C. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. Ixodidae tick infestation in humans in Maranhão state, Brazil. **Enciclopedia Biosfera,** v. 9, n. 17, p. 3577-3582, 2013.

RIBEIRO, V. L. S.; WEBER, M. A.; FETZER, L. O.; VARGAS, C. R. B. Espécies e prevalência das infestacões por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. **Ciência Rural,** v. 27, n. 2, p. 285-289, 1997.

RICHTER, J.; FOURNIER, P. E.; PETRIDOU, J.; HAUSSINGER, D.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. **Emerging Infectous Diseases,** v. 8, n. 2, p. 207-208, 2002.

RIVAS, J.; TAYLOR, L.; HUN, L.; MOREIRA, A.; CALDERÓN-ARGUEDAS, Ó.; ALVARADO, G.; AVENDAÑO, A.; TROYO, A. Evaluación del potencial patogénico de *Rickettsia amblyommii* en cobayos (*Cavia porcellus*) e inmunidad protectora contra *Rickettsia rickettsia*. **Acta Médica Costarricense,** v. 55, 2013. Suplement, 1. Dispónivel em: < http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0001-60022013000400013&script=sci_arttext>. Acesso em: 12/01/2014.

RODANICHE, E. C. Natural infection of the tick Amblyomma cajennense with Rickettsia rickettsii in Panama. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, p. 696-699, 1953.

RODRIGUES, A. F. S. F.; DAEMON, E. Ixodídeos e sifonápteros em *Cerdocyon thous* L. (Carnivora, Canidae) procedentes da zona da mata mineira, Brasil. **Arquivos do Instituto Biolológico de São Paulo,** v. 71, n. 3, p. 371-372, 2004.

ROMER, Y.; SEIJO, A. C.; CRUDO, F.; NICHOLSON, W. L; VARELA-STOKES, A.; LASH, R. R.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases,** v. 17, p. 1169-1173, 2011.

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

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analisis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). **International Journal of Systematic Evolucionary Microbiology**, v. 50, n. 1, p. 1449-1455, 2000.

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. **Journal of Medical Entomology,** v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010.

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. **American Journal of Tropical Medicine And Hygiene**, v. 9, n. 1, p. 102–108, 2008.

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

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.

SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. F. S.; CADORE, G. C.; HILGER, R. B.; TONIM, R.; PACHECO, R. C.; OGRZEWALSKA, M.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivos Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 63, n. 2, p. 511-514, 2011.

SANTOS-SILVA, M. M.; SOUSA, R.; SANTOS, A. S.; MELO, P.; ENCARNACAO, V.; BACELLAR, F. Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. **Experimental and Applied Acarology,** v. 39 n. 3-4, p. 331-338, 2006.

SARAIVA, D. G.; NIERI-BASTOS, F. A.; HORTA, M. C.; SOARES, H. S. NICOLA, P. A.; PEREIRA, L. C. M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, Northeastern Brazil: isolation, transovarial transmission, and transstadial perpetuation. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases,** v. 13, n. 9, p. 615-618, 2013.

SCHRIEFER, M. E.; SACCI JR., J. B.; DUMLER, J. S.; BULLEN, M. G.; AZAD, A. F. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 32, n. 4, p. 949-54, 1994.

SERRA FREIRE, N. M.; PERALTA, A. S. L.; TEIXEIRA, R. H. F.; GAZETA, G. S.; AMORIM, M. *Amblyomma rotundatum* parasitando Homo sapiens no parque zoobotânico do MPEG e em Itaboraı´. **Arquivos da Sociedade de Zoológicos do Brasil,** v. 16, p. 20, 1995.

SILVA, A. B.; COSTA, A. P.; SÁ, J. C.; COSTA, F. B.; SANTOS, A. C. G.; GUERRA, R. M. S. N. C. Detecção molecular de *Babesia canis vogeli* em cães e em *Rhipicephalus sanguineus* na Mesorregião do Oeste Maranhense, Nordeste Brasileiro. **Ciência Animal Brasileira,** v. 13, n. 3, p. 388-395, 2012.

SILVA, J. N.; ALMEIDA, A. B. P. F.; SORTE, E. C. B.; FREITAS, A. G.; SANTOS, L. G. F.; AGUIAR, D. M.; SOUSA, V. R. F. Soroprevalência de anticorpos anti-*Ehrlichia canis* em cães de Cuiabá, Mato Grosso. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária,** v. 19, n. 2, p. 108-111, 2010.

SILVA, M. E.; RIBEIRO, R. R.; COSTA, J. O.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C., LABRUNA, M.B. Prevalência de anticorpos anti-Rickettsia spp. em cães da cidade de Belo Horizonte, MG. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 62, n. 4, p. 1007-1010, 2010.

SILVA, M. H. S.; SILVA, J. A.; MAGALHÃES, D. F.; SILVA, M. X.; MENESES, J. N. C.; MOREIRA, E. C. Caracterização demográfica e epidemiológica de cães e gatos domiciliados em Barbacena, MG. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia,** v. 62, n. 4, p. 1002-1006, 2010.

SILVA, M. M.; SANTOS, A. S.; FORMOSINHO, P.; BACELLAR, F. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. **Acta Medica Portuguesa**, v. 19, p. 39-48, 2006.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A. G.; FAVACHO, A. R. M.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; DE LEMOS, E. R. S.; KO, A. I. Eschar-associated spotted fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 275-278, 2011.

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

SMITH, M. P.; PONNUSAMY, L.; JIANG, J.; AYYASH, L. A.; RICHARDS, A. L.; APPERSON, C. S. Bacterial pathogens in ixodid ticks from a piedmont county in North Carolina: prevalence of rickettsial organisms. **Vector Borne and Zoonotic Diseases,** v. 10, n. 10, p. 939-52, 2010.

SMITH, R. P.; RAND, P.W.; LACOMBE, E. H.; MORRIS, S. R.; HOLMES, D. W.; DIANE, A.; CAPORALE, D. A. Role of bird migration in the long-distance dispersal of Ixodes dammini, the vector of Lyme disease. **The Journal of Infectious Diseases,** v. 174, n. 1, p. 221-224, 1996.

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUMA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139-151, 2012

SOARES, A. O.; SOUZA, A. D.; FELICIANO, E. A.; RODRIGUES, A. F. S. F.; D'AGOSTO, M.; DAEMON. E. Avaliação ectoparasitológica e hemoparasitológica em cães criados em apartamentos e casas com quintal na cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitolologia Veterinária,** v. 15, n. 1, p. 13-16, 2006.

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

STEVENSON, H. L.; LABRUNA, M. B.; MONTENIERI, J. A.; KOSOY, M. Y.; GAGE, K. L.; WALKER, D. H. Detection of *Rickettsia felis* in a New World flea species, *Anomiopsyllus nudata* (*Siphonaptera: Ctenophthalmidae*). **Journal of Medical Entomology,** v. 42, n. 2, p. 163-167, 2005.

SZABO´, M. P. J.; CUNHA, T. M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental Applied Acarology**. v. 25, p. 909-916. 2001.

SZABÓ, M. P. J.; DE SOUZA, L. G. A.; OLEGÁRIO, M. M. M.; FERREIRA, F. A.; DE ALBUQUERQUE PAJUABA NETO, A. Ticks (Acari: Ixodidae) on dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases,** v. 57. n. 1. p. 72-74. 2010. doi: 10.1111/j.1865-1682.2010.01111.x.

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology,** v. 130, n. 1-2, p. 131-140, 2005.

SZABÓ, M. P.; MARTINS, T. F.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B. A surrogate life cycle of *Amblyomma ovale* Koch, 1844. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 3, n. 4, p. 262-274, 2012.

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 rain forest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology,** v. 140, p. 719–728, 2013a.

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

SZABÓ, M. P. J.; PASCOLI, G. V. T.; JÚNIOR, O. M.; FRANCHIN, A. G.; TORGA, K. Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* parasitizing the bird *Coereba flaveola* in the Brazilian cerrado. **Ciência Rural,** V. 38 n. 2 p. 543 -545, 2008.

SZABÓ, M. P. 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, 2013b. doi: 10.3389/fcimb.00027.

TAYLOR, J. P.; TANNER, W. B.; RAWLINGS, J. A.; BUCK, J.; ELLIOTT, L. B.; DEWLETT, H. J.; TAYLOR, B.; BETZ, T. G. Serological evidence of subclinical Rocky Mountain spotted fever infections in Texas. **Journal of Infectious Diseases, v.** 151, n. 2, p. 367-369, 1985.

TEIXEIRA, R. H. F.; AMORIM, M.; GAZETA, G. S.; SERRA-FREIRE, N. M. Ixodofauna de répteis cativos no Zoológico de Sorocaba, São Paulo, Brasil. **Entomologia y Vectores,** v. 10, n. 3, p. 319-329, 2003.

THRUSFIELD, M. **Veterinary epidemiology**. 3. ed. Oxford: Blackwell Science, 2007. 584 p

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do virus da febre maculosa. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 15, p. 73-86, 1942.

TOMASSONE, L.; CONTE, V.; PARRILLA, G.; MENEGHI, D. Rickettsia Infection in Dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* Ticks, Cochabamba Department, Bolivia. **Vector Borne Zoonotic Diseases,** v. 10, n. 10, p. 953-958, 2010a.

TOMASSONE, L.; NUNEZ, P.; CEBALLOS, L. A.; GÜRTLER, R. E.; KITRON, U.; FARBER, M. Detection of *Candidatus* Rickettsia sp. strain Argentina and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. **Experimental and Applied Acarology,** v. 52, n. 1, p. 93–100, 2010b.

TOMASSONE, L.; NUNEZ, P.; GURTLER, R. E.; CEBALLOS, L. A.; OROZCO, M. M.; KITRON, U. D.; FARBER, M. Molecular detection of *Ehrlichia chaffensis* in *Amblyomma parvum* ticks, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 12, p. 1953-1955, 2008.

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

VENZAL, J. M.; CABRERA, P.; DE SOUZA, C.; FREGUEIRO, C. Las garrapatas del género *Ixodes* (Acari: *Ixodidae*) en Uruguay: su relación con la fauna silvestre y acción como potenciales transmisores de enfermedades. In: JORNADAS SOBRE ANIMALES SILVESTRES, DESARROLLO SUSTENTABLE Y MEDIO AMBIENTE, 2000, Montevideo. [**Proceedings…**]. Montevideo: Facultad de Veterinariap, 2000. p. 55–57.

VENZAL, J. M.; PEREZ-MARTINEZ, L.; FELIX, M. L.; PORTILLO, A.; BLANCO, J. R.; OTEO, J. A. Prevalence of *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*

from Uruguay. **Annals of The New York Academy of Sciences,** v. 1078, p. 305-8, 2006. DOI: 10.1196/annals.1374.056.

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

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

VIEIRA, R. F.; VIEIRA, T. S.; NASCIMENTO, D. D. O. A.; MARTINS, T. F.; KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B.; CHANDRASHEKAR,R.; MARCONDES, M.; BIONDO, A. W.; VIDOTTO, O. Serological survey of Ehrlichia species in dogs, horses and humans: zoonotic scenery in a rural settlement from southern Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo,** v. 55, n. 5, p. 335-340, 2013.

VITALE, G.; MANSUETO, S.; ROLAIN, J. M.; RAOULT, D. *Rickettsia massiliae* human isolation. **Emerging Infectious Diseases,** v. 12, n. 1, p. 174-175, 2006.

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

WELLER, S. J.; BALDRIDGE, G. D.; MUNDERLOH, U. G.; NODA, H.; SIMSER, J.; KURTTI, T. J. Phylogenetic placement of rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis* **Journal of Clinical Microbiology,** v. 36, n. 5, p. 1305–1317, 1998.

WILFERT, C. M.; MACCORMACK, J. N.; KLEEMAN, K.; PHILIP, R. N.; AUSTIN, E.; DICKINSON, V.; TURNER L. Epidemiology of Rocky Mountain spotted fever as determined by active surveillance. **The Journal Infectious Diseases,** v. 150, n. 4, p. 469-79, 1984.

WILLIAMS, S. G.; SACCI JR., J. B.; SCHRIEFER, M. E.; ANDERSEN, E. M.; FUJIOKA, K. K.; SORVILLO, F. J.; BARR, A. R.; AZAD, A. F. Typhus and typhuslike rickettsiae associated with opossums and their fl eas in Los Angeles County, California. **Journal of Clinical Microbiology,** v. 30, n. 7, p. 1758-1762, 1992.

WIKSWO, M. E.; HU, R.; METZGER, M. E.; EREMEEVA, M. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. **Jouranl of Medical Entomology,** v. 44, n. 11, p. 158-162, 2007.

ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; RUIZ-SOSA, J. A.; SANCHEZ-ELIAS, R. A.; BECERRA-CARMONA, G.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan. **Lancet,** v. 356, n. 9235, p. 1079-1080, 2000.

ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; ZAVALA-CASTRO, J. E.; VADO-SOLÍS, I.; RUIZ-SOSA, J. A.; MORON, C. G.; BOUYER, D. H.; WALKER, D. H. Identification of *Ctenocephalides felis* fleas as a host of *Rickettsia felis*, the agent of a spotted fever rickettsiosis in Yucatan, Mexico. **Vector Borne and Zoonotic Diseases,** v. 2, n. 2, p. 69-75, 2002.

ZHANG, X.; REN, X.; NORRIS, D. E.; RASGON, J. L. Distribution and infection frequency of `*Candidatus* Rickettsia amblyommii' in Maryland populations of the lone star tick (*Amblyomma americanum*) and culture in an *Anopheles gambiae* mosquito cell line. **Ticks and Tick Borne Diseases,** v. 3, n. 1, p. 38-42, 2012.

ZNAZEN, A.; ROLAIN, J. M.; HAMMAMI, A.; JEMAA, M. B.; RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection, Tunisia. **Emerging Infectious Diseases,** v. 12, n. 1, p. 138-140, 2006.

APÊNDICES

APÊNDICE A Questionário realizado para conhecer alguns aspectos das condições de criação de cães das mesorregiões (Norte, Sul, Centro, Leste e Oeste) do Estado do Maranhão

Longitude_____ **Latitude_____**

FICHA N°_____ DATA_____

MUNICÍPIO:_____ MESORREGIÃO_____

Zona rural ( ) Zona Urbana ( )

1-Identificação do Proprietário

Nome:.....Telefone.....

Endereço: Rua.....Bairro:.....Cidade:.....

Tipo de residência: ( ) Casa ( ) Apartamento ( ) Outros:.....

.

2-Identificação do Animal

Nome:.....

Raça:.....

Sexo: ( ) Macho ( ) Fêmea

Idade: ( ) ≤1ano ( ) >1ano

Pelagem: ( ) curta ( ) longa

3- Aspectos Sanitários

Seu animal é vacinado? ( ) sim, viroses ( ) sim, viroses e raiva ( ) Apenas a de raiva ( ) outras ( ) não

Seu animal foi vermifugado? ( ) sim ( ) não

Presença de ectoparasita ( ) sim ( ) não

Qual (is)? ( ) Pulga ( ) Carrapato ( ) Piolho ( ) outros

Seu animal já teve carrapatos? ( ) Sim ( ) Não ( ) Não sei

Ele foi tratado? ( ) Sim ( ) Não

O que foi utilizada para acabar com os carrapatos? ( ) Banhos com Carrapaticidas ( ) Sabão comum associado a extração manual ou com pinça ( ) Banhos com remédios caseiros Qual ?

4- Habitat

O cão tem contato com a mãe? ( ) Não ( ) Sim

O animal tem acesso à rua? ( ) Não ( ) Sim

Se positivo, com qual freqüência? ( ) Diário ( ) Semanal ( ) Esporádico

O cão tem contato com espécies silvestres (em fazendas, sítios, etc.)? ( ) Não ( ) Sim

Se positivo, quais animais?.....

Onde o cão passa a maior parte do tempo? ( ) Rua ( ) Quintal ( )Interior da residência

O cão tem contato com roedores? ( ) Não ( ) Sim

Possui outros animais em casa? ( ) Não ( ) Sim

Se positivo, quais? ( ) Cães ( ) Gatos ( ) Aves ( ) Outros

Proximidade de mata? ( ) sim ( ) não

5- Parâmetros Clínicos

Estado Geral do Animal: ( ) bom ( ) ruim ( ) caquético

Conjuntivas ( ) normal ( ) ictérica ( ) pálida ( ) hiperêmica ( ) cianótica

Mucosa Oral ( ) normal ( ) ictérica ( ) pálida ( ) hiperêmica ( ) cianótica

Apresentou doenças reprodutivas? ( ) Não ( ) Sim

Apresenta ou apresentou manifestações neurológicas? ( )Não( ) Sim

Petéquias ( ) Equimoses ( ) Epixtasia ( )

Observações:

_____

_____

Apêndice B. Resultados da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para os cinco antígenos de *Rickettsia* sp seus prováveis antígenos nos municípios de Açailândia, Balsas, Barreirinhas, Caxias, Cururupu, Grajaú, São Bento, Saõ Domingos, Maranhão, Nordeste do Brasil

		Títulos finais de reatividade para antígenos de *Rickettsia*					
Soros	Município/Área	*R. rickettsii*	*R. parkeri*	*R. amblyommii*	*R. rhipicephalii*	*R. bellii*	PA*
108	Balsas/Rural	-	-	-	512	-	*R. rhipicephalii*
145	Balsas/Rural	-	-	256	1024	-	*R. rhipicephalii*
161	Balsas/Rural	64	-	128	-	-	
162	Balsas/Rural	-	-	1024	256	-	*Ca.* R. amblyommii
164	Balsas/Rural	-	-	-	128	-	*R. rhipicephalii*
166	Balsas/Rural	256	-	256	512	-	
170	Balsas/Rural	-	-	-	64	-	
176	Balsas/Rural	-	-	256	128	-	
177	Balsas/Rural	-	-	-	64	-	
178	Balsas/Rural	-	64	1024	128	-	*Ca.* R. amblyommii
179	Balsas/Rural	-	-	2048	1024	-	
181	Balsas/Rural	-	-	64	-	-	
200	Balsas/Rural	64	64	4096	2048	-	
220	Grajaú/Urbana	-	-	2048	512	-	*Ca.* R. amblyommii
227	Grajaú/Urbana	128	-	256	128	-	
228	Grajaú/Urbana	128	128	256	128	-	
229	Grajaú/Urbana	-	-	-	64	-	
230	Grajaú/Urbana	-	-	-	64	-	
245	Grajaú/Urbana	-	128	64	-	-	
256	Grajaú/Urbana	-	-	256	64	-	*Ca.* R. amblyommii
287	Grajaú/Urbana	-	-	256	-	-	*Ca.* R. amblyommii
306	Grajaú/Rural	-	-	64	128	-	
325	Grajaú/Rural	128	64	64	256	-	*R. rhipicephalii*
331	Grajaú/Rural	256	256	4096	2048	-	
334	Grajaú/Rural	-	-	1024	1024	-	
335	Grajaú/Rural	256	-	1024	512	-	
340	Grajaú/Rural	64	-	1024	512	-	
350	Grajaú/Rural	256	128	512	512	-	
352	Grajaú/Rural	-	-	256	64	-	*Ca.* R. amblyommii
353	Grajaú/Rural	-	-	128	64	-	
354	Grajaú/Rural	64	64	256	256	-	
356	Grajaú/Rural	-	-	64	64	-	
357	Grajaú/Rural	-	-	64	-	-	
358	Grajaú/Rural	64	-	128	64	-	
359	Grajaú/Rural	64	64	256	64	-	*Ca.* R. amblyommii
360	Grajaú/Rural	128	64	128	256	-	
361	Grajaú/Rural	-	-	-	128	-	*R. rhipicephalii*
364	Grajaú/Rural		-	256	64	-	*Ca.* R. amblyommii
369	Grajaú/Rural	-	-	64	64	-	
372	Grajaú/Rural	-	64	-	128	-	
378	Grajaú/Rural	64	64	1024	512	-	
381	Grajaú/Rural	-	-	-	64	-	
449	Barreirinhas/Urbana	-	-	64	-	-	
479	Barreirinhas/Rural	128	64	64	128	-	
485	Barreirinhas/Rural	-	-	256	256	-	
1452	Barreirinhas/Rural			64			
1528	Barreirinhas/Rural			512			*Ca.* R. amblyommii
510	S.Bento/Urbana	-	-	128	128	-	
513	S.Bento/Urbana	-	-	512	128	-	*Ca.* R. amblyommii
514	S.Bento/Urbana	-	-	512	128	-	*Ca.* R. amblyommii
517	S.Bento/Urbana	128	-	4096	1024	128	*Ca.* R. amblyommii
553	S.Bento/Rural	512	512	4096	1024	-	*Ca.* R. amblyommii
554	S.Bento/Rural	64	64	1024	512	-	
555	S.Bento/Rural	64	-	2048	1024	256	
556	S.Bento/Rural	-	-	2048	1024	256	

557	S.Bento/Rural	512	256	4096	1024	128	*Ca.* R. amblyommii
558	S.Bento/Rural	64	128	4096	1024	-	*Ca.* R. amblyommii
559	S.Bento/Rural	512	1024	8192	4096	64	
560	S.Bento/Rural	512	1024	16384	4096	128	*Ca.* R. amblyommii
561	S.Bento/Rural	1024	256	16384	2048	-	*Ca.* R. amblyommii
562	S.Bento/Rural	256	-	2048	512	-	*Ca.* R. amblyommii
563	S.Bento/Rural	64	-	512	128	-	*Ca.* R. amblyommii
564	S.Bento/Rural	128	-	4096	1024	-	*Ca.* R. amblyommii
568	S.Bento/Rural	64	128	4096	1024	-	*Ca.* R. amblyommii
569	S.Bento/Rural	64	-	2048	512	64	*Ca.* R. amblyommii
572	S.Bento/Rural	-	-	1024	256	-	*Ca.* R. amblyommii
573	S.Bento/Rural	-	-	1024	1024	-	
574	S.Bento/Rural	-	256	8192	2048	-	*Ca.* R. amblyommii
575	S.Bento/Rural	-	64	2048	256	-	*Ca.* R. amblyommii
585	S.Bento/Rural	-	-	1024	512	-	
589	S.Bento/Rural	512	-	16384	4096	-	*Ca.* R. amblyommii
591	S.Bento/Rural	-	-	1024	256	-	*Ca. R.* amblyommii
592	S.Bento/Rural	64	128	1024	256	-	*Ca.* R. amblyommii
593	S.Bento/Rural	256	128	8192	2048	-	*Ca.* R. amblyommii
594	S.Bento/Rural	-	-	512	64	-	*Ca.* R. amblyommii
595	S.Bento/Rural	128	256	512	128	-	
597	S.Bento/Rural	-	256	2048	2048	-	
598	S.Bento/Rural	-	128	2048	512	512	*Ca.* R. amblyommii
601	S.Bento/Rural	-	-	512	128	512	
602	S.Bento/Rural	-	-	512	64	512	
603	S.Bento/Rural	-	-	512	64	128	*Ca.* R. amblyommii
608	S.Bento/Rural	-	-	256	-	-	*Ca.* R. amblyommii
610	S.Bento/Rural	-	-	512	256	-	
611	S.Bento/Rural	-	-	2048	1024	128	
612	S.Bento/Rural	-	256	1024	1024	128	
613	S.Bento/Rural	-	64	256	128	-	
614	S.Bento/Rural	64	64	512	128	-	*Ca.* R. amblyommii
615	S.Bento/Rural	-		256	64	-	*Ca.* R. amblyommii
616	S.Bento/Rural	-	128	512	256	-	
617	S.Bento/Rural	-	64	512	128	-	*Ca.* R. amblyommii
618	S.Bento/Rural	-	-	256	-	-	*Ca.* R. amblyommii
619	S.Bento/Rural	-	-	512	256	-	
620	S.Bento/Rural	-	-	-	256	2048	*R. bellii*
622	S.Bento/Rural	-	-	64	128	128	
623	S.Bento/Rural	-	-	64	-	-	
625	S.Bento/Rural	-	-	-	256	256	
628	S.Bento/Rural	128	128	-	512	128	*Ca.* R. amblyommii
631	S.Bento/Rural	256	256	512	1024	1024	
632	S.Bento/Rural	128	64	512	-	-	*Ca.* R. amblyommii
633	S.Bento/Rural	-	-	512	-	-	*Ca.* R. amblyommii
634	S.Bento/Rural	256	64	1024	512	256	
635	S.Bento/Rural	512	128	2048	512	256	*Ca.* R. amblyommii
637	S.Bento/Rural	-	-	256	128	-	
643	S.Bento/Rural	-	-	256	64	-	*Ca.* R. amblyommii
645	S.Bento/Rural	-	-	128	128	-	
657	S.Bento/Rural	-	-	128	128	-	
664	S.Bento/Rural	-	-	512	512	-	
670	S.Bento/Rural	64	128	1024	512	-	
680	S.Bento/Rural	-	-	-	-	128	*R. bellii*
682	S.Bento/Rural	-	-	-	128	-	*R. rhipicephalii*
687	S.Bento/Urbana	-	-	256	256	128	
689	S.Bento/Urbana	-	64	256	128	512	
692	S.Bento/Rural	64	64	512	256	128	
693	S.Bento/Rural	-	-	256	128	64	
695	S.Bento/Urbana	-	-	256	256	-	

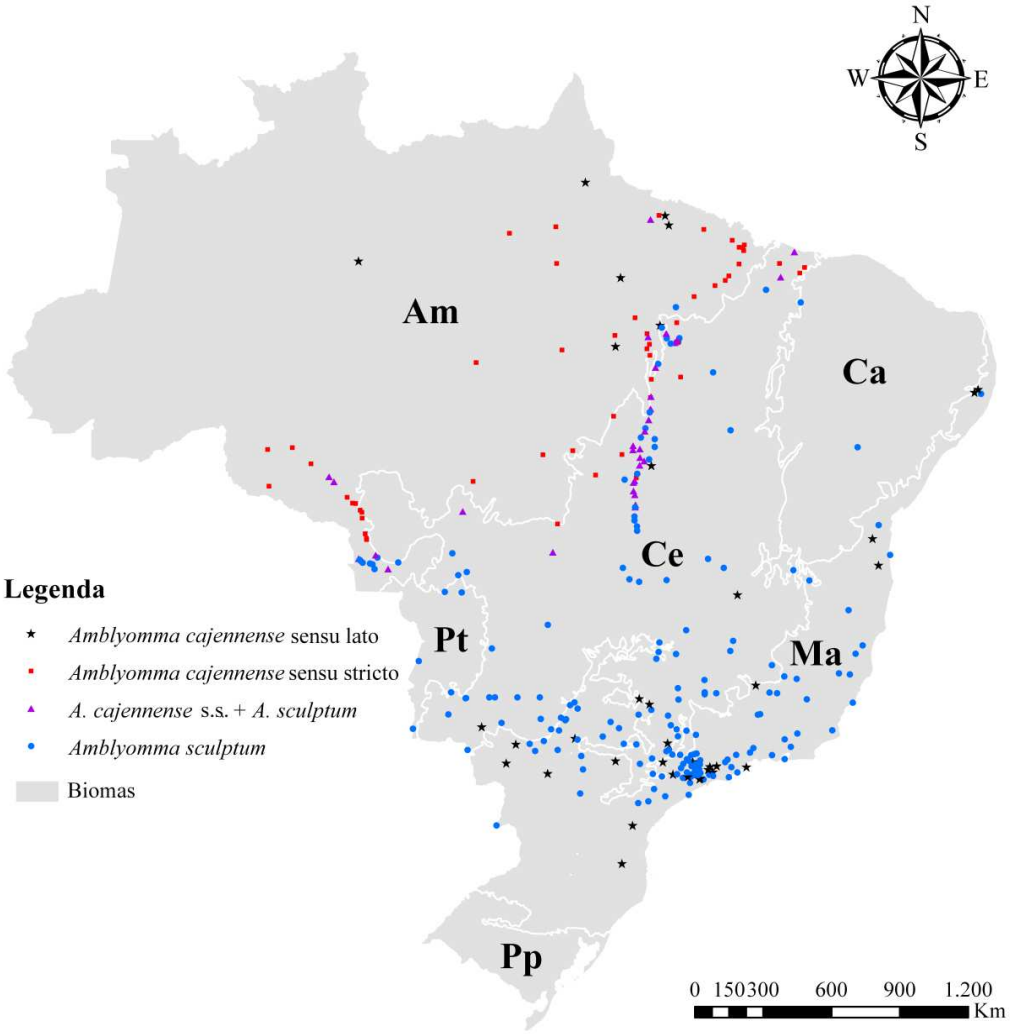
700	S.Bento/Urbana	-	-	128	256	64	
703	S.Bento/Urbana	512	1024	4096	4096	128	
704	S.Bento/Urbana	64	-	2048	512	-	*Ca.* R. amblyommii
705	S.Bento/Urbana	64	-	256	256	4096	*R. bellii*
706	S.Bento/Urbana	512	256	4096	2048	128	
707	S.Bento/Urbana	256	256	1024	256	-	*Ca.* R. amblyommii
709	S.Bento/Urbana	128	64	512	128	-	*Ca.* R. amblyommii
710	S.Bento/Urbana	128	128	512	128	64	*Ca.* R. amblyommii
721	S.Bento/Urbana	-	-	256	128	-	
736	S.Bento/Urbana	-	-	512	256	-	*Ca.* R. amblyommii
758	S.Bento/Urbana	-	-	512	512	-	
759	S.Bento/Urbana	64	64	256	64	256	
763	Cururupu/Rural	-	-	512	128	-	*Ca.* R. amblyommii
764	Cururupu/Rural	256	256	1024	512	-	
766	Cururupu/Rural	64	128	1024	128	256	*Ca.* R. amblyommii
767	Cururupu/Rural	-	-	1024	1024	-	
769	Cururupu/Rural	128	256	2048	512	-	*Ca.* R. amblyommii
801	Cururupu/Urbana		128	512	1024		
804	Cururupu/Urbana	128	256	1024	128	128	*Ca.* R. amblyommii
808	Cururupu/Urbana	64	-	256	128	-	
809	Cururupu/Urbana	-	-	512	512	-	
810	Cururupu/Urbana	-	64	512	64	-	*Ca.* R. amblyommii
811	Cururupu/Urbana	-	-	2048	512	-	*Ca.* R. amblyommii
819	Cururupu/Urbana	-	-	256	-	-	*Ca.* R. amblyommii
824	Cururupu/Urbana	-	-	64	-	-	
835	Cururupu/Urbana			4096	1024	64	*Ca.* R. amblyommii
836	Cururupu/Urbana	64	128	512	-	-	*Ca.* R. amblyommii
837	Cururupu/Urbana	-	-	128	128	64	
867	Cururupu/Urbana	-	-			64	
879	Cururupu/Urbana	-	-	-	-	256	*R. bellii*
898	Cururupu/Urbana	-	-	128	64		
914	Cururupu/Rural	-	-	512	128	128	*Ca.* R. amblyommii
920	Cururupu/Rural	-	-	-	-	256	*R. bellii*
1014	Caxias/Rural	-	-	1024	128	-	*Ca.* R. amblyommii
1016	Caxias/Rural	128	128	1024	256	-	*Ca.* R. amblyommii
1025	Caxias/Rural	-	-	1024	256	-	*Ca.* R. amblyommii
1029	Caxias/Rural	-	-	512	128	-	*Ca.* R. amblyommii
1034	Caxias/Rural	64	64	256	64	-	*Ca.* R. amblyommii
1055	Caxias/Rural	-	-	128	-	-	*Ca.* R. amblyommii
1074	Caxias/Rural	-		1024	256	256	*Ca.* R. amblyommii
1079	Caxias/Rural	-	-	256	-	-	*Ca.* R. amblyommii
1080	Caxias/Rural	-	-	512	-	-	*Ca.* R. amblyommii
1081	Açailândia/Rural	128	128	256	256		
1082	Açailândia/Rural	64	256	256	512	128	
1083	Açailândia/Rural	64	64	1024	128		*Ca.* R. amblyommii
1084	Açailândia/Rural			512	64		*Ca.* R. amblyommii
1086	Açailândia/Rural	128	256	1024	256		*Ca.* R. amblyommii
1088	Açailândia/Rural					128	*R. bellii*
1090	Açailândia/Rural			128			*Ca.* R. amblyommii
1091	Açailândia/Rural					128	*R. bellii*
1094	Açailândia/Rural					128	*R. bellii*
1095	Açailândia/Rural	128	256	1024	512	64	
1096	Açailândia/Rural			512	256		
1099	Açailãndia/Rural			64			
1101	Açailândia/Rural			512	256		
1109	Açailândia/Rural					256	*R. bellii*
1117	Açailândia/Urbana					1024	*R. bellii*
1140	Açailândia/Urbana					64	
1142	Açailândia/Urbana					64	
1144	Açailândia/Urbana					64	

1145	Açailândia/Urbana				64		
1152	Açailândia/Urbana			64			
1153	Açailândia/Urbana			64		64	
1156	Açailândia/Urban			512			*Ca.* R. amblyommii
1157	Açailândia/Urbana					64	
1162	Açailândia/Urbana			1024	512		
1163	Açailândia/Urbana			1024	1024		
1170	Açailândia/Urbana					256	*R. bellii*
1185	Açailândia/Urbana	1024	512	512	512		
1187	Açailândia/Urbana					64	
1224	Açailândia/Urbana			128			*Ca.* R. amblyommii
1232	Açailândia/Rural				64		
1242	S.Domingos/Rural			512	512		
1249	S.Domingos/Rural			128	64		
1252	S.Domingos/Rural			512	128	64	*Ca.* R. amblyommii
1257	S.Domingos/Rural				128	64	
1266	S.Domingos/Rural					512	*R. bellii*
1363	S.Domingos/Urbana		256				*R. parkeri*
1366	S.Domingos/Urbana		64				
1397	S.Domingos/Urbana		64				
1398	S.Domingos/Urbana		64				

*Provável antígeno; *R Rickettsia*; *Ca Candidatus*

ANEXO

ANEXO A - Mapa do Brasil com os biomas, demonstrando a distribuição geográfica do complexo *Amblyomma cajennense* no país



Fonte: (MARTINS, T. F., 2014)