

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE SAÚDE PÚBLICA

NÁDIA PEREIRA MARTINEZ

Estudo em laboratório sobre a detecção do hábito alimentar
para fases imaturas do carrapato *Amblyomma cajennense*
(Acari: Ixodidae).

SÃO PAULO

2013

Estudo em laboratório sobre a detecção do hábito alimentar para fases imaturas do carrapato *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae).

NÁDIA PEREIRA MARTINEZ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Epidemiologia

Orientador: Prof. Dr. Adriano Pintér dos Santos

São Paulo

2013

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Adriano Pintér pela oportunidade do mestrado e contribuição para a minha formação científica, intelectual e pessoal. Sinto-me privilegiada em ter tido o apoio e a participação generosa em todas as etapas desta pesquisa. Por tudo isso, meu respeito e admiração.

Ao Fabrício do Nascimento por ter sido meu porto seguro.

Às amigas Denise Santa`Ana, Tanila Wood e Karen Almeida, presentes durante a jornada da pós-graduação, por todos momentos confidentes e de grande amizade.

Aos amigos que ganhei e tive o prazer de conviver na Faculdade de Saúde Pública: Paulo Rufalco, Samuel Almeida, Ivy de Sá, Sofia Oliver, Mahmi Fujimori, Leonardo Suveges, Sandra Nagaki, Luiz Faccini, Carlos Gasparoto, Suely Sakaguti, Gabi Carvalho, Sofia Oliveira, Karina Paiva, Naiá Ortelan, Patrícia Santos, Marcio Medeiros, Caio Moreira, Bartira Gorgulho, Sheila Rizzato, Silvânia Caribé, Eduardo Rodrigues e Márcia Tauil, especialmente, pelo aprendizado em grupo e troca de experiências.

À querida Prof.^a Dr.^a Maria Tereza Razollini do departamento de Saúde Ambiental pela oportunidade de estágio PAE.

Aos Professores Dr.^a Maria Ogrzewalska, Dr. José Bracco e Dr. Mauro Marelli pela grande contribuição no período de qualificação deste estudo.

Aos colegas Danilo Saraiva e Felipe Krawczak da FMVZ-USP pela ajuda na obtenção do material genético dos animais.

Ao pesquisador Celso Souza e a Carol Siqueiro da SUCEN pela colaboração na pesquisa. Além dos funcionários Valneide, Arcanjo, Ana, Dr.^a Fernanda, Valéria e Dr. Coutinho que sempre foram muito atenciosos, assim como a colega de laboratório Gabi Takeda.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa (processo n^o 2011/05503-5).

À Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo, por colocar à disposição o biotério e o laboratório para o desenvolvimento do ensaio experimental.

E aqueles que durante o mestrado, por escolha ou ao acaso, me proporcionaram o exercício da convivência. Assim, contribuíram, mesmo que indiretamente, através dos bons frutos dessas relações interpessoais.

Muito Obrigada!

"O maior inimigo do conhecimento não é a ignorância, mas sim a ilusão da verdade".

(Hawking, S. W.)

ABSTRACT

LABORATORY STUDY ON THE DETECTION OF BLOOD MEAL FOR IMMATURE STAGES OF TICK *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). São Paulo, 2013. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo].

The tick *Amblyomma cajennense* is the main vector of the bacterium *Rickettsia rickettsii*, the etiological agent of brazilian spotted fever (BSF). The subadult stages of this arthropod present a low specificity for hosts, which increases the chances of parasitism in humans. In the years of 2011 and 2012, the BSF epidemiological surveillance recorded 140 confirmed cases and 50% case-letality rate, the highest incidence since the regulation of the compulsory notification in the State of São Paulo, in 2001. Furthermore, studies indicate an increase trend for geographical expansion and number of cases of the disease. In order to apply control measures for BSF, the determination of which is the vertebrate hosts for the immature stages of the tick is important to identify the sources of infection of bacteria. Among the scientific literature there was no studies on this scope for ticks of South America. In this study, it was standardized a approach for detection of feeding habits of *A. cajennense*. Briefly, blood samples were collected from the following animal species: chicken, capybara, quail, horse, guinea pig, rabbit, dog and a wild mouse. Then, DNA was extracted from these samples and afterwards tested for PCR amplification using three different pairs of primers for mammals, three for birds, and five for both groups of animals in addition to a specific designed primers for cricetidae rodents. The target gene 12S rDNA, *cyt b* and COI resulted in positive for detection of DNA fragments. PCR was tested thereafter on laboratory fed ticks. Adult *A. cajennense* ticks that were fed on rabbits as larvae and nymphs had the midguts extracted and processed for DNA isolation and underwent PCR amplification. It was possible to identify the host species on 66,7% of tested ticks. The DNA sequencing and comparison of the consensus sequences of all the database sequences (GenBank) allowed the identification at the species level (rabbit), based on 98% similarity.

Keywords: brazilian spotted fever; tick; *Amblyomma*; bloodmeals

RESUMO

ESTUDO EM LABORATÓRIO SOBRE A DETECÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR PARA FASES IMATURAS DO CARRAPATO *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). São Paulo, 2013. [Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013].

O carrapato *Amblyomma cajennense* é o principal vetor da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB). Os estágios imaturos destes artrópodes apresentam uma baixa especificidade para os hospedeiros, o que aumentam as chances de parasitismo em humanos. Nos anos de 2011 e 2012, a vigilância epidemiológica da FMB registrou 140 casos confirmados e letalidade de 50%, a maior incidência desde a regulamentação da notificação compulsória no Estado de São Paulo, em 2001. Além disso, estudos indicam uma tendência de aumento de expansão geográfica e de número de casos da doença. A fim de aplicar medidas de controle para a FMB, a determinação de quais são os animais hospedeiros para as fases imaturas do carrapato é importante para identificar as fontes de infecção de bactérias. Entre a literatura científica não havia estudos sobre esse escopo para carrapatos da América do Sul. Neste estudo, uma abordagem para a detecção de hábito alimentar de *A. cajennense* foi padronizada. Resumidamente, as amostras de sangue foram coletadas a partir das seguintes espécies animais: frango, capivara, codorna, cavalo, cobaia, coelho, cachorro e um camundongo silvestre. Em seguida, o DNA foi extraído a partir destas amostras e, depois, testado para a amplificação por PCR utilizando-se três pares de diferentes oligonucleotídeos iniciadores para mamíferos, três para aves e cinco para os dois grupos de animais, além de oligonucleotídeos iniciadores específicos desenhados para roedores cricetídeos. Os genes alvo 12S rDNA, *cyt b* e COI resultou em positivo para a detecção de fragmentos de DNA. Por PCR foi testado posteriormente em laboratório repastos de carrapatos. Carrapatos adultos de *A. cajennense* que foram alimentados em coelhos quando larvas e ninfas tiveram o intestino extraído e processado para o isolamento de DNA que foi submetido à amplificação por PCR. Foi possível identificar a espécie hospedeira em 66,7% dos carrapatos testados. O sequenciamento de DNA e a comparação das sequências consenso com todas as

sequências do banco de dados (GenBank) permitiu a identificação em nível de espécie (coelho), com base em 98% de similaridade.

Palavras-chave: febre maculosa brasileira; carrapato; *Amblyomma*; hábito alimentar

SÚMARIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	21
	2.1 OBJETIVO GERAL	21
	2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
	3.1 TÉCNICA DE DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO HÁBITO ALIMENTAR .	22
	3.1.1 <i>Primers</i> testados.....	22
	3.1.2 Obtenção do material genético	25
	3.1.3 Extração de DNA e a reação em cadeia pela polimerase (PCR).....	26
	3.1.4 Detecção do hábito alimentar em carrapatos	27
	3.1.5 Processamento dos carrapatos adultos.....	30
	3.1.6 Sequenciamento genômico	32
4	RESULTADOS	33
	4.1 <i>Primers</i> testados e gradiente de temperaturas	33
	4.2 Ensaio Experimental	36
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÕES	50
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	71
	ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO CEP-FMUSP	72
	CURRÍCULOS LATTES	73

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Coelho com a câmara de alimentação para carrapato.....28
- Figura 2** - Cobaia durante a aplicação da câmara de alimentação sobre a pele..28
- Figura 3** - Vista dorsal do carrapato *A. cajennense*, fêmea, no sítio de fixação sobre a parafina acrescido de 200 µl de PBS.31
- Figura 4** - Vista dorsal do carrapato *A. cajennense* fêmea, fixado em parafina acondicionada em uma placa de petri.....31
- Figura 5** - Gel de agarose submetido a eletroforese carregado com produtos da PCR executada com DNA amostral de cão e com o par de *primers* L14841/H15149 submetidos a reação com gradiente de temperaturas de anelamento ($\Delta = 52^{\circ}\text{C}$ a $72,5^{\circ}\text{C}$). Colunas: 1. marcador de peso molecular; colunas 2 a 8 *amplicons* com aproximadamente 360pb na faixa de temperaturas de 52°C a $65,5^{\circ}\text{C}$, respectivamente e colunas de 9 a 12 não apresentando *amplicons*.....33
- Figura 6** - Carrapatos *A. cajennense* adultos mortos por ação de fungos.....37

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Lista de todos os pares de *primers* utilizados neste estudo, o gene e as espécies de animais alvo, assim como o tamanho esperado do material amplificado, com objetivo de identificar a espécie de hospedeiro a partir de amostras de sangue total ou sangue residual coletado de intestinos de carrapatos, através da PCR.....24
- Quadro 2** - Resultado do produto da PCR, segundo par de *primers* (12S-6/12S-9 e L1484/H15149) e amostras utilizadas (1 a 9), a partir do sangue residual de *A. cajennense* alimentados no estágio de larva e ninfa em coelhos.38

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Temperatura máxima e mínima do ciclo de anelamento na reação de PCR com amplificação confirmada para cada par de *primer* testado combinado com as espécies de aves testadas.....35

- Tabela 2** - Temperatura máxima e mínima do ciclo de anelamento na reação de PCR com amplificação confirmada para cada par de *primer* testado combinado com as espécies de mamíferos testadas.....37
- Tabela 3** - Protocolo de PCR preconizado para detecção de hábito alimentar em carrapatos, abaixo estão listados os três diferentes *primers* que devem ser usados e os parâmetros de termociclos para cada um dos *primers*.....45

LISTA DE SIGLAS

BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DNA	Deoxyribonucleic Acid
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FMA	Febre da Mata Atlântica
FMB	Febre Maculosa Brasileira
INPE	Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais
NBCI	National Center for Biotechnology Information
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
rDNA	Ribosomal Deoxyribonucleic Acid
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
TBE	Tris, Borato e EDTA
UR	Umidade relativa
USP	Universidade de São Paulo

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes da ordem dos ácaros pertencentes à subordem metastigmata e somam aproximadamente 879 espécies descritas na ordem Ixodida (NAVA et al. 2009). Cerca de 10% dessas espécies não possuem hospedeiros específicos, cujo hábito alimentar pode incluir o homem e/ou animais domésticos (OLIVER, 1989; HOOGSTRAAL e AESCHLIMANN, 1982). Ectoparasitos hematófagos obrigatórios, os carrapatos veiculam o maior número de agentes infecciosos dentre os artrópodes (ESTRADA-PENÃ e JONGEJAN, 1999; SONENSHINE, 1993).

Em 1906 nos Estados Unidos da America, o cientista Howards Taylor Ricketts foi o primeiro a isolar a bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da doença, localmente, chamada de febre das montanhas rochosas. Além disso, Ricketts definiu a relação do carrapato endêmico da América do norte *Dermacentor andersoni* na transmissão da bactéria (RICKETTS, 1909).

Na região neotropical, poucos micro-organismos patogênicos albergados pela fauna ixodológica são conhecidos, reflexo da escassez de estudos nessa região (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Na lista de carrapatos brasileiros há 61 espécies catalogadas nas famílias Ixodidae e Argasidae, distribuídas em nove gêneros. A família Ixodidae figura como de maior importância em saúde pública e veterinária, dominante, abrange 44 espécies representantes. (DANTAS-TORRES et al. 2009; GUIMARÃES et al. 2001; ARAGÃO e FONSECA, 1961). Dentre essas, 33 espécies de carrapatos conhecidas em território brasileiro pertencem ao gênero *Amblyomma* (DANTAS-TORRES et al. 2009).

No Brasil, até o momento, foram reconhecidas apenas a febre maculosa brasileira (FMB)(GOMES, 1933) e a febre da mata atlântica (FMA) como zoonoses veiculadas por carrapatos (SPOLIDORIO et al., 2010). As espécies de carrapatos *Amblyomma cajennense* (GUEDES et al., 2005) e *Amblyomma aureolatum* (PINTER e LABRUNA, 2006; GOMES, 1933) atuam como vetores da bactéria *R. rickettsii*, enquanto que para a FMA há evidências de que o carrapato *Amblyomma ovale* seja o vetor responsável (SABATINI et al., 2010).

Incriminada pela transmissão da FMB, principal rickettsiose no Brasil (ANGERAMI et al., 2006), a bactéria *R. rickettsii*, gram-negativa e intracelular obrigatória, pertence ao conjunto de bactérias que compõem o grupo da febre maculosa (*R. rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rhipicephali* e *Rickettsia amblyommii*) (FOURNIER e RAOULT, 2007; PHILIP et al., 1978). Além dessa, também já foram detectadas no país as bactérias patogênicas *R. parkeri* (SILVEIRA et al., 2007) e *Rickettsia sp.* - cepa da mata atlântica ou cepa Bahia (SPOLIDORIO et al., 2010) - e outras com possível patogenicidade e/ou patogenicidade desconhecida, como as bactérias *Rickettsia belli* (PACHECO et al., 2007), *R. rhipicephali* (MEDEIROS et al., 2011; LABRUNA et al., 2005), *Rickettsia monreiroi* (PACHECO et al., 2011) e *R. amblyommii* (SARAIVA et al., 2013).

A bactéria *R. rickettsii* já foi detectada a partir do carrapato *A. cajennense* no Brasil, na Colômbia, no Panamá, no México (GUEDES et al., 2005, MCDADE e NEWHOUSE, 1986; HOOGSTRAAL, 1967) e na Argentina (PADOOCK et al. 2008). Sendo essa espécie de carrapato apontada em ensaios experimentais como um vetor competente para a bactéria (TRAVASSOS e VALLEJO 1942; LEMOS-MONTEIRO e FONSECA, 1932; LEMOS-MONTEIRO et al. 1932).

No Brasil, o primeiro registro de caso da doença ocorreu no ano de 1929 em uma área de expansão urbana, compreendendo parte dos bairros da zona central e oeste da capital paulista (GOMES, 1941; DIAS e MARTINS 1939; PIZA et al., 1932). Posteriormente, houve registros de casos nos estados de Minas Gerais (GALVÃO et al., 2003; MAGALHÃES, 1957; MOREIRA e MAGALHÃES, 1939), Rio de Janeiro (TIRIBA, 1972), Bahia (MANCINI et al., 1983) e Espírito Santo (SEXTON, 1993). De acordo com o ministério de saúde do Brasil (2009), a doença reemergiu a partir dos anos 90 após um período sem notificações e recentemente, em áreas não endêmicas dos estados do Paraná, Rio Grande do Sul e Distrito Federal.

A região sudeste do Brasil concentra o maior número de casos da FMB (SILVA e GALVÃO, 2004). De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica – CVE (2013b), nos anos de 2011 e 2012 houve um total de 70 óbitos em 140 casos autóctones confirmados, esse registro representa a maior incidência do agravo no estado de São Paulo desde a regulamentação da notificação compulsória em 2001. Os municípios de Campinas, Piracicaba e Valinhos respondem pela maior incidência

do estado (CVE, 2013a). A falta de conhecimento sobre a epidemiologia da doença por profissionais de saúde é um dos fatores que levam a números subestimados de novos casos, o que dificulta o diagnóstico em expostos (WALKER, 2002).

No período de 2003 a 2008, Katz et al., (2009) descreveram a situação epidemiológica da FMB e os prováveis fatores associados ao risco de infecção no Estado de São Paulo. O estudo foi realizado por análises estatísticas com dados das fichas de investigação epidemiológica dos casos confirmados da doença. Entre as relações de risco para a FMB, os resultados revelaram que para 68,8% dos casos havia relato de parasitismo por carrapato e que 72% dos infectados são do sexo masculino. Quanto ao quadro clínico da FMB, os sintomas febre, cefálea, mialgia e prostração são mais frequentes, enquanto petéquias e exantema, sintomas que melhor caracterizam a doença, aparecem em apenas 37,5% e 40% dos indivíduos acometidos pelo agravo, respectivamente.

A doença ganha destaque entre as outras riquetsioses por apresentar os maiores índices de letalidade (PAROLA et al., 2005), uma vez que antes do desenvolvimento de antibióticos eficazes, as taxas de letalidade atingiam o percentual de 80% (HELMICK et al., 1984; MAGALHÃES, 1952). O tratamento prescreve o uso de antibióticos, como tetraciclinas ou cloranfenicol, mas o sucesso da terapia depende do diagnóstico precoce (CHILDS e PADDOCK, 2002).

Como medida preventiva para o parasitismo por carrapatos, recomendam-se a sinalização das áreas de risco normalmente infestadas pelo carrapato *A. cajennense* (SUCEN, 2002). A roçagem anual, no mês de fevereiro, das gramíneas em pastagens pode contribuir para diminuição do número de carrapatos, uma vez que os ovos do carrapato *A. cajennense* são sensíveis à incidência solar como observado em estudo conduzido por LABRUNA et al. (2001).

As espécies *A. cajennense* e *A. aureolatum* são conhecidas como vetores da bactéria *R. rickettsii* em áreas urbanas e peri-urbanas do estado de São Paulo, aonde a FMB é considerada endêmica. O carrapato *A. cajennense* é associado a populações muito numerosas de alguns dos principais hospedeiros primários como equinos e capivaras no interior paulista (LABRUNA e PEREIRA, 1998; SUCEN, 2002; LEMOS et al., 2001). Enquanto o carrapato *A. aureolatum* utiliza cães como hospedeiro primário na periferia da região metropolitana de São Paulo,

principalmente em áreas de fragmentos degradados da Mata Atlântica (OGRZEWALSKA et al., 2012). No litoral paulista e na Floresta Atlântica submontanhosa o carrapato *A. ovale* tem sido incriminado por transmitir a bactéria *R. parkeri* (SABATINI et al., 2010; SZABÓ et al., 2013).

Embora os carrapatos sejam o principal reservatório de *R. rickettsii* na natureza, a prevalência de infecção é menor que 1% na população desses artrópodes. A possível explicação é dada pela intervenção na fertilidade e/ou interrupção no ciclo vida dos artrópodes após a infecção pela bactéria (NIEBYLSKI et al. 1999).

Acredita-se que outras espécies de rickettsias, inclusive as não patogênicas, influenciem a ecologia da bactéria *R. rickettsii*. Dado que ao infectar pela primeira vez os carrapatos, a bactéria impede o estabelecimento de uma segunda infecção no artrópode (MACALUSO et al, 2002). Apesar de muitas lacunas na história natural da bactéria, sabe-se que os carrapatos contribuem para mantê-la na natureza. De forma vertical, transovariana, onde as fêmeas progenitoras do artrópode infectadas transmitem a bactéria à prole e transestadialmente (BURGDORFER, 1988). A perpetuação do agente infeccioso ocorre pela amplificação horizontal por meio dos hospedeiros vertebrados susceptíveis, servindo como fonte de infecção para a população de carrapatos (RANDOLPH, 1998; COOKSEY et al., 1990).

No Brasil, a bactéria foi detectada pela primeira vez em um gambá *Didelphis sp.* (MOREIRA e MAGALHÃES, 1935). Posteriormente, pela técnica de diagnóstico indireto Weil-felix, pesquisas indicaram a infecção pela bactéria nos animais cão doméstico (*Canis familiares*), cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), coelho (*Sylvilagus brasiliensis*), preá (*Cavia aperea*) e cutia (*Dasyprocta azarae*) (DIAS e MARTINS, 1939; MCDADE e NEWHOUSE, 1986; MOREIRA e MAGALHÃES, 1937). Estudos mais recentes apontam a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (SOUZA et al, 2009) e o gambá (*Didelphis aurita*) como potenciais amplificadores de *R. rickettsii*, mas o papel na manutenção enzoótica da bactéria por outros animais vertebrados ainda é desconhecido (HORTA et al., 2009).

O homem e uma variedade de animais vertebrados também podem ser parasitados pelo carrapato (ARAGÃO, 1936; LABRUNA et al, 2002a; LOPES et al. 1998; PEREIRA et al. 2000) e a ocorrência da FMB está relacionada com a

presença e o parasitismo de *A. cajennense* em humanos (LIMA et al, 1995). Entretanto, o carrapato *A. cajennense* utiliza como fonte de alimentação primária para todos os estádios parasitários, principalmente as antas, capivaras (ARAGÃO, 1936, 1911) e cavalos (LABRUNA et al. 2002b; OLIVEIRA, 1998).

Na região neotropical, pequenos roedores também fazem parte da variedade de animais vertebrados que são encontrados hospedando carrapatos da família Ixodídea, como apontado nas revisões de GUGLIELMONE e NAVA (2011, 2010) e no estudo de VENZALA et al. (2008). Os roedores cricetídeos da subfamília sigmodontinae recebem destaque nessa região, visto que é dominante no continente sul americano (CARLETON e MUSSER, 2005) e também são parasitados pelo carrapato *A. cajennense* (REIS et al., 2008). Abundantes no bioma do Cerrado, as espécies do gênero *Calomys* têm sido descritas como importantes reservatórios para agentes infecciosos na América do Sul (MATTAR et al., 2013; YAHNKE et al, 2001; BORGES et al. 1992; MELLO e TEIXEIRA, 1977). MILAGRES et al. (2013) sugerem a participação de roedores cricetídeos na história natural de rickettsias em municípios do estado de Minas Gerais, atribuindo o foco principal para esses roedores como fonte de infecção natural para os carrapatos. MILAGRES et al., (2010) ainda na mesma região, já haviam apresentado resultados sorológicos positivos para rickettsias do grupo da febre maculosa em animais domésticos e sinantrópicos.

Incriminado como o principal vetor da FMB, o carrapato *A. cajennense* (GUEDES et al., 2005; LIMA et al., 1995; PEREIRA e LABRUNA, 1998; DIAS e MARTINS, 1939) completa uma geração anual e tem quatro estágios de vida: ovo, larva, ninfa e adulto. O artrópode realiza repasto sanguíneo em cada estágio de vida ativo (larva, ninfa e adulto) e para cada estágio de vida pode ser encontrado um hospedeiro diferente. As fases imaturas (larva e ninfa) parasitam um espectro maior de hospedeiros à forma adulta, a qual tem preferência por animais de grande porte (BARROS-BATTESTI et al, 2006).

LABRUNA et al., (2002b) avaliaram infestações naturais de carrapatos em cavalos a fim de correlacionar a dinâmica sazonal e os estágios de vida desses artrópodes, no município de Pirassununga, no estado de São Paulo. A pesquisa envolveu a contagem individual de *A. cajennense* para as três fases parasitárias, a

cada 14 dias por dois anos. Os resultados apresentaram um padrão distinto para cada fase parasitária, com predomínio de larvas de abril a julho, de ninfas de junho a outubro e de adultos entre outubro e março. Contudo, os resultados da distribuição sazonal são similares com outros estudos realizados com o artrópode em vida livre no Rio de Janeiro (SOUZA, 1990; SERRA - FREIRE, 1982) e em Minas Gerais (OLIVEIRA et al., 2000).

Portanto, a determinação dos hospedeiros vertebrados para identificar as fontes de infecção para *R. rickettsii*, ganha importância nos estágios imaturos do carrapato (BARROS-BATTESTI et al. 2006). O desenvolvimento de uma técnica que permita a detecção do hábito alimentar das fases imaturas do carrapato *A. cajennense* é objeto de estudo desta pesquisa, com finalidade de aplicar medidas de controle epidemiológico da FMB.

Para este fim, as pesquisas desenvolvidas no Brasil utilizam a captura de animais vertebrados como metodologia para definir os hospedeiros de diferentes espécies de carrapatos, como o estudo recente desenvolvido no estado de Minas Gerais por SARAIVA et al, (2012) que identificaram pequenos mamíferos silvestres associados a carrapatos. O método adotado consistiu em capturar vertebrados de forma aleatória e buscar ativamente pelos parasitas na pelagem. Assim como esse, a maioria dos estudos que almejam determinar hospedeiros de carrapatos segue o mesmo procedimento.

No entanto, nessa abordagem de pesquisa pressupõe a exposição de animais silvestres ao *stress*, somada a exigência de alta demanda de recursos para uma pequena amostragem. Além disso, apresentam um viés muito importante, pois animais vertebrados não capturados ou amostrados em um inventário faunístico, jamais poderão ser identificados como hospedeiros de uma determinada espécie de carrapato.

Como o objetivo de desenvolver uma metodologia que pudesse identificar o hospedeiro das fases imaturas de carrapatos, sem o viés gerado pela metodologia de captura de animais vertebrados, pesquisadores tentam acessar o sangue residual do intestino de carrapatos em vida livre para identificação do hospedeiro que serviu como fonte de alimento para o estágio de vida precedente (KIRSTEIN e GRAY, 1996; PICHON et al, 2005; CADENAS et al, 2007).

KIRSTEIN e GRAY (1996) mostraram pela primeira vez que é possível acessar sangue residual no intestino de carrapatos de vida livre. Entretanto, a determinação de hábito alimentar através do exame do conteúdo intestinal destes artrópodes esbarra em um desafio. Devido à peculiaridade do ciclo de vida dos carrapatos, as chances de encontrar no solo indivíduos que tenham se alimentado recentemente se torna improvável, pois logo após a alimentação nos estágios de larva e ninfa, a maioria dos carrapatos procuram abrigo no substrato e permanecem imóveis durante todo o processo de ecdise, emergindo então como um novo estágio de vida em busca de hospedeiro.

Assim, a identificação do hábito alimentar em carrapatos, necessariamente deve ter como alvo os indivíduos de estágio de ninfa ou adulto de vida livre, portanto, que já tenham se alimentado pelo menos uma vez durante o período de vida e que estejam em atividade de busca por um novo hospedeiro, comportamento este que permite a captura do artrópode através de técnicas de amostragem do ambiente.

A identificação do hábito alimentar de artrópodes hematófagos abrange inúmeras técnicas moleculares e imunológicas. Dentre as técnicas sorológicas, a reação de precipitina foi um dos testes mais usados para esse fim (WASHINO e TEMPELIS, 1983). O teste de precipitina é baseado na interação entre o sangue ingerido pelo artrópode, suspenso em solução salina, com o anti-soro de espécies conhecidas. A formação de um precipitado branco na reação indica a presença de reação antígeno-anticorpo (WEITZ, 1956), permitindo-se concluir que o sangue encontrado no artrópode pertencera a um animal da mesma espécie utilizada para a produção do anti-soro, embora não seja possível afirmar que a reação seja homóloga, podendo ser portanto uma reação heteróloga comum a diferentes espécies animais que pertençam a um mesmo grupo taxonômico, impossibilitando a identificação do hospedeiro ao nível de espécie, principalmente se tratando de animais silvestres. A técnica requer amostra volumosa e possui baixa sensibilidade, sendo essas as principais limitações aplicadas ao uso (TEMPELIS, 1975).

Quando comparado ao teste de precipitação, o teste imunoenzimático ELISA tem sensibilidade 1000 vezes maior (WASHINO e TEMPELIS, 1983). Os testes de ELISA (revelação indireta e direta) baseiam-se na detecção antígeno-anticorpo

marcados com enzimas, em leitura da absorbância por espectrofotometria. O método indireto exige maior complexidade na execução e depende dos anticorpos de todos os hospedeiros testados (BEIER et al.,1988). O método direto é prático e permite processar um grande número de amostras (EDRISSIAN et al., 1985).

As técnicas imunológicas baseiam-se na utilização da reação antígeno-anticorpo, portanto, só permitem testar hospedeiros conhecidos, para os quais haja disponível anti-soros comerciais ou produzidos pelo próprio laboratório. Além disso, apresentam um resultado heterólogo, apenas distingue por grupos de animais (WASHINO e TEMPELIS, 1983; TEMPELIS, 1975).

Diferentemente, a técnica molecular *polymerase chain reaction* (PCR) e o posterior sequenciamento do DNA amplificado, podem potencialmente detectar qualquer espécie de hospedeiro. Através da análise do DNA sequenciado, é possível a comparação com banco de dados públicos de táxons, ou mesmo comparação com um banco de dados gerados pelo próprio laboratório para espécies endêmicas de uma determinada região. Para as espécies que não tenham disponíveis as sequências de DNA alvo sequenciadas, é possível através de análises genéticas, determinar o grupo a que pertencem (MUKABANA et al, 2002a,2002b).

A principal vantagem do ensaio utilizando biologia molecular sobre os ensaios imunológicos, recai sobre a maior facilidade em conseguir sequências de DNA de diferentes espécies animais quando comparado ao esforço necessário para produzir anticorpos contra o sangue uma determinada espécie. O DNA de diversos animais pode ser encontrado em bancos de genoma de coleções zoológicas de diversos institutos.

Enquanto que para produzir o anti-soro de uma determinada espécie, se faz necessário a captura desta espécie viva para que seja doador de grande quantidade de sangue, que será utilizado na sensibilização de uma cobaia de laboratório. Somado às etapas de pré-adsorção para evitar as reações cruzadas. (BOAKEY et al, 1999).

Há muitas décadas, ensaios imunológicos são utilizados como método de identificação de hospedeiros de insetos hematófagos (CLAUSEN et. al., 1998;

MAGNARELLI, 1977). No entanto, para o grupo dos carrapatos a digestão do sangue residual difere da qual ocorre nos insetos.

A digestão nos carrapatos processa-se de forma intracelular. Após a ingestão do sangue, enzimas eritrolíticas rompem a parede celular de todos os eritrócitos e também leucócitos ingeridos pelo ácaro, liberando grande quantidade de resíduos da degradação de hemoglobina, assim não há no sangue residual encontrado no intestino de carrapatos, eritrócitos íntegros o que inviabiliza a utilização de técnicas imunológicas. No entanto, todo o material liberado das células ingeridas pelo carrapato sofre endocitose pelas células que compõe o endotélio intestinal do carrapato. Nas células endoteliais todo o material retirado das células dos hospedeiros é armazenado em endossomos e sofrem digestão gradualmente durante o processo de ecdise do ácaro. E embora não seja possível encontrar células intactas do hospedeiro no lúmen intestinal, teoricamente é possível acessar DNA do hospedeiro, proveniente principalmente de leucócitos, armazenado nos endossomos das células epiteliais do intestino do carrapato. Por essa razão, tornou-se viável desenvolver pesquisas desse escopo para carrapatos, somente a partir da técnica de detecção de DNA (SONENSHINE, 1993; KIRSTEIN e GRAY, 1999).

MUKABANA et al., (2002a) fizeram uma grande revisão dos estudos progressos de metodologias para o diagnóstico de hábito alimentar em diversos grupos de artrópodes. Concluíram assim, que para o grupo dos carrapatos, o uso da amplificação de parte do gene mitocondrial cytochrome *b* (*cyt b*) apresentou o melhor resultado. Atualmente, as pesquisas realizadas na Europa que buscam detectar o hábito alimentar do carrapato *Ixodes ricinus*, têm usado a amplificação pela PCR de segmentos de genes conservados, tais como o *cyt b* (KIRSTEIN e GRAY, 1996), 18S rRNA (PICHON et al. 2005, 2003) e 12S rDNA (CADENAS et al., 2007; HUMAIR et al., 2007; ESTRADA-PEÑA et al., 2005).

Há apenas três estudos conhecidos para a identificação do hábito alimentar realizados em carrapatos do gênero *Amblyomma*, todos foram realizados com uma espécie endêmica da América do Norte, o carrapato *Amblyomma americanum*. Os dois primeiros são de Allan et al. (2010) e Pierce et al. (2009), que usaram a técnica da PCR para amplificar fragmentos dos genes mitocondrial *cyt b* e ribossomal 18S rRNA, respectivamente, a partir do resquício de sangue do hospedeiro no carrapato.

E o terceiro estudo de WICKRAMASEKARA et al. (2008), inclui a espectrometria de massa para detecção de proteínas do sangue residual do vertebrado no artrópode. Entretanto, a aplicação dessa técnica prevê o sequenciamento de proteínas com maior prevalência do sangue dos hospedeiros. LASKAY et al. (2012) desenvolveram um banco de dados para nove espécies de mamíferos nativos da América do Norte, exclusivamente para que no futuro seja viável a identificação por espectrometria desses hospedeiros listados.

KENT (2009) faz uma extensa revisão de estudos que têm como principal objetivo identificar o hábito alimentar de artrópodes hematófagos. Comparando a amplificação de genes nucleares, ribossomais e mitocondriais, o pesquisador concluiu que o gene *cyt b* responsável pela transcrição do *cythrome b* na mitocôndria é o alvo mais utilizado para a identificação de hábito alimentar. Ngo e Kramer (2003) desenharam oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) que detectam o gene codificador da *cyt b* de forma genérica em mamíferos e aves, que após sequenciamento e comparação com o banco de dados do *GenBank* permite a determinação da espécie animal que foi fonte de alimentação para insetos hematófagos.

O presente estudo é pioneiro na elaboração de uma técnica de identificação de hospedeiro para o carrapato *A. cajennense*. O desenvolvimento deste protocolo de pesquisa teve o aporte de ferramentas da biologia molecular e de um ensaio experimental em laboratório. Incluem-se testes com pares de *primers* com o material genético de espécies animais, potenciais hospedeiros de *A. cajennense*. Seguidos por ensaio experimental, onde a partir do sangue residual do hospedeiro no artrópode, fragmentos dos genes alvos *cyt b*, 12S rDNA e citocromo oxidase I (COI) foram amplificados por PCR e sequenciados para a identificação genômica. Embora estudos como este já tenham sido feitos para o carrapato *A. americanum*, endêmico da América do Norte e para o carrapato *Ixodes ricinus*, endêmico da Europa, não existe qualquer estudo que tenha sido realizado com carrapatos endêmicos da América do Sul.

Este protocolo de pesquisa tem como principal utilidade a identificação do hábito alimentar das fases imaturas do carrapato *A. cajennense*, importante vetor da bactéria *R. rickettsii*, causadora da FMB. A técnica de identificação das espécies de hospedeiros deste carrapato pode ser aplicada efetivamente na vigilância da FMB.

Além disso, contribui de forma importante para o melhor conhecimento da história natural da bactéria e da epidemiologia da doença.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Testar a hipótese de que é possível determinar o hábito alimentar, com resolução de espécie, em carrapatos adultos da espécie *A. cajennense*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar uma lista de *primers* e a temperatura ótima de anelamento na reação da PCR para a detecção de DNA de diferentes animais vertebrados;
- Testar o procedimento de extração e amplificação de DNA a partir de intestinos de carrapatos *A. cajennense* adultos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Técnica de detecção e identificação do hábito alimentar

Em resumo, o estudo para a detecção e identificação de hábito alimentar de *A. cajennense*, teve o respaldo preliminar dos testes de *primers* com ajustes na PCR e ensaio experimental.

Os *primers* com alvos em regiões conservadas do DNA, alguns encontrados na literatura e outros desenhados neste estudo, foram testados para amplificação e detecção por PCR do material genético de nove amostras animais. Os ajustes na PCR contemplaram adequações na temperatura de anelamento e no tempo da extensão de acordo com o tamanho do fragmento.

O ensaio experimental em laboratório, mediante infestação das fases imaturas do carrapato em coelhos, produziu um modelo para testar a identificação a partir do sangue residual desse vertebrado utilizado como hospedeiro pelo artrópode.

3.1.1 *Primers* testados

Os doze pares de *primers* selecionados para o estudo (quadro 1) têm como alvo regiões conservadas do DNA do hospedeiro. Os marcadores dos genes mitocondrial *cyt b*, citocromo oxidase I (COI) e ribossomal 12S rDNA foram usados na PCR, para detecção de hábito alimentar do carrapato.

Reconhecida a importância dos roedores cricetídeos como potenciais reservatórios de agentes infecciosos, associado com a baixa sensibilidade de detecção gerada pelos *primers* testados a partir da literatura, fez-se necessário que duas combinações de dois pares de *primers* específicos para esse grupo fossem desenhados neste estudo, com o programa de computador GENEIOUS® (Biomatters Ltda.). Para tal, foi consultado o banco de dados genômico do site *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), para a busca de fragmentos do marcador molecular *cyt b*, dos seis gêneros de roedores mais frequentes do bioma do cerrado, bioma este de onde o carrapato é nativo, de acordo com a FUNASA, (2002).

Esses roedores pertencem a família cricetidae, denominados como: *Akodon*, *Olygoryzomys*, *Nectomys*, *Calomys*, *Juliomys* e *Oryzomys*.

As sequências encontradas foram alinhadas *in silico* e resultaram em duas combinações de pares de *primers* a partir de duas sequências *forwards*

(fw1-5'-TGRGGACAAATATCHTTCTGAGGGGC-3') (fw2-5'-GGBTTYTCAGTAGATAAAGCCACCCT-3') e uma *reverse* (rv-5'-TCDGGRTCTCCGAGAACATCTGG-3') que atendem especialmente a esse grupo (quadro 1).

Quadro 1 – Lista de todos os pares de *primers* utilizados neste estudo, o gene e as espécies de animais alvo, assim como o tamanho esperado do material amplificado, com objetivo de identificar a espécie de hospedeiro a partir de amostras de sangue total ou sangue residual coletado de intestinos de carrapatos, através da PCR.

Nome do <i>primers</i>	Gene	Sequência primer 5'-3'	Hospedeiro alvo	Tamanho esperado da amplificação	Referência bibliográfica
Passeriforme fw Passeriforme iv	<i>cyt b</i>	GGGAGAAATAGKGTAGGGTTG GGGAGAAATAGKGTAGGGTTG	Pássaros	170 pb	Ngo e Kramer (2003)
Galliforme fw Galliforme iv	<i>cyt b</i>	AITTTGGCTCCCTATTAGCAG GTCCGATGTGAAGGAGATACAGATGAAGAAGAA	Galináceos	210 pb	Ngo e Kramer (2003)
Aves-geral fw Aves-geral iv	<i>cyt b</i>	GACTGTGACAAAAATCCCNTTCCA GGTCTTCATCTYHGGYTTACAAGAC	Aves	500 pb	Cicero e Johnson (2001)
Vf1 fw Vf1 iv	COI	TGTAAAAACGACGGCCAGTTCTCAACCACCCACAAAAGACATTGGC AGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAAGAATCA	Vertebrados	770 pb	Ivanova et al. (2007)
Cyfb1 fw Cyfb1 iv	<i>cyt b</i>	CCATGAGGACAAAATATCATTCTG GGMTTYCAGTAGACAAAGC	Mamíferos	120 pb	Kirsten e Gray (1996)
L14841 fw H15149 iv	<i>cyt b</i>	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	Vertebrados	360pb	Kocher et al. (1989)
Mammal fw Mammal iv	<i>cyt b</i>	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG TGAGTTRTCWGGGTCHCCTA	Mamíferos	650pb	Ngo e Kramer (2003)
12S-6 fw 12S-9 iv	12S rDNA	CAAACTGGGATTAGATACC AGAACAGGCTCCTCTAG	Vertebrados	145pb	Humair et al. (2007)
Micyfb fw Micyfb iv	<i>cyt b</i>	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA GCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	Mamíferos	400pb	Molaei et al. (2006)
Geral fw Geral iv	12S rDNA	CAAACTRGGATTAGATACC ATTAYAGRACAGGCTCCTC	Vertebrados	600pb	Scott et al. (2012)
Cricet fw (1) Cricet iv	<i>cyt b</i>	TGRGGACAAAATATCHTTCTGAGGGGG TCDGGRTRCTCCGAGAACATCTGG	Roedores cricetídeos	740pb	Este estudo
Cricet fw (2) Cricet iv	<i>cyt b</i>	GGBTTCAGTAGATAAAGCCACCCT TCDGGRTRCTCCGAGAACATCTGG	Roedores cricetídeos	260pb	Este estudo

Os *primers* listados foram testados com material genético extraído de sangue total de diversas espécies animais e diversas temperaturas de anelamento para a técnica da PCR.

Dessa maneira, três pares de *primers* foram testados apenas com as amostras de mamíferos (Mammal-fw/Mammal-rv; Mlcytb-fw/Mlcytb-rv; Cytb1-fw/Cytb1-rv), três pares de *primers* apenas com as amostras de aves (Passeriforme-fw/Passeriforme-rv; Galliforme-fw/Galliforme-rv; Aves-geral-fw/Aves-geral-rv) e seis pares de *primers* com os dois grupos animais (L1484/H15149; Geralfw/Geralrv; 12S-6/12S-9; Cricet-fw/Cricet-rv; Cricet2-fw/Cricet-rv; Vf1fw/Vf1rv).

Com intuito de facilitar a interpretação dos resultados, apenas o *primer* senso de cada par será citado no texto, assim representando as combinações de acordo com o quadro 1.

3.1.2 Obtenção do material genético dos animais

Para o teste da PCR com diferentes pares de *primers* foi utilizado material genético extraído a partir de amostras de sangue de diferentes espécies animais. Com esse objetivo, foram incluídas no estudo amostras de nove espécies.

Na pesquisa foram incluídas amostras de material genético extraído a partir de sangue de nove espécies animais: *Hydrochoerus hydrochoeris* (capivara), *Equus caballus* (cavalo), *Canis familiaris* (cão), *Calomys callosus* (camundongo silvestre), *Oryctolagus cuniculus* (coelho), *Cavia porcellus* (cobaia), *Rattus norvegicus* (rato), *Coturnix coturnix* (codorna) e *Gallus domesticus* (frango).

O material genético de alguns animais foi doado pela Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo (USP), sendo estas, as espécies animais capivara, cavalo, cão e de camundongo silvestre. Para o restante dos animais (coelho, cobaia, rato, codorna e frango), sangue total foi colhido a partir de espécimes mantidos no infectório da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) como descrito no protocolo aprovado pelo comitê de ética em experimentação animal da Faculdade de Medicina da USP.

A escolha destes animais vertebrados como fonte de material genético para o teste da PCR deu-se pelo fato de que estas espécies representam grandes grupos de potenciais hospedeiros para o carrapato *A. cajennense* em situações naturais.

Assim tivemos amostradas espécies animais dos grupos: aves (frango e codorna) e entre os mamíferos, lagomorfos (coelho), roedores cavídeos (cobaia e capivara), roedores cricetídeos (camundongo silvestre), roedores murinos (rato), carnívoros (cão) e perissodáctilos (cavalo).

Sendo que dentre estes, roedores cavídeos (SOUZA et al, 2009), roedores cricetídeos (MILAGRES et. al., 2013) e perissodáctilos (LABRUNA et al., 2001) são grupos com especial importância na história natural da febre maculosa brasileira, além de serem grupos que se mostram como potenciais hospedeiros naturais primários para o carrapato *A. cajennense*.

3.1.3 Extração de DNA e a reação em cadeia pela polimerase (PCR)

O sangue total colhido de cada um dos animais teve o material genético extraído utilizando-se os reagentes comerciais DNeasy Blood & Tissue kit® (Qiagen®), seguindo o protocolo de purificação de DNA de sangue e fluídos corpóreos. O DNA extraído foi mantido conservado a -20°C até o momento do ensaio experimental com a PCR.

A PCR foi a técnica escolhida para amplificação de fragmentos de DNA dos animais vertebrados. A reação foi conduzida utilizando-se o kit comercial Master Mix (Qiagen®). A quantidade de reagentes utilizados por microtubo seguiram o protocolo do fabricante que constituiu-se de 12,5 µl de Master mix (Qiagen®); 0,5 µl do *primer forward* à 10 nM; 0,5 µl do *primer reverse* à 10 nM; 9,5 µl de água fornecida no kit comercial e 2 µl de amostra, compondo um volume total de 25 µl. Para o controle negativo da PCR a única alteração consistiu na substituição da amostra por água.

A reação em cadeia foi conduzida em termociclador Mastercycler Gradient® Eppendorf®. O programa de amplificação foi definido como o sugerido pelo fabricante dos reagentes Master Mix, como descrito abaixo:

Iniciando-se o programa com a temperatura de 95°C por 15 minutos para ativação da Taq polimerase. Seguindo-se pela repetição de 35 vezes do seguinte ciclo: 94°C por 45 s para a desnaturação, 62°C ($\nabla \cong \pm 10^\circ\text{C}$) em gradiente de

temperaturas para o anelamento por 45 s e 72°C por 45 s para a extensão. Terminado o ciclo de 35 vezes, seguiu-se um período de extensão a 72°C por 7 minutos e posteriormente as amostras eram mantidas a 14°C até a retirada do aparelho.

A temperatura de anelamento foi selecionada para formar um gradiente de temperatura, onde para cada combinação de amostra e par de *primers*, foram feitas 12 replicatas, sendo que cada uma foi submetida ao termociclo com variação apenas na temperatura de anelamento, sendo estas:: 52°C; 52,3°C; 53,5°C; 55,3°C; 57,5°C; 60,1°C; 62,8°C; 65,5°C; 68°C; 70,1°C; 71,6°C e 72,5°C.

Ao final da reação, uma alíquota de cada amostra (8 µl) foi separada na qual foi adicionado 2 µl do tampão carregador (*blue loading dye*) e o volume final de 10 µl foi aplicado individualmente em poços em gel de agarose [1,5%] previamente preparado com solução de TBE (Tris/ácido bórico/EDTA) e tratado com o revelador GelRed®.

Para a comparação com o padrão de massa, utilizou-se o marcador de massa molecular DNA *Ladder* (Invitrogen®) aplicado sempre na primeira coluna de cada gel. Em seguida, o gel foi submetido à eletroforese pelo intervalo de 40 min. sob corrente elétrica de 0,05 A e tensão de 6v/cm.

Após o término da eletroforese, o gel foi submetido a incidência de luz ultravioleta (UV) em transiluminador DyNA Light Labnet® com o objetivo de revelar fragmentos de DNA amplificados assim como o marcador molecular utilizado.

A imagem do gel sobre a luz UV foi capturada por câmera fotográfica digital. Considerou-se positivo, as amostras que apresentaram bandas de DNA amplificado com peso molecular próximo ao esperado.

3.1.4 Detecção do hábito alimentar em carrapatos

Em condições de laboratório, o ensaio experimental foi conduzido para detecção de hábito alimentar de ninfas de *A. cajennense*. O estudo consistiu-se da

infestação de carrapatos imaturos (larvas e ninfas) em coelhos e na recuperação após o repasto sanguíneo em cada estágio.

Os carrapatos utilizados no ensaio tiveram origem na colônia mantida no biotério da SUCEN- São Paulo/SP. Os carrapatos da colônia são mantidos em laboratório através da alimentação em coelhos (figura 1) e cobaias (figura 2). No processo de repasto sanguíneo, os carrapatos são liberados dentro de câmeras de alimentação confeccionadas de tecido de algodão e coladas na pele dos animais utilizando cola especial para este fim (kamar adhesive glue - Kamar®) (PINTER et al., 2002; NEITZ et al., 1971).



Figura 1 - Coelho com a câmara de alimentação para carrapato.



Figura 2 – Cobaia durante a aplicação da câmara de alimentação sobre a pele.

Para a contagem de ovos, adotou-se os parâmetros do estudo de PRATA et al. (1995a), onde para cada 1g de uma postura há cerca de 16400 ovos. Dessa forma, uma seringa contendo entre 0,2g a 0,3g ou 3000 a 5000 ovos provenientes da colônia de laboratório foram utilizados no ensaio experimental.

Considerando-se que 95% dos ovos da postura eclodem (PRATA et al., 1995b), aproximadamente 4000 larvas de carrapatos foram liberadas sobre um coelho sem a utilização de câmaras, portanto, sem restrição ao sítio de fixação para que fosse possível simular uma situação próxima à natural. Após o repasto sanguíneo as larvas se desprenderam e se desvencilharam do hospedeiro de forma natural e foram recuperados em bandejas posicionadas abaixo das gaiolas, de acordo com protocolo detalhado por PINTER et al. (2004).

Sabe-se que em condições naturais o carrapato *A. cajennense* perfaz uma geração por ano, sendo que as larvas são encontradas nos meses de outono e as ninfas nos meses de inverno (OLIVEIRA et al, 2000).

Portanto as larvas ingurgitadas alimentadas no coelho foram então transferidas para incubadoras B.O.D. (demanda bioquímica de oxigênio) onde permaneceram durante todo o processo de ecdise expostas a umidade relativa do ar superior a 85% e termoperíodos e fotoperíodos de temperatura máxima de 28,5°C entre as 6:10h às 18:39h e luz artificial ligada e temperatura mínima de 17,6°C entre as 18:40h às 6:09h com ausência de luz), mimetizando o período do outono na região centro-oeste do Estado de São Paulo de acordo com os dados disponíveis do Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura (CEPAGRI).

As ninfas provenientes do processo de ecdise foram utilizadas para dar continuidade ao experimento, sendo estas liberadas sobre um coelho, como descrito acima para as larvas. As ninfas ingurgitadas foram recuperadas em bandeja posicionada abaixo da gaiola.

As ninfas ingurgitadas alimentadas no coelho foram então transferidas para incubadoras B.O.D. onde permaneceram durante todo o processo de ecdise expostas a umidade relativa do ar superior a 85% e termoperíodos e fotoperíodos de temperatura máxima de 24,8°C entre as 6:00h às 18:00h e luz artificial ligada e temperatura mínima de 12,3°C entre as 18:01h às 5:59h com ausência de luz, mimetizando o período do inverno na região centro-oeste do Estado de São Paulo de acordo com os dados disponíveis do Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura (CEPAGRI).

Ao término de cada um dos ensaios experimentais, o coelho utilizado no experimento foi eutanasiado com inoculação de dose letal (50 mg/kg de pentobarbital sódico), precedido de indução anestésica com isoflurano (100%) inalatório.

3.1.5 Processamento dos carrapatos adultos

Os carrapatos adultos remanescentes do ensaio experimental para detecção de hábito alimentar foram dissecados individualmente para a extração do intestino, processo que permite o acesso ao sangue residual da alimentação do estágio ninfal do artrópode.

Antes do procedimento de extração do conteúdo intestinal, medidas para minimizar os riscos de contaminação foram adotadas durante a manipulação dos materiais nas dependências do laboratório.

Essas medidas consistem na assepsia da bancada com hipoclorito de sódio, no uso de máscara e luvas e na autoclavagem de todos os utensílios e materiais utilizados na manipulação dos carrapatos, como as placas de petri com parafina, pinças e o tampão fosfato-salino (TBS). As lâminas utilizadas para cortar o carrapato eram lâminas descartáveis e foram utilizadas apenas uma vez por carrapato.

Durante o procedimento de extração intestinal, utilizou-se placas de petri repletas de parafina sólida.

Os carrapatos adultos foram fixados na porção ventral à parafina momentaneamente liquefeita obtida pelo contato com uma pinça exposta ao fogo direto por 10 segundos. (Figuras 3 e 4). Uma vez que a parafina se solidificava o carrapato vivo ficava aprisionado e imóvel.



Figura 3 – Vista dorsal do carrapato *A. cajennense*, fêmea, no sítio de fixação sobre a parafina acrescido de 200 µl de PBS.



Figura 4 – Vista dorsal do carrapato *A. cajennense* fêmea, fixado em parafina acondicionada em uma placa de petri.

As placas de petri com o carrapato já fixado em parafina foram posicionadas sob o microscópio estereoscópico com aumento de 40x, e sobre cada carrapato foi adicionado 200 µl do tampão fosfato-salino (PBS).

Utilizando-se lâmina descartável, uma incisão transversal era feita na borda posterior do idiossoma do carrapato e com uma leve pressão sobre o dorso, parte do intestino era exposto e tracionado para fora do corpo com uma pinça.

O intestino e seu conteúdo de cada um dos carrapatos foi então recolhido com um pipetador com ponteira descartável e transferido para um tubo plástico que já continha o tampão de extração.

Cada amostra teve o DNA extraído, como descrito no subitem 3.1.3. Ao término da extração o material genético foi acondicionado em freezer à -20°C até o momento do uso.

O material genético extraído foi utilizado como amostra para a PCR. Com o objetivo de demonstrar que é possível detectar DNA do hospedeiro a partir de amostra de intestino dos carrapatos *A. cajennense* sabidamente alimentados como ninfas em coelhos, utilizou-se três pares de *primers*. Para a amplificação desse material genético pela técnica da PCR, supracitada no subitem 3.1.3 foi utilizado o par de *primer* 12S-6 com o termociclo ajustado para a mais eficiente temperatura de anelamento testada 55,3°C (ver resultados).

Salienta-se a utilização de controle positivo (DNA amostral a partir do sangue de coelho) durante a PCR para as amostras de conteúdo intestinal do carrapato.

3.1.6 Sequenciamento genômico

As amostras que apresentaram a amplificação de fragmentos de DNA com os *primers* usados pela PCR foram selecionadas e submetidas ao sequenciamento de DNA.

Para tanto, o material amplificado foi purificado com o reagente ExoSAP® – GE (GE Healthcare Life Sciences), de acordo com o protocolo do fabricante.

Em seguida as amostras purificadas foram divididas em dois tubos e acrescidas dos *primers* utilizados na PCR, sendo que um tubo recebeu o *primer* senso e o outro o *primer* antisenso.

Em seguida encaminhou-se as amostras ao Centro de Estudos do Genoma Humano da USP, onde o serviço de sequenciamento é oferecido como rotina, a reação utilizada é a do método didesoxi terminal de acordo com Sanger et al. (1977), com reagentes do Kit BigDye (ABI Prism™ Dye Terminator Cycle Sequencing Reading Reaction – Applied Biosystems).

Com os dados do sequenciamento genômico, os cromatogramas senso e antisenso gerados foram alinhados por amostra, utilizando-se o programa de computador Geneious (Biomatters LDITA.) e as sequências consenso foram alinhadas e comparadas ao banco de dados do *GenBank* no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), usando o programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), (www.ncbi.nlm.nih.gov.library.vu.edu.au/BLAST/).

A identificação considerada de espécie do hospedeiro foi atribuída quando os resultados apresentaram similaridade maior ou igual a 98% para a espécie animal coelho, fonte de alimentação do estágio de ninfa do carrapato *A. cajennense* no ensaio experimental.

4 RESULTADOS

4.1 PRIMERS TESTADOS E GRADIENTE DE TEMPERATURAS

Os *primers* utilizados (quadro 1) para a amplificação por PCR dos fragmentos de DNA foram testados com gradiente de temperaturas de anelamento para as nove amostras animais (capivara, cavalo, cão, calomis, coelho, cobaia, rato, codorna e frango), apontadas no subitem 3.1.2.

Foi classificado como reativo, toda a amostra que apresentou uma banda visível no gel de agarose com o tamanho esperado para aquela combinação de *primers*. Dessa forma, a amplitude da temperatura de anelamento que otimizou a reação específica da PCR, para cada combinação de *primers* e espécie animal, pode ser determinada e identificadas a temperatura de anelamento mínima e máxima.

Como exemplo de análise, a figura exhibe a imagem do gel, submetido a eletroforese, carregado com o material amplificado da amostra de DNA de cão e a utilização dos *primers* L14841/H15149, é possível visualizar bandas de DNA amplificado para as reações que utilizaram a temperatura de anelamento dentro da faixa de 52°C a 65,5°C.

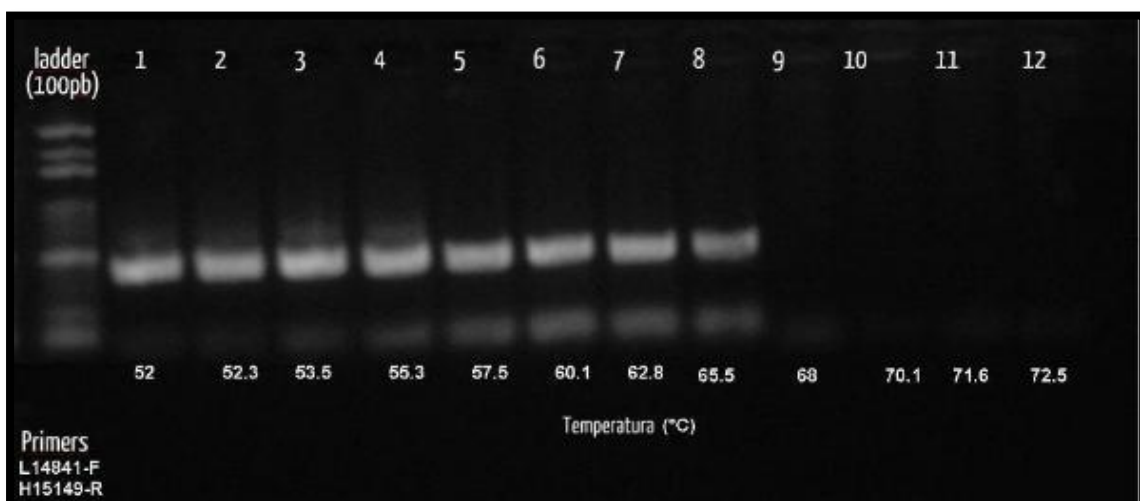


Figura 5 – Gel de agarose submetido a eletroforese carregado com produtos da PCR executada com DNA amostral de cão e com o par de *primers* L14841/H15149 submetidos a reação com gradiente de temperaturas de anelamento ($\Delta = 52^\circ\text{C}$ a $72,5^\circ\text{C}$). Colunas: 1. marcador de peso molecular; colunas 2 a 8 *amplicons* com aproximadamente 360pb na faixa de temperaturas de 52°C a 65,5°C, respectivamente e colunas de 9 a 12 não apresentando *amplicons*.

Os resultados da variação de temperatura para o ciclo de anelamento na reação de PCR que apresentaram amplificação de fragmentos de DNA, para diversas combinações entre pares de *primers* e DNA amostral de vertebrados são apresentados para as aves (tabela 1) e para os mamíferos (tabela 2).

Tabela 1 – Temperatura máxima e mínima do ciclo de anelamento na reação de PCR com amplificação confirmada para cada par de *primer* testado combinado com as espécies de aves testadas.

Amostras	Pares de <i>primers</i> testados com $\Delta T = 52^{\circ}\text{C} - 72,5^{\circ}\text{C}$							
	VF1	Aves-Geral	Galliforme	Passeriforme	12S-6/12S-9	Cricet	L14841/H15149	Geral
Codorna	52 - 60,1	não amplificado	52 - 53,5	não amplificado	52 - 57,5	não amplificado	52 - 65,5	52 - 55,3
Frango	52 - 55,3	não amplificado	52 - 62,8	não amplificado	52 - 60,1	52 - 62,8	52 - 65,5	52 - 55,3

Tabela 2 – Temperatura máxima e mínima do ciclo de anelamento na reação de PCR com amplificação confirmada para cada par de *primer* testado combinado com as espécies de mamíferos testadas.

Amostras	Pares de <i>oligonucleotídeos iniciadores</i> testados com $\Delta T = 52^{\circ}\text{C} - 72,5^{\circ}\text{C}$							
	VF1	Mammal	Cytb1	Mlycytb	12S6-6/12S-9	Cricet1	L14841/H15149	Geral
Cavalo	52 - 57,5	52 - 52,3	não amplificado	52 - 55,3	52 - 57,5	não amplificado	52 - 52,3	52 - 55,3
Coelho	52 - 62,8	52 - 57,5	não amplificado	52 - 53,3	52 - 57,5	52 - 60,1	52 - 60,1	52 - 55,3
Cobaia	52 - 55,3	não amplificado	não amplificado	não amplificado	52 - 57,5	52 - 60,1	52 - 65,5	52 - 57,5
Calomís	52 - 65,5	não amplificado	não amplificado	não amplificado	52	52 - 57,5	não amplificado	52 - 55,3
Cão	52 - 55,3	52 - 55,3	não amplificado	52 - 53,5	52 - 57,5	não amplificado	52 - 60,1	52 - 52,3
Rato	52 - 65,5	52 - 52,3	52 - 60,1	52 - 62,8	52 - 55,3	52 - 62,8	52 - 62,8	52 - 55,3
Capivara	52 - 57,5	52 - 53,5	52 - 57,5	52 - 65,5	52 - 60,1	52 - 62,8	52 - 65,5	52 - 55,3

A análise dos resultados sobre o gradiente de temperatura de anelamento para as diferentes combinações entre espécies animais e *primers*, cuminou a escolha da temperatura de anelamento ideal para cada par de *primers* e do grupo animal alvo, permitindo assim escolher a temperatura mais alta que ainda pudesse amplificar a maior gama de hospedeiros sem gerar reações inespecíficas, evitando assim uma especificidade exagerada, mas mantendo o máximo de sensibilidade, permitindo amplificar com alta eficiência o DNA dos principais grupos de hospedeiros potenciais do carrapato *A. cajennense*

Com base nesses resultados obtidos, os pares de *primers* denominados como Geral, Vf1 e 12S-6 nas reações com temperatura de anelamento de 55,3°C foram classificados como os mais sensíveis dentre os testados, uma vez com uso combinado amplificaram fragmentos de DNA para todas as amostras de hospedeiros vertebrados, independente do grupo animal pertencente.

4.2 ENSAIO EXPERIMENTAL

Das aproximadamente 4000 larvas que iniciaram o experimento tendo sido liberadas para infestar um coelho, foram recuperadas 503 larvas ingurgitadas. Recuperação inferior ao esperado, considerando estudos que indicam uma taxa de 46% (PRATA e SANAFRIA, 1995).

Esperava-se que 95% das larvas ingurgitadas atingissem a ecdise total, de acordo com PRATA et al., (1995b). Entretanto, após o processo de ecdise na incubadora, apenas 120 indivíduos tiveram sucesso no processo de muda tornando-se ninfas, que por sua vez foram liberadas sobre um coelho para o segundo repasto sanguíneo.

Foram recuperadas 50 ninfas ingurgitadas, número próximo ao esperado de acordo com o estudo de PRATA e SANAFRIA, (1995), que obtiveram uma taxa de recuperação de 50% do total inicial de ninfas. As ninfas ingurgitadas foram levadas à incubadora para sofrerem o processo de ecdise para o estágio adulto.

PRATA et al. (1995c) observaram que 95% das ninfas ingurgitadas atingem a ecdise total. Neste estudo, muitos indivíduos não sobreviveram ao processo de muda, e muitos outros foram vitimados pela ação de fungos, como ilustra a figura 6,

somando ao final de todo o processo apenas nove carrapatos vivos em condições de serem utilizados no ensaio experimental de hábito alimentar.

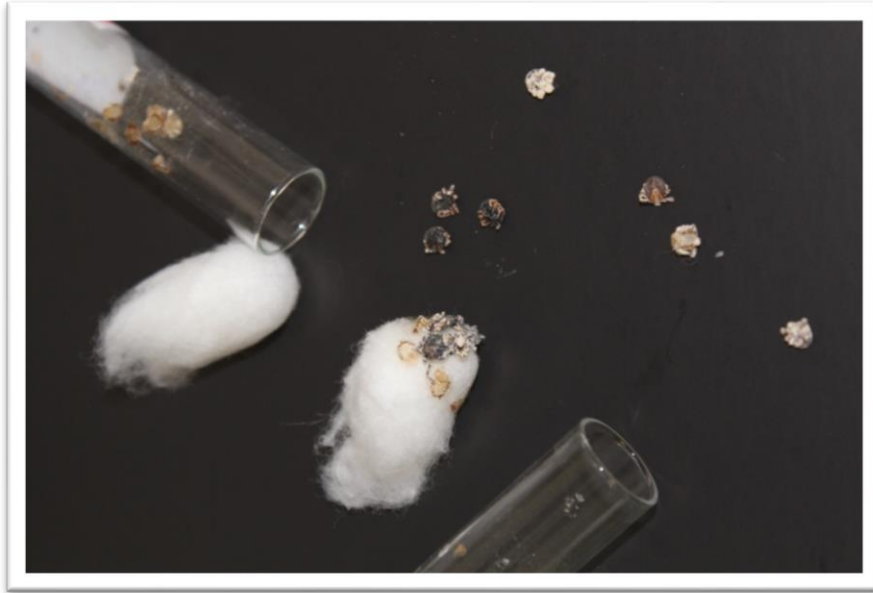


Figura 6 - Carrapatos *A. cajennense* adultos mortos por ação de fungos.

Esses nove carrapatos *A. cajennense* foram submetidos ao processo de retirada do intestino, a técnica foi bem sucedida para todos os nove espécimes.

A extração de DNA foi conduzida como já descrito e o material genético foi armazenado em congelador com sucesso.

Na PCR com o *primer* 12S-6 amostras provenientes de seis carrapatos apresentaram bandas com peso molecular próximo ao tamanho esperado e com concentração suficiente (medida pelo brilho à luz de UV) para serem submetidas à reação de sequenciamento, além do controle positivo (quadro 2).

Quadro 2 – Resultado do produto da PCR, segundo par de primers (12S-6/12S-9) e amostras utilizadas (1 a 9) , a partir do sangue residual de *A. cajemense* alimentados no estágio de lã e ninhã em coelhos.

Nome dos primers	Tamanho esperado da amplificação de DNA por PCR									Controle	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	+	-
12S-6 for 12S-9 rev	140pb	140pb	140pb	140pb	140pb	140pb	140pb	não amplificado	não amplificado	140pb	não amplificado

Os cromatogramas originados pelo sequenciamento genômico das amostras foram primeiramente analisados para a retirada dos *primers* utilizados e das áreas com baixa qualidade, a sequência restante foi alinhada entre o fragmento senso e antisenso de cada uma das amostras, formando assim um fragmento consenso.

Os consensos foram então alinhados contra o banco de dados de nucleotídeos do *GenBank*, sem restrição de espécie ou grupo durante a busca.

Para os fragmentos amplificados pelo primer 12S-6, embora as sequências consenso finais, para cada carrapato, ficassem pequenas (média de 56pb; 46bp-65bp) em relação ao fragmento amplificado (140pb), foi possível conduzir o alinhamento e o resultado entregue pela busca para cada um dos carrapatos foi de 100% de similaridade e E-value máximo de $5,46e-22$, com a espécie coelho (FM164771-*Oryctolagus cuniculus* mitochondrial partial 12S rRNA gene, isolate 1).

5 DISCUSSÃO

As técnicas moleculares têm sido uma importante ferramenta para a compreensão da epidemiologia de zoonoses e das interações entre vetores artrópodes, hospedeiros e patógenos.

A relevância da detecção de hábito alimentar em artrópodes hematófagos está na possibilidade do levantamento de dados sobre a epidemiologia de doenças causadas por agentes etiológicos transmitidas por vetores, conhecer o hospedeiro vertebrado fonte para o repasto sanguíneo de um vetor em uma determinada área pode ser a base para a melhor compreensão da história natural de uma doença. Este tema foi completamente revisada nos estudos de MUKABANA et al, (2002a); KENT (2009) e GOMEZ-DIAZ e FIGUEROLA (2010).

Entretanto, a maioria dos estudos sobre a identificação de hospedeiros vertebrados como fontes de alimento e de possíveis fontes de agentes patogênicos concentram-se em pesquisas desenvolvidas com espécies de mosquitos (ALCAIDE et al., 2009; KENT, 2009; KENT e NORRIS, 2005).

O estudo de hábito alimentar em ixodídeos apresenta um entrave quando comparado ao estudo em insetos hematófagos. Os carrapatos, após o repasto sanguíneo, imediatamente abrigam-se no solo de forma que torna impraticável a coleta de indivíduos ingurgitados no ambiente.

Portanto, estudos de hábito alimentar através de conteúdo intestinal para identificar os hospedeiros de ixodídeos são executados em carrapatos que estejam buscando por hospedeiros, nas fases de ninfa e adulto em vida livre, almejando indentificar a espécie de hospedeiro fonte de alimentação para o estágio de vida precedente ao estágio amostrado.

Além disso, temos que no lúmen intestinal de um carrapato após a ecdise não existe mais hemácias íntegras, sendo que todo o conteúdo de eritrócitos e leucócitos ingeridos pelo carrapato se encontram encapsulados pelas células endoteliais do intestino. Isso faz com que os testes de detecção de DNA sejam a primeira escolha, enquanto que testes imunológicos sejam pouco eficientes devido a ausência de

antígenos íntegros (KIRSTEIN e GRAY, 1996; PICHON et al, 2005; CADENAS et al, 2007; PIERCE et al, 2009; ALLAN et al, 2010).

Embora a identificação do hospedeiro vertebrado ao nível de espécie tenha sido alcançada em poucos estudos (PICHON et al. 2003, 2005; HUMAIR et al. 2007), esta ainda se mostra uma promissora ferramenta para estudos epidemiológicos de doenças vinculadas a carrapatos.

Este estudo descreve pela primeira vez a aplicação de um protocolo para detecção e identificação de hábito alimentar para o carrapato endêmico da região neotropical *A. cajennense*. Sabidamente um importante vetores da bactéria *R. rickettsii*, agente infeccioso da FMB. Assim como a seleção de *primers* e protocolos de PCR com eficiência em amplificar fragmentos de DNA de grupos de animais vertebrados com importância especificamente para esta espécie de carrapato, alguns destes grupos ausentes nas regiões neoártica e paleártica.

O estudo demonstra uma abordagem simples para a identificação de DNA de vertebrados ao nível de espécie em intestino de carrapato em fase não parasitária, através do sequenciamento genômico de *amplicons* resultantes da PCR.

Para a identificação de espécies hospedeiras, o DNA mitocondrial é preferível ao DNA nuclear em função do elevado número de cópias no citoplasma da célula, em contraste com uma única cópia de DNA nuclear. Além disso, pequenas quantidades de DNA de resquícios de repastos sanguíneos requerem a utilização de *primers* sensíveis para a detecção e amplificação pela PCR (NGO e KRAMER, 2003).

Quanto aos marcadores moleculares utilizados neste estudo para a detecção do hospedeiro no carrapato *A. cajennense*, a partir do repasto sanguíneo, apresenta-se o *cyt b* (KOCHER et al. 1989) amplamente utilizado em detecção de hábito alimentar de moscas (STEUBER et al. 2005) e mosquitos (BOAKE et al., 1999; LEE et al. 2002; APPERSON et al. 2002; MEECE et al. 2005; OSHAGHI et al. 2006; RICHARDS et al. 2006; VAN DEN HURK et al. 2007; SAVAGE et al. 2007; HAMER et al. 2008), pela utilização do *primer* L14841 e o marcador 12 rDNA (HUMAIR et al, 2007), com o *primer* 12S-6.

Os marcadores dos genes mitocondriais *cyt b*, COI e genômico 12S rDNA foram utilizados para detecção e amplificação de DNA de nove animais vertebrados, potenciais hospedeiros do carrapato *A. cajennense*, indicadas no subitem 3.1.2.

Dentre os *primers* encontrados na literatura utilizados em nosso estudo, destacamos os que foram desenhados por KOCHER et al. (1989), SCOTT et al. (2012) e IVANOVA et al. (2007), respectivamente para os marcadores *cyt b*, COI e 12S rDNA de vertebrados.

Com abordagem voltada para estudos evolutivos, KOCHER et al. (1989) foram pioneiros no desenvolvimento de *primers* universais, que ao serem utilizados na PCR podem detectar o gene codificador da *cyt b* em mitocôndria de mamíferos, aves, anfíbios, peixes e alguns invertebrados (KOCHER et al, 1989 apud SIMON et al, 1994).

SCOTT et al. (2012) desenharam *primers* para detectar fragmentos de gene 12S rDNA, incluindo espécies hospedeiras relevantes no novo mundo. Os *primers* utilizadas na PCR modificados a partir das sequências dos *primers* desenvolvidos por HUMAIR et al. (2007), que desenharam *primers* para codificar fragmentos da região 12 rDNA de mamíferos e aves conhecidos como fonte de alimentação do carrapato endêmico da região paleártica *Ixodes ricinus*.

Ivanova et al. (2007) foram capazes de desenvolver e testar *primers* para detecção de fragmento de DNA da região do gene COI capaz de amplificar material genético de ictiofauna e também foram utilizados com sucesso no estudo de KENT et al. (2009) para a identificação de hospedeiros mamíferos do mosquito *Culex tarsalis*.

O resultado dos testes em gradiente de temperatura para os *primers* testados combinado com diferentes espécies de vertebrados permitiu o delineamento de um protocolo de trabalho para detecção de hábito alimentar em carrapatos *A. cajennense*.

Foram considerados como *primer* de escolha para o protocolo aqueles que quando utilizados na reação de PCR permitiram a amplificação do material genético alvo para o maior número de espécies de vertebrados combinados com altas temperaturas de anelamento na reação em gradiente.

Esta estratégia permite a utilização de temperaturas de anelamento próximo a 55°C, o que combina as características de sensibilidade e especificidade para a detecção de DNA de animais vertebrados alvo em conteúdo intestinal de carrapatos *A. cajennense*.

Com base no resultado das amostras de nove espécies animais deste protocolo, identificou-se que os *primers* capazes de detectar a maior quantidade de diferentes espécies animais foram o VF1, 12S-6, L1484 e GERAL, sendo ainda que o *primer* Galliforme foi eficiente para frango e codorna.

Entre os *primers* que não demonstraram boa eficiência estão:

Os *primers* Mammal e Mlcytb, pois não houve amplificação de DNA de cobaia e calomis, além de que para o *primer* Mammal, a temperatura de anelamento mais alta que permitiu a amplificação foi inferior à 55°C para cavalo, rato e capivara, enquanto que o para o *primer* Mlcytb foi inferior à 55°C para coelho e cão.

O *primer* Cytb1 falhou em amplificar o material genético alvo de cavalo, coelho, cobaia, calomis e cão.

Para as aves, o *primer* Aves-Geral e Passeriforme falharam em amplificar o material genético alvo de frango e codorna, embora o resultado para o *primer* Passeriforme esteja dentro do esperado, pois nenhuma das espécies testadas neste estudo pertence ao grupo dos Passeriformes.

Devido a abundância de espécies de roedores cricetídeos no Brasil, ao potencial destes animais como hospedeiros de fases imaturas do carrapato *A. cajennense* e ao fato de que os *primers* encontrados na literatura serem pouco eficientes na amplificação de DNA alvo deste grupo, com exceção do *primer* testado VF1. Decidiu-se por desenhar duas combinações de *primers* utilizando-se como referência, sequências de DNA de diferentes espécies de cricetídeos encontrados no Brasil.

O par de *primers* desenhado e testado com sucesso foi chamado de Cricet1, este *primer* também foi capaz de promover amplificação de DNA de coelho, cobaia, rato e capivara e frango, mas não de codorna, cavalo e cão.

O *primer* que apresentou a melhor eficiência em amplificar o DNA alvo dos animais vertebrados foi o VF1, a utilização deste *primer* permitiu amplificar todas as espécies de animais testados, mamíferos e aves e sempre com uma temperatura de anelamento superior à 55°C.

O *primer* 12S-6, foi o segundo mais eficiente em amplificar o DNA alvo dos aniamis vertebrados, foi possível amplificar o DNA de todas as espécies testadas, mamíferos e aves e sempre com uma temperatura de anelamento superior à 55°C, com exceção da espécie calomis, para o qual somente com a temperatura de anelamento à 52°C foi possível executar a amplificação, portanto, este *primer* também é muito eficiente, mas deve ser usado combinado com o *primer* Cricet1.

O *primer* GERAL também foi capaz de promover a amplificação de DNA alvo de todas as espécies, mas para a maioria das amostras, a temperatura de anelamento máxima que promoveu a amplificação foi a de 55,3°C, sendo que para cão, essa foi de 52,3°C, isto mostra que embora este *primer* possa ser utilizado, é necessário uma ótima otimização da reação de PCR e da extração de DNA da amostra para evitar que a reação deixe de funcionar.

O *primer* L14841 foi capaz de promover a amplificação de DNA alvo de todas as espécies, com exceção de calomis. Houve baixa eficiência para a amplificação de DNA de cavalo, sendo que para esta espécie somente as reações utilizando temperaturas de anelamento máxima de 52,3°C obtiveram sucesso na amplificação do DNA alvo.

Estes resultados permitem construir um delineamento experimental para identificação de hospedeiros aplicado ao carrapato *A. cajennense*.

O primeiro passo para esta construção é partir da premissa de que o sistema deve ser redundante, para se tornar mais sensível. Assim, para cada provável grupo de animais alvo, deve-se perfazer duas reações de PCR, com *primers* distintos.

Assim a cominação seria a utilização dos *primers* VF1, 12S-6, Cricet1, sempre com a temperatura de anelamento de 55,3°C e com os demais parâmetros do termociclo como descrito na tabela 3.

Tabela 3 - Protocolo de PCR preconizado para detecção de hábito alimentar em carrapatos, abaixo estão listados os três diferentes *primers* que devem ser usados e os parâmetros de termociclos para cada um dos *primers*.

Parâmetro/ <i>Primer</i>	VF1	12S-6	Cricet1
Denaturação	94°C - 45 s	94°C - 45 s	94°C - 45 s
Anelamento	55°C - 40 s	55°C - 40 s	57°C - 40s
Extensão	72°C - 50 s	72°C - 35 s	72°C - 50s
Repetições	35 vezes	35 vezes	35 vezes
Extensão final	72°C - 7 min	72°C - 7 min	72°C - 7 min
Tamanho <i>amplicon</i>	770 pb	145 pb	740 pb

Como segunda escolha, pode-se utilizar o *primer* L14841, também utilizando-se a temperatura de anelamento de 55,3°C, mas guardando a possibilidade de falha para de amplificação de DNA alvo da espécie cavalo, e com a necessidade de combinação com o *primer* Cricet1.

Para testar a capacidade de amplificar material genético do hospedeiro a partir de carrapatos não alimentados, optou-se pela utilização do *primer* 12S-6, visto que o objetivo estritamente testar a hipótese de que seria possível detectar DNA do hospedeiro em conteúdo intestinal de carrapatos *A. cajennense* adultos sabidamente alimentados em coelhos nos estágios imaturos.

Neste estudo, a forma de obtenção do conteúdo intestinal através da dissecação do artrópode mostrou-se eficiente para a detecção de hábito alimentar. Esse tipo de procedimento também pôde ser encontrado no desenvolvimento de estudo filogenético de carrapatos (MANS et al. 2011), através da dissecação de carrapatos e análise de sangue residual.

O uso do marcador molecular 12S rDNA (HUMAIR et al. 2007), permitiu a amplificação e o sequenciamento de um fragmento de DNA do hospedeiro vertebrado a partir do intestivo de *A. cajennense* adulto, alimentado em coelho durante os estágios imaturos do artrópode no ensaio.

A amplificação do DNA e a reação de sequenciamento foi bem sucedida em 66,6% (6/9) das amostras, das quais 100% apontaram a espécie animal coelho como fonte de alimentação do carrapato *A. cajennense*, de forma correspondente ao ensaio realizado.

A identificação genômica foi inviável em 33,3% (3/9) das amostras, uma vez que os produtos da PCR geraram *amplicons* insuficientes ou foram inexistentes.

Garipey et al. (2012) que perfizeram um ensaio para detecção de hábito alimentar do carrapato *Ixodes scapularis*, descartam a possibilidade do insucesso da identificação genômica estar associada apenas ao baixo volume do conteúdo intestinal.

A falha na amplificação pode estar associada principalmente à baixa qualidade do DNA em função da hemólise do repasto sanguíneo, promovida pela digestão intracelular. A degradação do DNA em fragmentos menores pode impedir a amplificação pela PCR assim como sugerido por Kirstein e Gray (1996). Como as sequências maiores de DNA são primariamente lisadas durante a digestão, os fragmentos menores de DNA são mais facilmente detectados (ZAIDI et al., 1999). Portanto, o tamanho do marcador molecular pode ser crucial para eficiência da detecção de DNA de hospedeiros no repasto de carrapatos (KIRSTEIN e GRAY, 1996; HUMAIR et al, 2007).

Contudo carrapatos armazenam uma pequena quantidade de sangue não digerida em endossomas (RAIKHEL, 1983), o que possibilita a detecção do DNA de hospedeiros, contidos no repasto, por um período maior quando comparado aos outros artrópodes hematófagos.

Pichon et al. (2003) identificaram 40% (4/10) dos repastos de larvas do carrapato *Ixodes ricinus*, mantidas em condições naturais, até nove meses depois da muda para ninfa. Para tal, empregou-se um par de *primers* universal para a amplificação pela PCR do gene 18S rRNA de vertebrados, seguido pela técnica de hibridização reversa em membrana (*reverse line blotting*) com sondas para subgrupos animais específicos. No entanto, o marcador 18S rRNA possui baixo polimorfismo, impedindo a discriminação dentro dos subgrupos de gêneros ou espécies. Para a identificação da espécie hospedeira, a análise de amplificação de

fragmentos do gene da *cyt b* seguidos de *reverse line blotting* com sondas específicas torna-se indispensável, como sugerido por Kirstein e Gray, (1999).

Embora o marcador molecular *cyt b* DNA mitocondrial tenha sido apontado como eficiente na detecção de hábito alimentar de carrapatos *Ixodes ricinus* por KIRSTEIN e GRAY (1996, 1999), no presente estudo obtivemos melhores resultados com o marcador 12S rDNA, também utilizados nos estudos de CADENAS et al., (2007); HUMAIR et al., (2007) e ESTRADA-PEÑA et al., (2005). Os produtos de PCR e a heterologia genômica detectada no sequenciamento genômico do fragmento do gene, indicam que pode ser usado de forma eficaz como um marcador molecular para a identificação de espécies de animal hospedeiro.

Humair et al. (2007) foram capazes de detectar e identificar cerca de 50% do DNA de vertebrados com resolução de grupos animais ou espécies de vertebrados a partir de repasto sanguíneo do carrapato *Ixodes ricinus*.

As técnicas empregadas abrangem a amplificação por PCR de fragmentos do gene mitocondrial 12S rDNA de vertebrados seguida pela hibridização reversa em membrana, utilizando sondas de nucleotídeos específicos de vertebrados.

Os *primers* 12S-6, VF1, L14841, como descritos na literatura e o *primer* Cricet1, descrito neste estudo, mostraram-se eficientes para a detecção e amplificação de fragmentos de DNA alvo de hospedeiros de *A. cajennense* e amplificador da bactéria *R. rickettsii*, especialmente a capivara. Isso nunca havia sido demonstrado antes, porque todos os estudos anteriores foram conduzidos com animais do hemisfério norte.

Dentre os hospedeiros vertebrados já identificados a partir de análise molecular do sangue residual em carrapatos, podem ser incluídos animais pertencem a fauna endêmica da Europa, fonte de alimentação do carrapato *Ixodes ricinus* (HUMAIR et al. 2007) e a fauna endêmica do leste dos EUA, fonte de alimentação para os carrapatos *Amblyomma americanum* e *Ixodes scapularis* (SCOTT et al. 2012).

Os estudos de Jasinskas et al. (2000) e Wickramasekara et al. (2008), apresentam um argumento que contrapõe o uso das técnicas aplicadas na pesquisa de Humair et al. (2007). O principal argumento para desqualificá-la consiste no fato

desses artrópodes hematófagos possuírem a digestão intracelular, o que reduz a quantidade e qualidade de DNA remanescente do hospedeiro vertebrado.

Assim, outros pesquisadores têm estudado o uso da espectrometria de massa para a detecção de proteínas do sangue para identificação de hospedeiros Wickramasekara et al. (2008). No entanto, esse protocolo de pesquisa exige alta demanda de recursos e não há banco de dados das proteínas sanguíneas para as espécies hospedeiras, com exceção de nove espécies de mamíferos endêmicos da América do Norte (LASKAY, et al., 2012).

A aplicação deste protocolo pode elucidar o papel de um hospedeiro vertebrado na epidemiologia da FMB, visto que a amplificação da bactéria depende de alguns hospedeiros específicos como a capivara (Souza et al., 2009) e o gambá (Horta et al., 2009) por exemplo, enquanto outros animais são refratários à infecção por *R. rickettsii*, como o cavalo (Ueno - estudo em andamento).

Este protocolo permite a detecção do hospedeiros da fase ninfal a partir de carrapatos adultos, seu uso na prática pode ser desenvolvido para a classificação de áreas de risco para a FMB, sendo que as áreas onde carrapatos têm se alimentado em cavalos apresentam baixo risco para a transmissão do agente etiológico da FMB para humanos, enquanto que para áreas onde os carrapatos imaturos se alimentam em capivaras, há um expressivo risco de ocorrência da doença em seres humanos.

Em conclusão, neste estudo foi possível identificar a espécie animal fonte de alimentação para a fase de ninfa do carrapato *A. cajennense* em condições de laboratório, com um método molecular relativamente simples e de baixo custo.

Portanto este protocolo de pesquisa desenvolvido é pioneiro em detecção de hábito alimentar para um carrapato endêmico da América do Sul. A técnica foi eficaz para detecção e identificação do hospedeiro vertebrado desse carrapato em nível de espécie, o que permite se conhecer melhor a transmissão dinâmica de patógenos a partir de animais silvestres infectados para os vetores em situações naturais, além de descobrir o papel de hospedeiros vertebrados desconhecidos nesta relação.

Novos estudos são necessários para a validação deste ensaio experimental, ou ainda, que possam aplicar a técnica para a detecção de hábito alimentar do carrapato *A. cajennense* em condições naturais. A técnica abre espaço para outras

pesquisas com fins epidemiológicos, como por exemplo, que envolvam uma amostra representativa de carrapatos adultos e/ou em estágio ninfal de vida livre em áreas de risco para a FMB; testes para verificar o período em que o repasto sanguíneo pode ser detectado pela técnica, e abordagens que incluíam o agente etiológico da FMB, seria muito importante do ponto de vista epidemiológico, como proposto por BEKKER et al. (2002).

As técnicas podem ser ainda mais refinadas para que haja de forma combinada a extração e identificação de DNA da espécie de carrapatos, do agente infeccioso e dos hospedeiros no estado de São Paulo.

6 CONCLUSÕES

- As sequências *forward* e *reverse* dos *primers* Vf1 e 12S-6 combinado com Cricet1 apresentaram maior sensibilidade, especificidade e eficiência, permitindo a amplificação por PCR para todas as espécies animais utilizadas no estudo.
- É possível identificar o hospedeiro vertebrado para o estágio ninfal do carrapato *A. cajennense* a partir da análise do intestino e conteúdo intestinal do artrópode através das técnicas de extração e amplificação de DNA e do sequenciamento genômico do material amplificado.
- Foi possível estabelecer um protocolo para análise e determinação do hábito alimentar de ninfas a partir do processamento de carrapatos adultos não alimentados.

REFERÊNCIAS

ALCAIDE, M.; RICO, C.; RUIZ, S.; SORIGUER, R.; MUÑOZ, J.; SORIGUER, R.; FIGUEROLA, J. Disentangling vector-Borne transmission networks: a universal DNA barcoding method to identify vertebrate hosts from arthropod bloodmeals. **Plos One**, v. 4, n.9, 2009.

ALLAN, B. F.; GOESSLING, L. S.; STORCH, G. A.; THACH, R. E. Blood meal analysis to identify reservoir hosts for *Amblyomma americanum* ticks. **Emerging Infectious Diseases**. v. 16, n. 3, p. 433 - 440, 2010.

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S.; SILVA, L. J. Brazilian spotted fever: a case series from na endemic área in southeastern Brazilian: clinical aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 252-254, 2006.

APPERSON, C. S.; HARRISON, B. A.; UNNASCH, T. R.; HASSAN, K. H.; IRBY, W. S.; SAVAGE, H. M.; ASPEN, S. E.; WATSON, D. W.; RUEDA, L. M.; ENGBER, B. R.; NASCI, R. S. Host-feeding habits of *Culex* and other mosquitoes (Diptera: Culicidae) in the borough of Queens in New York City, with characters and techniques for identification of *Culex* mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, p. 777–785, 2002.

ARAGÃO, H. Notas sobre ixódidas brasileiros. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 3, p. 145-195. 1911.

ARAGÃO, H. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n.4, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, p. 115-129, 1961.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical. São Paulo: **Vox/ICTTD-3/Butantan**, 2006. p. 117-164.

BEIER, J. C.; PERKINS, P. V.; WIRTZ, R. A.; KOROS, J. DIGGS, D. Bloodmeal Identification by direct enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), tested on Anopheles (Diptera: Culicidae) in Kenya. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, p. 25-29, 1988.

BEKKER, C. P. J.; VOS, S.; TAOUFIK, A.; SPARAGANO, O. A. E.; JONGEJAN, F. Simultaneous detection of Anaplasma and Ehrlichia species in ruminants and detection of *Ehrlichia ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks by reverse line blot hybridization. **Veterinary microbiology**, v. 89, p. 223-238, 2002.

BOAKE, D. A.; TANG, J.; TRUC, P.; MERRIWEATHER, A.; UNNASCH, T. R. Identification of bloodmeals in haematophagous Diptera by cytochrome B heteroduplex analysis. **Medical and Veterinary Entomology**, v.13, p. 282–287, 1999.

BORGES, M. M.; ANDRADE, S. G.; PILATTI, C. G.; PRADO, J. C.; KLOETZEL, J. K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 493-502, 1992.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of rocky mountain spotted fever and scrub typhus. In: Walker, D. H., biology of rickettsial diseases. **Boca Raton, FL.: CRC**, p. 33-50, 1988.

CADENAS, F. M.; RAIS, O.; HUMAIR, P-F.; DOUET, V. MORET, J.; GERN, L. Identification of host bloodmeal source and *Borrelia burgdorferi* Sensu Lato in Field-Collected *Ixodes ricinus* ticks in Chaumont (Switzerland). **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 6, p. 1109-1117, 2007.

CARLETON, M. D.; MUSSER, G. G. Order Rodentia. In: *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference/* (eds) Don, E.; Wilson and Reeder, D. A. M. – 3ed. **The Johns Hopkins University Press**, 2005. v. 1821, n. 7, p. 745-752.

CEPAGRI – Centro de Pesquisas Meteorológicas e Climáticas Aplicadas a Agricultura. *Clima de Campinas*. Campinas; 2013 (Acesso em 20 mai de 2012) Disponível em: < <http://www.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-de-campinas.html> >

CICERO, C.; JOHNSON, N. K. Higher-level phylogeny of new world vireos (Aves: Vireonidae) based on sequences of multiple mitochondrial DNA genes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 20, n. 1, p. 27–40, 2001.

CLAUSEN, P. H.; ADEYEMI, I.; BAUER, B.; BRELOEER, M.; SALCHO, F.; STAAK. Host preferences of tsetse (Diptera: Glossinidae) based on bloodmeal identifications. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 12, p. 169-180, 1998.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. Dados estatísticos. Tabela – Distribuição dos casos confirmados de febre maculosa, segundo município de infecção no estado de São Paulo, 1998 - 2013. 2013a. Disponível em: <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fm_lpi.htm> Acesso em: 13 abr. de 2013.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica. Dados estatísticos. Tabela - Incidência (por 100000 hab.), óbitos e taxa de letalidade por ano no estado de São Paulo, 1985 - 2013. 2013b. Disponível em :<http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fm_inc.htm> Acesso em: 13 abr. de 2013.

CHILDS, J. E.; PADDOCK, C. D. Passive surveillance as an instrument to identify risk factors for fatal Rocky Mountain spotted fever: is there more to learn? **Am. J. Trop. Med. Hyg**, v. 66, n. 5, p. 450–457, 2002.

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

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

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

EDRISSIAN, G. H; MANOUCHEHRY, A. V.; HAFIZI, A. Aplication of an enzyme-linked immunossorbent assay (ELISA) for determination of the human blood index in anopheline mosquitoes collected in Iran. **Jornal American Mosquitoes Control Association**, v. 1, p. 349-352, 1985.

ESTRADA-PENÑA, A.; OSÁCAR, J. J.; PICHON, B.; GRAY, J. S. Host and pathogen detection for immature stages of *Ixodes ricinus* in north-central Spain. **Experimental and Applied Acarology**, n. 37, p. 257-268, 2005.

ESTRADA-PENÃ, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology**, v. 23, p. 685-715, 1999.

FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Bacteriology, taxonomy, and phylogeny of *Rickettsia*. In: Raoult, D. and Parola, P. (eds.), rickettsial diseases. **Informa Healthcare**, New York, NY. 2007, p. 1-13.

FUNASA. Manual de Controle de Roedores. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

GALVÃO, M. A.; DUMLER, J. S.; MAFRA, C. L. CALIC. S. B.; CHAMONE, C. B.; FILHO, G. C.; OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Fatal spotted fever rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9. p. 1402-1405, 2003.

GARIEPY, T. D.; LINDSAY, R.; OGDEN, N.; GREGORY, T. R. Identifying the last supper: utility of the DNA barcode library for bloodmeal identification in ticks. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 4, p. 646–652, 2012.

GENBANK. NIH genetic sequence database. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>>. Acesso em março de 2013.

GOMES, L. S. Sobre a presença do tifo exantemático do tipo murino ou endêmico em São Paulo. Estudo de quatro casos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.1, n. 1, p. 21-39. 1941.

GOMES, L. S. Typho exanthemático de São Paulo. **Brasil-Médico**, v. 17, p. 919-921, 1933.

GOMEZ-DIAZ, E.; FIGUEROLA, J. New perspectives in tracing vector-borne interaction networks. **Trends Parasitology**, v. 26: 470–476. 2010.

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

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

GUGLIELMONE, A. A; NAVA, S. Rodents of the subfamily Caviinae (Hystricognathi, Caviidae) as hosts for hard ticks (Acari: Ixodidae). **Mastozoología Neotropical**. v. 17, p. 279-286, 2010.

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

HAMER, G. L.; KITRON, U. D.; BRAWN, J. D.; LOSS, S. R.; Ruiz, M. O.; GOLDBERG, T. L.; WALKER, E. D. *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): a bridge vector of West Nile virus to humans. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, p. 125–128, 2008.

HELMICK, C. G., BERNARD, K. W., D'ANGELO, L. J. Rocky Mountain spotted fever, clinical, laboratory, and epidemiological features of 262 cases. **Journal of Infectious Diseases**, v. 150, p. 480–488. 1984.

HOOGSTRAAL, H., AESCHLIMANN, A. Tick-host specificity. **Bulletin de la Société Entomologique Suisse**. v. 55, p. 5-32. 1982.

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

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

HUMAIR, P-F.; DOUET, V.; CADENAS, F. M.; SCHOULS, L. M.; POL, V. D, I.; GERN, L. Molecular identification of bloodmeal source in *Ixodes ricinus* ticks using 12S rDNA as a genetic marker. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 5, p. 869-880. 2007.

IVANOVA, N. V.; ZEMLAK, T. S.; HANNER, R. H.; HEBERT, P. D. N. Universal primer cocktails for fish DNA barcoding. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, p. 544–548, 2007.

KATZ, G.; NEVES, V. L. F. C.; ANGERAMI, R. N.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, n. 69, p. 4-13, 2009.

KENT, R. J. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 4-18, 2009.

KENT, R. J.; NORRIS, D. E. Identification of mammalian blood meals in mosquitoes by multiplexed polymerase chain reaction targeting *cytochrome b*. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, pp. 336–342, 2005.

KENT, R.; JULIUSSON, L.; WEISSMANN, M.; EVANS, S.; KOMAR, N. Seasonal blood-feeding behavior of *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae) in Weld County, Colorado, 2007. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 2, p. 380-390, 2009.

KIRSTEIN, F.; GRAY, J. S. A molecular marker for the identification of the zoonotic reservoirs of lyme borreliosis by analysis of the blood meal in its European vector *Ixodes ricinus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, n. 11, p. 4060-4065, 1996.

KIRSTEIN, F.; GRAY, J. S. Blood meal identification in ticks: a promising tool in ecological research on tick-borne diseases. **Zentralblatt für Bakteriologie**; v. 289, p. 760-764. 1999.

KOCHER, T. D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, p. 6196-6200, 1989.

JASINSKAS, A.; JAWORSKI, D. C.; BARBOUR, A. G. *Amblyomma americanum*: specific uptake of immunoglobulins into tick hemolymph during feeding. **Experimental Parasitology**, v. 96, n. 4, p. 213-221, 2000.

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

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p.1-14, 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, p. 65-77, 2002b.

LABRUNA, M. B.; PAULA, C. D.; LIMA, T. F.; SANA, D. A. Ticks (Acari:Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1133–1136, 2002 a.

LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. Febre maculosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Clínica Veterinária**, São Paulo, n.12, p. 19-23, 1998.

LASKAY, Ü.; BURG, J.; KALETA, E. J.; VILCINS, I. M.; TELFORD, L. S. R.; BARBOUR, A. G, WYSOCKI, V. H. Development of a host blood meal database: de novo sequencing of hemoglobin from nine small mammals using mass spectrometry. **Journal of Biological Chemistry**. v. 393, n.3, p. 195-201, 2012.

LEE, J. H.; HASSAN, H., HILL, G.; CUPP, E. W. HIGAZI, T. B.; MITCHELL, C. J.; GODSEY, M. S. J.; UNNASCH, T. R. Identification of mosquito avian-derived blood meals by polymerase chain reaction heteroduplex analysis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 599–604, 2002.

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

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, A. Typho Exantemático de São Paulo – Novas experiências 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 vírus oir <Ixodidae>. **Brasil-Médico**, v. 16, n. 3, p. 49-53, 1932.

LIMA, V. L. C.; FIGUEIREDO, A. C.; PIGNATTI, M. G.; MODOLO, M. Febre maculosa no município de Pedreira, estado de São Paulo, Brasil: Relação entre ocorrência de casos e parasitismo humano por ixodídeos. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**. v. 28, p. 135–137, 1995.

LOPES, C. M. L.; LINARDI, P. M.; BOTELHO, J. R. Ectoparasitos de roedores do município de Tiradentes, Minas Gerais. I. Ectoparasito fauna. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p.333-334, 1998.

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, p. 808-813, 2002.

MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático no Brasil. **Monografia do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 6, p. 968, 1952.

MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático no Brasil. **Monografia do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 55, n. 2, p. 191-208, 1957.

MAGNARELLI, L. A. Host feeding patterns of Connecticut mosquitoes (Diptera: Culicidae). **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 26, p. 547-552, 1977.

MANCINI, D. A. P.; NASCIMENTO, E. M. M.; TAVARES, V. R.; SOARES, M. A. A ocorrência de riquetsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. **Revista de Saúde Pública**, v. 17, n. 6, p. 493-499. 1983.

MANS, B. J.; KLERK, D.; PIENAAR, R.; LATIF, A. A. *Nuttalliella namaqua*: a living fossil and closest relative to the ancestral tick lineage: implications for the evolution of blood-feeding in ticks. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p.1-11,2011.

MATTAR, S.; GONZALEZ, N.; ALVIS, M. Haemorrhagic fevers transmitted by vectors in the neotropics. In: "Current Topics in public health", (ed.) Alfonso J. Rodriguez-Morales, v. 18, p. 381-399, 2013.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, 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.

MEECE, J. K.; REYNOLDS, C. E.; STOCKWELL, P. J.; JENSON, T. A.; CHRISTENSEN, J. E.; REED, K. D. Identification of mosquito bloodmeal source by terminal restriction fragment length polymorphism profile analysis of the cytochrome b gene. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, p. 657-667, 2005.

MELLO, D. A.; TEIXEIRA, M. L. Note on natural infection of the *Calomys expulsus*, Land, 1841 (Cricetidae-Rodentia) by *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde pública**, v. 11, p. 561-564, 1977.

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

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

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

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de vigilância epidemiológica 7 ed., Brasília, 2009. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual.pdf> Acesso em 13 abr. de 2012.

MOLAEI, G.; ANDREADIS, T. G.; ARMSTRONG, P. M.; ANDERSON, J. F.; VOSSBRINCK, C. R. Host feeding patterns of *Culex* mosquitoes and west nile virus transmission, northeastern United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 3, 2006.

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

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

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil-Médico**, v. 53, p. 882-891, 1939.

MUKABANA, W. R.; TAKKEN, W.; KNOLS, G. J. Analysis of arthropod bloodmeals using molecular genetic markers. **Trends in parasitology**, v. 18, n. 11, p. 505-509, 2002a.

MUKABANA, W. R.; TAKKEN, W.; SEDA, P.; KILLENN, G. F.; HAWLEY, W. A.; KNOLS, G. J. Extent of digestion affects the success of amplifying human DNA from blood meals of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). **Bulletin of Entomological Research**, v. 92, p. 233–239, 2002b.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Biosciences**, v. 14, p. 2857-2877, 2009.

NEITZ, W. O. D.; BORIGHTON, F.; WALTERS, M. S. Laboratory investigations of the life cycle of Karoo paralysis tick *Ixodes rubicundus* (Neumman, 1904). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v.38, p.215-224, 1971.

NGO, A. K; KRAMER, L. D. Identification of mosquito bloodmeals using polymerase chain reaction (PCR) with order-specific primers. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 2, p. 215-222, 2003.

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

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

OLIVEIRA, P. R. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae): avaliação de técnicas para o estudo de dinâmica populacional e biotecnologia. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 97f. 1998.

OLIVEIRA, P. R.; BORGES, L. M. F.; LOPES, C. M. L.; LEITE, R. C. Population dynamics of the free living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais state, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, pp. 295–301, 2000.

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

OSHAGHI, M. A.; CHAVSHIN, A. R.; VATANDOOST, H. Analysis of mosquito bloodmeals using RFLP markers. **Experimental Parasitology**, v. 114, p. 259–264, 2006.

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

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Sao Paulo, Brazil; serological evidence for infection by *Rickettsia belli* and *Rickettsia parkeri*. **Biomedica**, v. 27, p. 364-371, 2007.

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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 687–692, 2008.

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

PEREIRA, M. C.; SZABÓ, M. J. P.; BECHARA, G. H.; MATUSHIMA, E. R.; DUARTE, J. M. B.; RECHAV, Y.; FIELDEN, L.; KEIRANS, J. E. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, p. 979-983, 2000.

PICHON, B.; EGAN, D.; ROGERS, M.; GRAY, J. Detection and identification of pathogens and host DNA in unfed host-seeking *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 723-731, 2003.

PICHON, B.; ROGERS, M.; EGAN, D.; GRAY, J. Blood-meal analysis for the identification of reservoir hosts of tick-borne pathogens in Ireland. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 5, n. 2, p. 172-180, 2005.

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

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 79-88, 2002.

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

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.

PIERCE, K. A.; PADDOCK, C. D.; SUMMER, J. W.; NICHOLSON, W. L. Pathogen prevalence and blood meal identification in *Amblyomma* ticks as a means of reservoir host determination for ehrlichial pathogens. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 37-38, 2009.

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, L. S. Typho Exanthematico de São Paulo. São Paulo: **Sociedade Imprensa Paulista**, 1932. p. 11-119.

PRATA, M. C. A.; DAEMON, E.; SANAVRIA, A. Determinação do número de ovos por grama de postura de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Anais, v. 4, n. 2, p. 64 supl.1, Resumo. 1995a.

PRATA, M. C. A.; ALONSO, L. S.; SANAVRIA, A. Parâmetros biológicos do estágio ninfal de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em coelhos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Anais, v. 4, n. 2, p. 60 supl.1, Resumo. 1995c.

PRATA, M. C. A.; ALONSO, L. S.; SANAVRIA, A. Parâmetros biológicos do estágio larval de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em coelhos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Anais, v. 4, n. 2, p. 59 supl.1, Resumo. 1995b.

PRATA, M. C. A.; SANAVRIA, A. Alterações determinadas por larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em orelhas de coelhos. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Anais, v. 4, n. 2, p. 62, supl.1, Resumo. 1995.

RAIKHEL, A. S. The Intestine. In: An Atlas of ixodid tick ultrastructure (ed. RAIKHEL, A. S.; HOOGSTRAAL, H.). Special Publication, **Entomological Society of America**, Maryland. 1983, p. 59–97.

RANDOLPH, S. E. Ticks are not insects: consequences of contrasting vector biology for transmission potential. **Parasitology Today**, v. 14, p. 186-192, 1998.

REIS, F. S.; BARROS, M. C.; FRAGA, E. C.; PENHA, T. A.; TEIXEIRA, W. C.; SANTOS, A. C.; GUERRA, R. M. Ectoparasites of small wild mammals from the adjacent areas of Itapecuru river and environmental preservation area of Inhamum, state of Maranhão, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 1, p. 69-74, 2008.

RICHARDS, S. L.; ONNUSAMY, L.; UNNASCH, T. R.; HASSAN, H. K.; APPERSON, C. S. Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. **Journal of Medical Entomology**, v. 43, p. 543–551, 2006.

RICKETTS, H. T. Some aspects of rocky mountain spotted fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, n. 76, p. 843-855, 1909.

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

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

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

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 Zoonotic Diseases**, v.13, n. 9, p. 615-618, 2013.

SAVAGE, H. M.; AGGARWAL, D.; APPERSON, C. S.; KATHOLI, C. R.; GORDON, E.; HASSAN, H. K.; ANDERSON, M.; CHARNETZKY, D.; MCMILLEN, L.; UNNASCH, E. A.; UNNASCH, T. R. Host choice and West Nile virus infection rates in blood-fed mosquitoes, including members of the *Culex pipiens* complex, from Memphis and Shelby county, Tennessee, 2002–2003. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 3, p. 365–386, 2007.

SERRA-FREIRE, N. M. S. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. *Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro*, v. 5, p. 187–193, 1982.

SCOTT, M. C.; HARMON, J. R.; TSAO, J. I.; JONES, C. J.; HICKLING, G. J. Reverse line blot probe design and polymerase chain reaction optimization for bloodmeal analysis of ticks from the eastern United States. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 697-709. 2012.

SEXTON, D. J. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993.

SILVA, L. J.; GALVÃO, M. A. M. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, (Suppl.) v. 13 n.1, p. 197-198, 2004.

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

SIMON, C.; FRATI, F.; BECKENBACH, A.; CRESPI, B.; LIU, H.; FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 87, p. 651-701, 1994.

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

SOUZA, A. P. Variação populacional dos principais ixodídeos parasitas de bovinos e eqüinos em diferentes condições de manejo, nos municípios de Paracambi e Itaguaí no estado do Rio de Janeiro. Tese de Doutorado em Parasitologia Animal. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 81 p. 1990.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S.; BORBA, R. C.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1, p. 116-121, 2009.

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

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P-H. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, v. 97, 247–254, 2005.

SUCEN - Superintendência de Controle de Endemias. Manual de Vigilância Acarológica. 1 ed. São Paulo: **Sucen**, SES-SP; 2002.

SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 719–728, 2013.

TEMPELIS, C. H. Host-feeding patterns of mosquitoes, with a review of advances in analysis of blood meals by serology. **Journal of Medical Entomology**, v. 6, p. 635–653, 1975.

TIRIBA, A. C. Geografia médica das riquetsioses. In: LACAZ, C. S.; BURUZZI, R. G.; SIQUEIRA-JUNIOR, W. S. Introdução a geografia médica do Brasil. São Paulo. Ed. **Edgard Blucher**, p. 388-397, 1972.

TRAVASSOS, J. VALLEJO-FREIRE, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) as inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 15, p. 73-86, 1942.

VAN DEN HURK, A. F. I.; SMITH, I. L.; SMITH, G. A. Development and evaluation of real-time polymerase chain reaction assays to identify mosquito (Diptera: Culicidae) bloodmeals originating from native Australian mammals. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, p. 85–92, 2007.

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

WASHINO, R. K.; TEMPELIS, C. H. Mosquito host bloodmeal identification: methodology and data analysis. **Annual Reviews in Entomology**, v. 28, p. 179–201, 1983.

WALKER, D. H. *Rickettsia rickettsii*: as virulent as ever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**; v. 66, n.5, p. 448-449, 2002.

WEITZ, B. Identification of bloodmeals of blood-sucking arthropods. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 15, p. 473-90, 1956.

WICKRAMASEKARA, S.; BUNIKIS, J.; WYSOCKI, V.; BARBOUR, A. G. Identification of residual blood proteins in ticks by mass spectrometry proteomics. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. 1273–1275, 2008.

YAHNKE, J. C.; MESERVE, P. L.; KSIAZEK, T. G.; MILLS, J. N. Patterns of infection with laguna negra virus in wild populations of *Calomys laucha* in the central Paraguayan chaco. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 6, p. 768–776, 2001.

ZAIDI, R. H.; JAAL, Z.; HAWKES, N. J.; HEMINGWAY, J.; SYMONDSON, W. O. C. Can the detection of prey DNA amongst the gut contents of invertebrate predators provide a new technique for quantifying predation in the field? **Molecular Ecology**, v. 8, p. 2081–2087, 1999.

ANEXOS

ANEXO CARTA DE APROVAÇÃO A – DO CEP – FMUSP



A CEUA do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **22/06/2011**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **241/11** intitulado: **“PADRONIZAÇÃO DE MÉTODOS PARA DETERMINAÇÃO DE HÁBITO ALIMENTAR DE NINFAS DOCARRAPATO AMBLYOMMA CAJENNENSE PARA USO EM ESTUDOS EPIDEMIOLÓGICOS SOBRE A FEBREMACULOSA BRASILEIRA.”** que utilizará **14** animais da espécie **5 coelhos, 2 codornas, 3 frangos, 2 ratos e 2 cobaias.**, apresentado pela Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais - Lei Nº 11.794 -8 de outubro de 2008).

Pesquisador (a) Responsável: Adriano Pinter dos Santos

Pesquisador (a) Executante: Nádia Pereira Martinez

CEP-FMUSP, 27 de Junho de 2011.

Dr. Eduardo Pompeu
Coordenador
Comissão de Ética no Uso de Animais

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa



Nádia Pereira Martinez

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/9598471914977994>

Última atualização do currículo em 08/08/2013

Bióloga, mestranda do programa de Saúde Pública pela Universidade de São Paulo. Desenvolvendo pesquisa sobre hábito alimentar de vetores para ser aplicado a estudos epidemiológicos em linha de pesquisa sobre a Febre Maculosa Brasileira no laboratório de biologia molecular da Superintendência de Controle de Endemias. Atividades relacionadas: PCR, REAL-TIME PCR, sequenciamento genômico e programas de computador estatísticos e aplicados à genética. **(Texto informado pelo autor)**

Identificação

Nome Nádia Pereira Martinez

Nome em citações bibliográficas MARTINEZ, N. P.

Endereço

Formação acadêmica/titulação

- 2011** Mestrado em andamento em Saúde Pública (Conceito CAPES 5).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Padronização de metodologia para determinação de hábito alimentar em larvas e ninfas do carrapato *Amblyomma cajennense* e seu uso no estudo da epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira., Ano de Obtenção: 2013.
Orientador: Adriano Pinter dos Santos.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Epidemiologia.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia.
Setores de atividade: Pesquisa e desenvolvimento científico; Atividades de atenção à saúde humana; Atividades veterinárias.
- 2003 - 2007** Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade Ibirapuera, UNIB, Brasil.
Título: Aspectos epidemiológicos da Leptospirose da Estância Turística de Embu (2005-2007).
Orientador: Erika Renata Barbosa Neiro.

Formação Complementar

- 2013 - 2013** Redação Acadêmica para pós-graduação. (Carga horária: 45h).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
- 2013 - 2013** Biologia Molecular Aplicado à Pesquisa. (Carga horária: 45h).
Fundação Oswaldo Cruz.
- 2013 - 2013** Epidemiologia Molecular em doenças parasitárias. (Carga horária: 56h).
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- Fiocruz.
- 2012 - 2012** Extensão universitária em Curso Introdutório do EPISUS. (Carga horária: 40h).
Coordenadoria de Controle de Doenças.
- 2012 - 2012** citometria de fluxo em estudos imunoparasitológico. (Carga horária: 8h).
Universidade Federal do Maranhão.
- 2012 - 2012** Novos modelos de vigilância. (Carga horária: 8h).
Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof. Alexandre Vranjac".



Adriano Pinter dos Santos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8867336916442663>

Última atualização do currículo em 21/03/2013

Possui graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade de São Paulo (2000), mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses pela Universidade de São Paulo (2003) e doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses pela Universidade de São Paulo (2007). Atualmente é pesquisador científico III da Superintendência de Controle de Endemias. Tem experiência na área de Parasitologia, com ênfase em ixodideologia e epidemiologia da febre maculosa brasileira, atuando principalmente nos seguintes temas: amblyomma cajennense, amblyomma aureolatum, rickettsia rickettsii, biologia molecular e ecologia de doenças transmitidas por carrapatos (**Texto informado pelo autor**)

Identificação

Nome Adriano Pinter dos Santos

Nome em citações bibliográficas PINTER, ADRIANO

Endereço

Endereço Profissional Superintendência de Controle de Endemias, Superintendência, Departamento de Laboratórios Especializados.
Av Paula Souza, 166
Centro
01027-000 - Sao Paulo, SP - Brasil
Telefone: (11) 33111177
Fax: (11) 33111194
URL da Homepage: <http://www.sucen.sp.gov.br>

Formação acadêmica/titulação

- 2007 - 2008** Pós-Doutorado.
The University of Texas Medical Branch.
Bolsista do(a): National Institutes of Health.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Imunologia / Subárea: Imunologia Celular / Especialidade: Relação parasita hospedeiro.
- 2003 - 2007** Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Aspectos Ecológicos da Febre Maculosa em uma área endêmica do Estado de São Paulo., Ano de obtenção: 2007.
Orientador: Marcelo Bahia Labruna.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: Amblyomma aureolatum; cão; Febre Maculosa; rickettsia rickettsii; Mogi das Cruzes; Pyriglina.
Grande área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Epidemiologia.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas.
- 2001 - 2003** Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses (Conceito CAPES 7).
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Aspectos epidemiológicos da febre maculosa em um área endêmica do município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do ciclo de vida do vetor Amblyomma aureolatum (Acari: Ixodidae), Ano de Obtenção: 2003.
Orientador: Marcelo Bahia Labruna.
Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
Palavras-chave: Amblyomma aureolatum; Febre Maculosa; rickettsia rickettsii; Mogi das Cruzes; cão; Rickettsia belli.
Grande área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Epidemiologia.
Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.
Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas; Desenvolvimento Rural.
- 1995 - 2000** Graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia.
Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
Título: Relatório final de estágio curricular obrigatório e monografia sobre o gênero Amblyomma (acari:ixodidae).
Orientador: Marcelo de Campos Pereira.

Formação Complementar

- 2012 - 2012** Molecular Recognition of Tick-Borne Pathogens. (Carga horária: 80h).
Utrecht University.
- 2007 - 2007** Laboratory Biosafety Level 3 Training Program.
The University of Texas Medical Branch.