

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

JAMILE DE OLIVEIRA PASCOAL

**Patógenos intracelulares em carrapatos do Cerrado e Mata
Atlântica: Vírus e Riquetsias**

DOUTORADO

**UBERLÂNDIA
2017**

JAMILE DE OLIVEIRA PASCOAL

Patógenos intracelulares em carrapatos do Cerrado e Mata Atlântica:
Vírus e Riquetsias

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó

Co-orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Uberlândia, MG

Fevereiro - 2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

P281p
2017 Pascoal, Jamile de Oliveira, 1980
 Patógenos intracelulares em carrapatos do Cerrado e Mata Atlântica:
 vírus e riquetsias / Jamile de Oliveira Pascoal. - 2017.
 94 p. : il.

 Orientador: Matias Pablo Juan Szabó.
 Coorientador: Jonny Yokosawa.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Inclui bibliografia.

 1. Veterinária - Teses. 2. Carrapato - Teses. 3. Flavivírus - Teses. 4.
Doenças transmissíveis - Teses. I. Szabó, Matias Pablo Juan. II.
Yokosawa, Jonny. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.

CDU: 619

“O que vale na vida não é o ponto

de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando,

no fim terás o que colher. ”

Cora Coralina

Agradecimentos

A Deus, pelos inúmeros privilégios que me concedeu e concede a cada dia. Por me permitir fazer parte da vida acadêmica e crescer com ela.

Ao meu marido, Pablo Naves, meu grande incentivador e parceiro de vida, obrigada por acreditar em mim, pelo amor e companheirismo.

À minha filha, Mariah, que suportou momentos de ausência mesmo em tenra idade e me faz querer ser melhor a cada dia.

À Liz, que antes de nascer, já sentiu comigo as dificuldades e alegrias de se conquistar um sonho.

Aos meus pais, Wildiner e Ana Célia, pelo amor e oportunidades de toda uma vida. Se pudéssemos escolher nossos pais antes de vir ao mundo, eu os teria escolhido.

Às minhas irmãs, Janice e Juliana, e suas famílias, a vida não teria significado se não tivéssemos com quem dividir nossas conquistas.

À minha segunda família, Neusa, Waldomiro (que continua presente em minha mente e coração), Murilo e família. Sei o quanto torcem por minhas conquistas.

Ao meu orientador, Matias Pablo Juan Szabó, para mim um exemplo de dedicação e amor pela pesquisa. Com você cresci imensamente como profissional. Obrigada por tudo que fez por mim!

Ao meu co-orientador Jonny Yokosawa. Obrigada pela paciência e dedicação em ensinar. Você foi essencial em meu aprendizado.

À Universidade Federal de Uberlândia, e a todos os funcionários, que me auxiliaram no que precisei desde a minha graduação. Tornou-se outra casa.

Aos amigos do Laboratório de Ixodologia, desde os que já partiram aos que chegaram há pouco. Vocês são como uma família e tornam o trabalho prazeroso pela alegria, companheirismo e amizade verdadeira. Em especial à Marlene, Carol, Vanessa, Samantha, que fazem parte de minha vida há mais tempo.

Aos amigos do Laboratório de Virologia, que me receberam tão bem, em especial à Thelma e Ana Carolina, que se tornaram amigas de coração.

A todos os outros familiares, minha avó Laura, minha avó Lázara (*in memoriam*), tios e primos que sempre torceram por mim.

Aos amigos, que são muitos, e sonharam comigo esse sonho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Capítulo 1 – Considerações gerais

Introdução.....pág. 3

Referências.....pág. 14

Capítulo 2 - Riquetsias associadas a carrapatos de carnívoros selvagens e cães domésticos em área de Cerrado no Estado de Goiás, Brasilpág. 18

Capítulo 3 - Carrapatos e Riquetsia do Grupo da Febre Maculosa em Tamanduás (Myrmecophagidae) no Cerrado e Pantanal.....pág. 37

Anexo I.....pág. 59

Anexo II.....pág. 63

Capítulo 4 - *Flavivirus* associados a carrapatos de animais domésticos, capivaras, roedores e ambiente em regiões de Cerrado e Mata Atlântica, Brasil.....pág. 65

Capítulo 1

Considerações gerais

Resumo

No Brasil, a maioria das viroses transmitidas por artrópodes (arboviroses) pertence ao gênero *Flavivirus*, no entanto, aqueles transmitidos por carrapatos são menos estudados do que os transmitidos por insetos. Além dos vírus, outros microrganismos possuem grande relevância em saúde pública. Riquetsias são os principais agentes de zoonoses transmitidas por carrapatos no Brasil, especialmente as do Grupo da Febre Maculosa (GFM), que inclui diversas espécies patogênicas e que são transmitidas por carrapatos. Dentre os diversos biomas, dois foram particularmente degradados no Brasil, a Mata Atlântica e o Cerrado. Diante destes motivos, esta tese compõe-se de três capítulos, que tiveram como objetivo identificar carrapatos vetores em áreas do Cerrado e Mata Atlântica adjacentes a áreas com atividade humana, pesquisando por patógenos causadores de zoonoses, *Rickettsia* spp. e *Flavivirus*. No primeiro capítulo, a presença de riquetsias foi averiguada em carrapatos de cães e carnívoros da região de Cumari-GO. Pesquisou-se por esse microrganismo em oito espécies de carnívoros silvestres e em cães domésticos. Duas amostras amplificaram fragmentos do gene *ompB*, presente em riquetsias do GFM, e ao mesmo tempo amplificaram fragmentos específicos para *Rickettsia bellii*, que não pertence a esse grupo. Isso demonstra uma possível infecção cruzada, podendo o carrapato manter concomitantemente estas duas espécies divergentes. O segundo capítulo, dados de carrapatos de tamanduás (*Myrmecophaga tridactyla* e *Tamandua tetradactyla*) referentes a um período de 18 anos foram analisados, 169 amostras foram avaliadas quanto à presença de riquetsias. Quatro destas amostras exibiram sequência de *ompA* com 100% de identidade com outras sequências de carrapato *Amblyomma nodosum*, indicando que *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa (SFG) em *Amblyomma nodosum* estava circulando no entorno da cidade de Uberlândia e estado de São Paulo, podendo outros carrapatos, tais como *A. sculptum* serem infectados, gerando risco para animais domésticos e seres humanos. No último capítulo, carrapatos de seis áreas, uma pertencente à Mata Atlântica e as outras do bioma Cerrado, foram avaliados quanto à presença de *Flavivirus*. Nestes locais foram pesquisados carrapatos de doze espécies diferentes, sendo onze da família Ixodidae e um da família Argasidae, estes pertenciam às espécies: *Amblyomma sculptum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus*, *Dermacentor nitens*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma rotundatum*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma naponense* e *Ornithodoros* sp. Detectou-se a presença de um flavivírus em carrapatos *R. microplus* coletados na região de Uberlândia. Estas amostras exibiram aproximadamente 98% de identidade com o Vírus do Carrapato Mogiana (MGTV). Todos os carrapatos que exibiram resultados positivos para flavivírus ou riquetsias, foram coletados em áreas antropizadas, confirmando a importância do estudo de vetores hematófagos na epidemiologia de agentes virais e bacterianos de animais domésticos e selvagens.

Palavras-chave: animais domésticos, animais silvestres, carrapatos, flavivírus, riquetsias.

Abstract

In Brazil, most arthropod-transmitted viruses (arboviruses) belong to *Flavivirus* genus, being tick-transmitted less studied than insect-transmitted ones. Other microorganisms have great public health relevance, such as *Rickettsia*, the main agent of tick-borne diseases in Brazil, specially the Macular Fever (MF) group, which includes several pathogenic species that are transmitted by ticks. Within different biomes, both the Atlantic Forest and the Cerrado were severely degraded in Brazil. This thesis consisted of three chapters, aiming to identify ticks in areas of Cerrado and Atlantic Forest with surrounding human activity, looking for both *Rickettsia* and *Flavivirus* infected ticks. In the first chapter, the presence of *Rickettsia* was investigated in ticks from dogs and other carnivores, being eight wild carnivores species and domestic dogs in Cumari, Goiás state, Brazil. Two samples were positive for *ompB* gene, common in the MF group, being also positive for specific genes found in *Rickettsia bellii*, which does not belong to the MF group. This result shows a possible cross-infection, being tick able to maintain these two different species simultaneously. The second chapter, an 18-year-study-data from anteater ticks (*Myrmecophaga tridactyla* and *Tamandua tetradactyla*) was analyzed, accounting 169 samples evaluated for the presence of *Rickettsia*. Four samples were positive for *ompA* gene, being 100% identical to other tick sequences present in *Amblyomma nodosum*, indicating that *Rickettsia* from the MF group in *A. nodosum* was circulating around the city of Uberlândia and state of São Paulo. Other ticks, such as *A. sculptum*, could become infected by the *Rickettsia* presence, generating risk for domestic animals and humans. In the last chapter, ticks from six areas, being one from the Atlantic Forest and the others from the Cerrado biome, were evaluated for the presence of *Flavivirus*. 12 different species were accounted, in which eleven were from the Ixodidae family and one was from the Argasidae family, having the following species identified: *Amblyomma sculptum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus*, *Dermacentor nitens*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma rotundatum*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma naponense* and *Ornithodoros* sp. The presence of a *Flavivirus* in *R. microplus* ticks collected in the Uberlândia region was detected. These samples exhibited approximately 98% identity with the Mogiana Tick Virus (MGTV). All ticks that were positive for *Flavivirus* or *Rickettsia* were collected in areas with human activities, stating the importance of studies on hematophagous vectors in the epidemiology of both viral and bacterial agents in domestic and wild animals.

Key-words: domestic animals, flaviviruses, rickettsiae, ticks, wild animals.

INTRODUÇÃO

Carrapatos ixodídeos são ectoparasitos obrigatórios e de hábito hematofágico, o que os transforma em vetores de vários agentes infecciosos, como protozoários, vírus, bactérias, incluindo as riquetsias, tanto para humanos como para animais (Cupp, 1991). Esses artrópodes são encontrados em todos os ambientes terrestres, de desertos quentes a ambientes gelados, e parasitam todos os grupos vertebrados terrestres incluindo aves, répteis e mamíferos (Sonenshine, 2002). São transmissores de diversos patógenos ao homem e animais e como vetores, só perdem para os mosquitos, embora possam transmitir uma variedade maior de agentes infecciosos (Jongejan; Uilenberg, 2004).

Considerando-se a longevidade excepcional destes ácaros eles se tornam não apenas vetores, mas também reservatórios de agentes infecciosos (Labuda; Nuttall, 2004). Dentre as várias enfermidades infecciosas transmitidas ao homem e animais, encontram-se algumas de elevado impacto sobre a saúde pública e animal como a borreliose de Lyme, a febre maculosa, diversas encefalites virais, a erliquiose, a anaplasmoze, a babesiose e a teileriose (Estrada-Peña; Jongejan, 1999; Jongejan; Uilenberg, 2004).

O Brasil possui pelo menos 66 espécies de carrapatos conhecidas (Martins et al., 2014; Nava et al., 2014). O conhecimento sobre a biologia e ecologia destes, entretanto, é majoritariamente sobre um número reduzido de espécies, aquelas mais abundantes nas áreas urbanas e rurais. As outras espécies, assim como seus hospedeiros e microrganismos associados, estão mais afastadas em ecossistemas e microambientes específicos às vezes em populações reduzidas.

O recente aumento de doenças infecciosas de seres humanos associadas à vida selvagem pode ser atribuído, entre outros, a atitudes antropogênicas que favorecem um maior contato, como a invasão de áreas naturais e o aumento do interesse e popularidade da vida selvagem (Rhyen; Spraker, 2010). A invasão de áreas naturais ocorre por motivos econômicos

e sociais (produção agrícola, produção de energia-hidrelétrica, extrativismo, pobreza). O aumento da popularidade se traduz em procura por lazer em áreas naturais, animais de estimação exóticos e preocupação por e maior aceitação da proximidade de algumas espécies de animais selvagens como é o caso de capivaras. As recentes alterações ambientais e comportamentais humanas adicionaram complexidade às relações patógeno-hospedeiro com a possibilidade de incremento de doenças infecciosas existentes e surgimento de outras novas. Doenças transmitidas por carrapatos exemplificam algumas das consequências deste complexo de modificações globalmente e no Brasil.

A aproximação entre vírus e populações humanas é, frequentemente, fruto da urbanização expansionista registrada em várias partes do mundo. Nesta condição há a junção, em áreas de dimensões consideráveis, de um número elevado de potenciais hospedeiros vivendo em condições facilitadoras da proliferação de vetores e, conseqüentemente, da transmissão destes vírus (Parreira et al., 2012).

Exemplo disso, o vírus da febre hemorrágica Criméia-Congo (família Bunyaviridae, gênero *Nairovirus*) é responsável por uma doença altamente letal para humanos, que foi reportada pela primeira vez na Criméia e hoje é amplamente distribuída em várias regiões do mundo, especialmente África, Ásia, Europa, região do mediterrâneo, entre outros. Carrapatos do gênero *Hyalomma* são responsáveis pela transmissão da doença para humanos, que tem emergido em diversas áreas geográficas (Aslam et al., 2016). Estudos na Bulgária revelaram que alguns fatores ambientais como aumento da temperatura média, áreas de cobertura vegetal do tipo savana e fragmentação do habitat aumentam significativamente os riscos da doença nas áreas afetadas (Vescio et al., 2012).

A designação “arbovírus” (do inglês arthropod-borne virus) compreende um grupo polifilético de vírus transmitidos por vetores artrópodes que exploram diferentes estratégias replicativas. A grande maioria está distribuída por quatro famílias de vírus de genoma de

RNA: Togaviridae (gênero *Alphavirus*), Flaviviridae (gênero *Flavivirus*), Bunyaviridae (gêneros *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Orthobunyavirus*) e Reoviridae (gênero *Coltivirus*). Estes vírus são, normalmente, transmitidos ao homem e aos outros animais durante as refeições sanguíneas dos seus vetores hematófagos (carrapatos, flebótomos e culicídeos) persistentemente infectados, nos quais replicam até atingirem as glândulas salivares. (Parreira et al., 2012).

No Brasil, a maioria das viroses transmitidas por artrópodes (arboviroses) se deve ao gênero *Flavivirus* (Figueiredo, 2000). Estes são vírus envelopados esféricos com aproximadamente 50 nm de diâmetro. Duas proteínas virais (M e E) estão ancoradas no envelope da bi-camada lipídica, que envolve o nucleocapsídeo (Figura 1). O nucleocapsídeo é constituído por várias unidades de proteína C envolvendo o genoma viral, um RNA de cadeia simples de sentido positivo com aproximadamente 11kb. O genoma de RNA contém apenas uma fase aberta de leitura (ORF – open reading frame), flanqueada por regiões 5' e 3' não codificadoras (5' NCR e 3' NCR) que desempenham um papel importante nos processos de tradução e replicação (Figura 2). A ORF codifica uma única poliproteína que é posteriormente clivada, originando três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (Lindenbach et al., 2011).

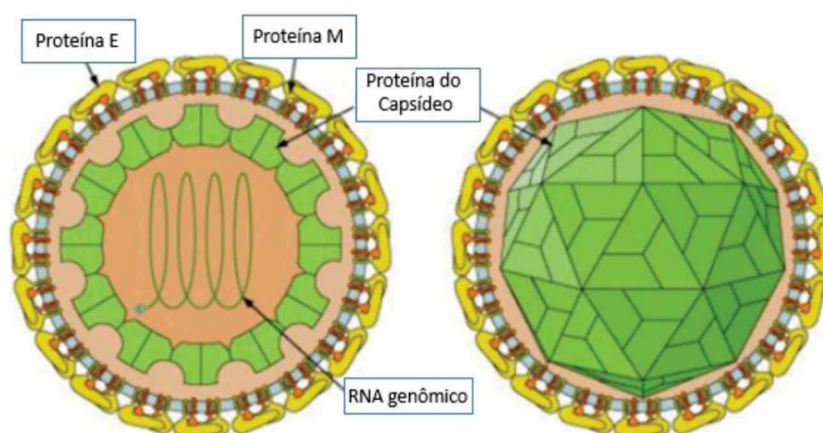


Figura 1. Organização estrutural da família Flaviviridae. Nucleocapsídeo icosaédrico envolvendo o RNA viral.

Fonte: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/6756.html

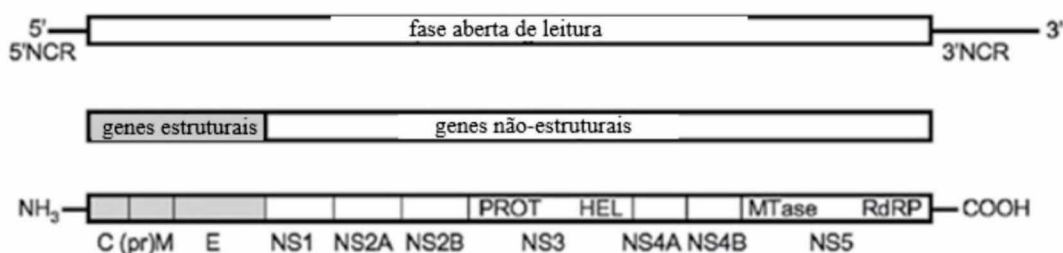


Figura 2. Organização genômica dos flavivírus. NCR: região não codificadora.

Fonte: Jääskeläinen, 2011.

Arbovírus têm uma distribuição geográfica bastante ampla abrangendo todos os continentes, tanto nas regiões temperadas como nas tropicais com predominância nestas últimas, certamente por oferecerem condições ecológicas mais favoráveis aos vetores. Nos trópicos, os vetores coexistem com os hospedeiros vertebrados em todas as estações do ano, ao passo que, nos países de clima temperado, o ciclo de transmissão é interrompido durante o inverno, reiniciando-se na primavera ou verão (Brooks et al., 2012). No entanto, aqueles transmitidos por carrapatos são menos estudados do que os transmitidos por insetos, mas sabe-se que a principal rota de transmissão viral por carrapatos infectados é através da saliva secretada durante o repasto sanguíneo (Almeida et al., 2010).

Entre os vírus transmitidos por carrapatos, membros da família Flaviviridae desempenham um papel importante. Pertencente a essa família, o gênero *Flavivirus* teve importância médica reconhecida mundialmente. O sorogrupo TBE (encefalite transmitida por carrapatos), com os seus três subtipos, Europeu, Siberiano e Extremo Oriente, é o arbovírus clinicamente mais importante. Contudo, vários outros flavivírus transmitidos por carrapatos, responsáveis por doenças humanas e animais, não são extensivamente descritos na literatura. Entre eles estão o vírus da febre hemorrágica OMSK, o vírus Loupping ill, o vírus da Floresta Kyasanur, o vírus Powassan e o vírus Langat (Dobler, 2010).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2011), a encefalite transmitida por carrapatos (TBE) é a doença mais importante e generalizada causada por arbovírus e transmitida por carrapato na Europa. Cerca de 10000 - 12000 casos clínicos de TBE são relatados a cada ano, mas acredita-se que esse número seja significativamente inferior ao total real. A maioria das infecções com o vírus resulta de picadas de carrapatos adquiridas durante as atividades ao ar livre em áreas florestais.

Carrapatos atuam tanto como vetor quanto como reservatório do vírus da encefalite transmitida por carrapato (TBEV). Os principais hospedeiros são pequenos roedores, sendo os seres humanos hospedeiros acidentais. Grandes animais podem ser hospedeiros para os carrapatos, mas não desempenham um papel na manutenção do vírus. O vírus pode infectar cronicamente carrapatos sendo transmitido transtadialmente (a partir de larva para ninfa e de ninfa para carrapatos adultos) e transovarianamente (da fêmea adulta de carrapatos através dos ovos) (Brooks et al., 2012; Parreira et al., 2012).

Importante enfatizar que não é necessária uma viremia para que haja transmissão do vírus para os carrapatos. Um conceito de extrema importância na epidemiologia do TBEV é o “co-feeding” ou co-alimentação. Leucócitos migram entre sítios de alimentação de carrapatos, transportando vírions infecciosos entre carrapatos que se alimentam em um mesmo sítio, proporcionando uma via de transporte para o vírus independente de uma viremia sistêmica. Este processo depende de dois estágios de carrapatos, ninfas infectadas se alimentando com larvas não infectadas em um mesmo local, apresentando padrões semelhantes de atividade sazonal, determinada pelo aumento da temperatura na primavera, fato que ocorre em algumas áreas geográficas de distribuição do carrapato *Ixodes ricinus* (Labuda; Nuttall, 2004; Parola et al., 2013; Randolph et al., 2011).

Uma outra forma de transmissão de TBEV se dá pela ingestão de leite cru de cabras e vacas infectadas após pastarem em locais infestados por carrapatos, onde exista um ciclo no

carrapato e no roedor (Brooks et al.; 2012; Dumpis et al., 1999). O roedor hospedeiro permite não só a manutenção do vírus durante longos períodos de tempo através de uma infecção persistente, como também o amplifica; além de funcionar como reservatório na natureza (Mansfield et al., 2009).

O cão pode servir como hospedeiro para todos os três estágios da vida do carrapato *Ixodes ricinus*, responsável pela transmissão da doença, isto é, larvas, ninfas e adultos (Pfeffer; Dobler, 2011).

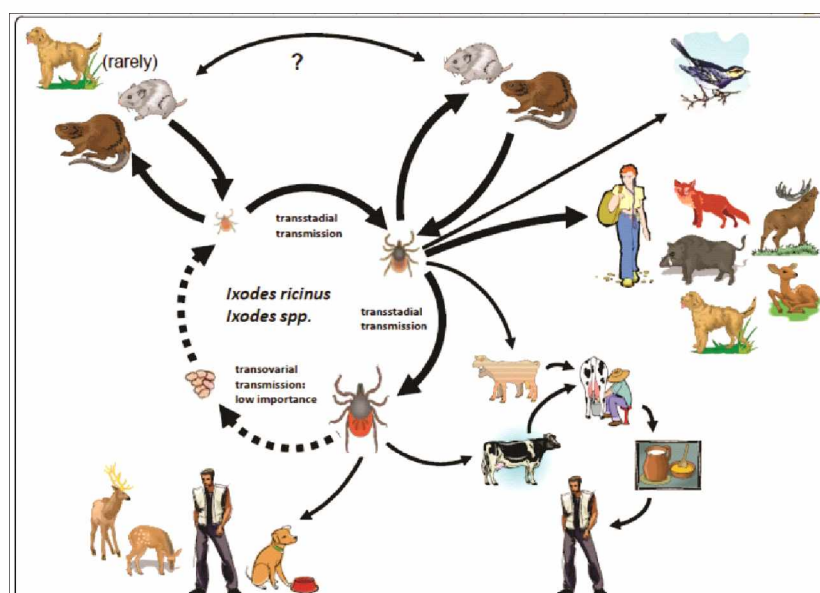


Figura 3. Ciclo do vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) na natureza. Fonte: Pfeffer; Dobler, 2011.

O vírus *West Nile* transmitido por mosquitos para humanos foi repetidamente isolado de carrapatos de aves na Rússia (Labuda; Nuttal, 2004). No Brasil, apesar das pesquisas por vírus em carrapatos serem incipientes, Figueiredo et al. (1999), isolaram um Flavivirus de carrapato do complexo *Amblyomma cajennense* coletado de uma capivara doente em Matão/SP, no entanto, este vírus não foi caracterizado. Almeida et al. (2010), em estudo para detecção do vírus da diarréia viral bovina (BVDV) em carrapatos *Rhipicephalus microplus*, demonstraram experimentalmente a possibilidade de infecção por BVDV do carrapato bovino

através do repasto sanguíneo em animais, confirmando a importância do estudo de vetores hematófagos na epidemiologia de agentes virais de animais domésticos.

Mais recentemente, transcrições semelhantes às que codificam proteínas não estruturais (NS), NS3 e NS5 de flavivírus, foram encontradas em uma glândula salivar a partir do DNA complementar (cDNA) do carrapato do gado *Rhipicephalus microplus*. Análises filogenéticas revelaram que este novo vírus potencialmente seja um membro altamente divergente do gênero *Flavivirus*, que foi designado vírus do carrapato Mogiana (MGTV) devido a região onde foi isolado. Estes resultados destacam a importância de se estudar a presença de arbovírus em *R. microplus* e as associações desses vírus com vetores e hospedeiros vertebrados. O ciclo de transmissão potencial e patogenicidade do MGTV ainda tem que ser definido. (Maruyama et al., 2013).

Outros microrganismos além dos vírus possuem grande relevância em saúde pública. Riquetsias são os principais agentes de zoonoses transmitidas por carrapatos no Brasil (Labruna, 2009). As bactérias incluídas na ordem Rickettsiales foram as primeiras descritas como bacilos gram-negativos que retinham fucsina básica quando coradas pelo método de Gimenez e que cresciam em associação com eucarióticos (Roux et al., 1996). A classificação das bactérias do gênero *Rickettsia* é ainda motivo de debate científico. Em uma classificação recente Parola et al. (2013) classificaram esse gênero em quatro grupos: grupo do tifo (TG) com membros de relevância para a saúde pública como *R. typhi* e *R. prowazekii*, o grupo *Rickettsia canadensis*; grupo *Rickettsia bellii* e o grupo da febre maculosa (GFM). Este último inclui diversas espécies patogênicas e que são transmitidas por carrapatos. A utilização de métodos de PCR e sequenciamento para a identificação de riquetsias do GFM têm levado a novas descobertas sobre a distribuição geográfica dessas e sobre a associação carrapato – riquetsia (Parola et al., 2013).

No Brasil, até recentemente, a única riquetsiose humana conhecida transmitida por carrapatos era a Febre Maculosa Brasileira causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*. Com elevada mortalidade, essa doença tem sua expansão mais recente no Sudeste brasileiro atribuída à expansão das populações de capivaras e carrapatos do complexo *A. cajennense* nas proximidades de áreas urbanas. Casos humanos também ocorrem em áreas de interface de Mata Atlântica que abrigue carrapatos da espécie *A. aureolatum* (Pinter; Labruna, 2006; Scinachi et al., 2017). Uma segunda riquetsiose humana, mais branda, foi recentemente identificada no Brasil e atribuída a uma riquetsia (cepa Mata Atlântica) transmitida por carrapatos *A. ovale* (Silva et al., 2011; Spolidorio et al., 2010).

A epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* é ainda pouco compreendida. Porém, a reemergência da enfermidade humana está vinculada ao crescimento de populações de capivaras em proximidade ao homem (quando é transmitida por carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense*) ou associada aos cães que veiculam carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados de áreas de Mata Atlântica (Pinter e Labruna, 2006; revisto por Szabó et al., 2013a; Krawczak et al., 2014).

Relatos recentes sobre carrapatos de animais selvagens em cães são comuns (Queirogas et al., 2012; Szabó et al., 2007; 2013a). O carrapato *Amblyomma ovale* exemplifica esta situação de forma mais específica para a saúde pública. Parasita de carnívoros em sua forma adulta (Labruna et al., 2005) este carrapato é comum em cães que adentram áreas naturais do Cerrado e Mata Atlântica (Queirogas et al., 2012; Szabó et al., 2013a). Neste contexto é importante considerar que o cão é uma espécie privilegiada em sua convivência com o homem. Além disso, é uma espécie que explora muito o ambiente que o cerca e, se não restrito, percorre distâncias grandes, inclusive áreas selvagens (Queirogas et al., 2010). Desta forma, este hospedeiro se expõe a uma variedade maior de ambientes e potencialmente estabelece um fluxo de vetores e/ou patógenos para seres humanos como por

exemplo, carrapatos e riquétsias (Pinter; Labruna, 2006; Queirogas et al., 2010; Szabó et al., 2013a).

Em ambientes naturais carrapatos integram a fauna parasitária que coexiste com hospedeiros (Campos Pereira et al., 2000) estabelecendo relações que moldam ambos (parasita e hospedeiro) evolutivamente. Embora Hoogstraal e Aeschlimann (1982) tenham afirmado que especificidade por hospedeiros é o principal fator no estabelecimento de populações desses ácaros em uma localidade, observações mais recentes ressaltam que a dependência de espécies de carrapatos por ambientes específicos é de relevância superior na sua distribuição geográfica (Klompen et al., 1996; Nava et al., 2013). Por este motivo as frequentes alterações antrópicas e que aumentam a interface humana com esses ambientes favorecem a emergência de doenças infecciosas ou parasitárias na população humana.

Três quartos das doenças infecciosas emergentes humanas são zoonóticas e a maioria dos patógenos se origina da vida selvagem (Rhyan; Spraker, 2010; Taylor et al., 2001). Neste sentido, é preocupante o fato de que a presença da zona urbana dentro de áreas naturais seja cada vez mais constante, particularmente na periferia, onde os animais selvagens são comuns, como indicado pela alta frequência de animais mortos nas rodovias como capivaras, canídeos selvagens e tamanduás (Garcia et al., 2013). Casos confirmados de febre maculosa em áreas de alta incidência no estado de São Paulo reforçam a tendência de urbanização desta doença em áreas peri-urbanas degradadas (Souza et al., 2015).

Entre os animais selvagens dois grupos são muito frequentes em áreas naturais antropizadas do Cerrado e Mata Atlântica, os tamanduás e canídeos (Almeida et al., 2013; Queirogas et al., 2010). Por este motivo são espécies frequentemente atropeladas ou associadas a conflitos homem-animal conforme evidenciado pelo grande número de lotes com amostras de carrapatos desses animais na coleção de carrapatos da Universidade Federal de Uberlândia. Espécies selvagens como os tamanduás, com ampla distribuição geográfica no

Brasil (Reis, 2006), albergam várias espécies de carrapatos como, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma pseudoconcolor* e inclusive um dos vetores da bactéria *R. rickettsii*, o *Amblyomma sculptum* (complexo *Amblyomma cajennense*) (Arzua et al., 2005; Bechara et al., 2002; Campos Pereira et al., 2000; Martins et al., 2004; Martins et al., 2011). No caso dos canídeos selvagens, parasitismo por diversas espécies como *Amblyomma ovale*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma tigrinum* e *Amblyomma parvum* são frequentes (Labruna et al., 2005). As duas primeiras em especial são importantes por poderem picar seres humanos e transmitir riquetsioses (Pinter; Labruna, 2006; Szabó et al., 2013). Porém, de forma geral, pouco se conhece a respeito dos patógenos transmitidos por estas espécies de carrapatos mas sabe-se que dentre os diversos microrganismos em carrapatos que parasitam animais selvagens, diferentes espécies de riquetsias podem ser particularmente patogênicas para seres humanos (Labruna, 2009).

Dentre os diversos biomas, dois foram particularmente degradados no Brasil, a Mata Atlântica e o Cerrado (Marris, 2005; Tabarelli et al., 2005). Ambos são considerados como “hotspots” da biodiversidade global, ou seja, possuem um número particularmente elevado de espécies endêmicas e estão muito ameaçados pelas atividades humanas (Cincotta et al., 2000; Myers et al., 2000). Estes biomas também albergam a maioria da população brasileira com a presença das maiores aglomerações urbanas do país. A fragmentação das áreas naturais destes biomas pelas atividades produtivas e urbanização dos últimos séculos associadas às medidas mais recentes de conservação e reconstituição de reservas (muitas urbanas), além da alteração comportamental do homem frente à vida selvagem, criam novos efeitos sobre a biodiversidade com consequências ainda desconhecidas.

Considerando-se os motivos expostos acima, esta tese compõe-se de três artigos, com os objetivos gerais de identificar carrapatos vetores em áreas do Cerrado e Mata Atlântica adjacentes a áreas com atividade humana; pesquisar por patógenos causadores de zoonoses,

Rickettsia spp. e *Flavivirus*, em carrapatos destas mesmas áreas em interface com atividade humana. Os objetivos específicos incluem:

- Pesquisar por riquetsias associadas a carrapatos de carnívoros selvagens e cães domésticos em área de Cerrado;
- Identificar carrapatos vetores de riquetsias associados a tamanduás em áreas de Cerrado impactadas por atividade agropecuária no Brasil Central;
- Pesquisar por flavivírus em carrapatos de animais domésticos (cães, bovinos, equinos), selvagens (capivaras e canídeos selvagens) e do ambiente, em áreas do Cerrado e da Mata Atlântica brasileiros;
- Correlacionar as espécies de carrapatos com patógenos específicos;
- Colaborar com o conhecimento da distribuição geográfica de vetores e patógenos associados no Brasil.

REFERÊNCIAS

- Almeida, L.L., Marks, F.S., Junior, J.R., Santos, A.S., Gomes, D.C., Junior, I.S.V., Driemeier, D., Canal C.W., 2010. Detecção do vírus da diarreia viral bovina em carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentados em bovino persistentemente infectado. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38(2): 155-159.
- Arzua, M., Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., 2005. Catalogue of the tick collection (Acari: Ixodidae) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool* 22: 623-632.
- Aslam, S., Latif, M.S., Daud, M., Rahman, Z.U., Tabassum, B., Riaz, M.S., Khan, A., Tariq, M., Husnain, T., 2016. Risk factors and control measures for the abatement of CCHF infection. *Biomedical Reports* 4: 15-20.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Almeida-Filho, W.V., Bechara J.N., Pereira, R.J., Garcia, J.E., et al., 2001. Ticks associated with armadillo (*Euphractus sexcinctus*) and anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) of Emas National Park, state of Goiás, Brazil. *Ann N Y Acad Sci*; 969: 290-293.
- Brooks, G.F., Karroll, K.C., Butel, J.S., Morse, S. A., Mietzner, T. A. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick e Adelberg*. 25ª edição, AMGH Editora Ltda, 2012. cap. 38, pág. 518 - 535.
- Campos-Pereira M, Szabó MPJ, Bechara GH et al. 2000. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 37(6): 979-983.
- Cincotta, R.P., Wisniewski, J., Engelman, R., 2000. Human populations in the biodiversity hotspots. *Nature*, v. 404, n.27, p. 990-992.
- Cupp, E.W., 1991. Biology of ticks. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.21, n.1, p.1-25.
- Dobler, G., 2010. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Veterinary Microbiology*. V. 140, (3–4), 221–228.
- Dumpis, U.; Crook, D.; Oksi, J., 1999. Tick-Borne Encephalitis. *CID* 1999;28. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/>. Acesso em 29 jan 2014
- Estrada-Peña, A., Jongejan, F., 1999. 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.
- Figueiredo, T. M., Badra, S. J., Pereira, L. E., Szabó, M. P. J., 1999. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n.6, p.613-619.
- Garcia, M.V., Silva, D. C., Almeida, R.F.C., Cunha, R. C., Matias, J., Barros, J. C., Andreotti, R., Szabó, M.P.J., 2013. Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo

Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 124-128.

Hoogstraal, H.; Aeschlimann, A., 1982. Tick-host specificity. Bulletin de la Societe entomologique Suisse, v.55, p.5-32.

INPE. 2016. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Estudo aponta os riscos da exploração do Cerrado. Disponível em: http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=4370

Jääskeläinen, A.E., Tonteri, E., Sironen, T., Pakarinen, L., Vaheri, A., Vapalahti, O., 2011. European Subtype Tick-borne Encephalitis Virus in *Ixodes persulcatus* Ticks. Emerg Infect Dis. 17(2): 323–325.

Jongejan, F, Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. Parasitology, London, v. 129, Supplement S1, p. S3-S14.

Krawczak, F.S., Nieri-Bastos, F.A., Nunes, F.P., Soares, J.F., Moraes-Filho, J., Labruna, M.B., 2014. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. Parasite Vectors 7, 1–7.

Labuda, M.; Nuttall, P.A., 2004. Tick-borne viruses. Parasitology, v.129: S221-245.

Labruna, M.B., Jorge, R.S.P., Sana, D.A., Jacomo, A.T.A., Kashivakura, C.K., Furtado, M.M., et al., 2005. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. Exp.Appl. Acarol. 36, 149–163.

Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. In: Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference, 1166, 2009, New York. Annals New York Academy of Sciences. p.156–166.

Lindenbach, B.D., Thiel H.J., Rice C.M., 2011. Fields Virology. In: *Flaviviridae: the viruses and their replication*. Lippincot William & Wilkins, Philadelphia; 2011: 1101-1151.

Marris, E., 2005. The forgotten ecosystem. Nature, v.437, n.13, p.944-945.

Martins, J.R, Medri, I.M., Oliveira, C.M., Guglielmone, A., 2004. Occurrence of ticks on giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) and collared anteater (*Tamandua tetradactyla*) in the pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. Ciência Rural, Santa Maria, v 34, p 293-295.

Martins, T. F., Furtado, M. M., Jacomo, A. T. A., Silveira, L., Sollmann, R., Torres, N. M., Labruna, M. B., 2011. Ticks on free-living wild mammals in Emas National Park, Goiás State, central Brazil. Systematic & Applied Acarology, v. 16, n. 3, p. 201-206.

Martins, T.F; Fecchio, A.; Labruna, M.B., 2014. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) on wild birds in the Brazilian Amazon. Systematic & Applied Acarology 19(4): 385–392.

Maruyama, S.R.; Castro-Jorge, L. A.; Ribeiro, J. M. C.; Gardinassi, L. G.; Garcia, G. R.; Brandão, L. G.; Rodrigues, A. R.; Okada, M. I.; Abrão, E. P.; Ferreira, B. R.; Fonseca, B. A. L.; Miranda-Santos, I. K. F. Characterisation of divergent flavivirus NS3 and NS5 protein

sequences detected in *Rhipicephalus microplus* ticks from Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro: 1-13, 2013.

Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Fonseca, G.A.B; Kent, J., 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. Nature, v.403, p.853-858.

Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* sp., *Amblyomma interandinum* sp. and *Amblyomma patinoi* sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). Ticks Tick Borne Dis. 5: 252–76.

Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. Clin. Microbiol. Rev. 26, 657–702.

Parreira, R.; Piedade, J.; Esteves, A., 2012. Virus transmitidos por mosquitos. Anais... Instituto de Higiene e Medicina Tropical, v.11, p. 66-67.

Pinter, A., Labruna, M.B., 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia felis* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. Ann.N.Y. Acad.Sci. 1078, 523–530.

Queirogas, V.L.D., Oliveira, L.M.D., Marques, R.L. et al., 2010. Carrapatos (Acari: Ixodidae) em cães domésticos no Parque Estadual Serra de Caldas Novas, Goiás: considerações epidemiológicas. Biota Neotrópica, Campinas, 10 (1): 347-349.

Queirogas, V.L., Del Claro, K., Nascimento, A.R.T., Szabó, M.P.J., 2012. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. Experimental and Applied Acarology, 57(1): 75-82.

Ramos, V.N., Piovezan, U., Franco, A.H.A., Rodrigues, V.S., Nava, S., Szabó, M.P.J., 2016. Nellore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological relationships. Exp Appl Acarol, 68:227–240.

Randolph S. E., 2011. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. Ticks and Tick-borne Diseases 2, 179–182.

Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., 2006. Mamíferos do Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina.

Rhyan, J.C.; Spraker, T.R., 2010. Emergence of Diseases from wildlife reservoirs. Veterinary Pathology 47(1): 34-39.

Roux, V., Fournier, P. E. & Raoult, D., 1996. Differentiation of Spotted Fever Group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. J Clin Microbiol 34, 2058-2065.

Scinachi, C.A., Takeda, G.A.C.G., Mucci, L.F., Pinter, A., 2017. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. Acta Tropica, 166: 225-233.

Silva, N., Eremeeva, M.E., Rozental, T., Ribeiro, G.S., Paddock, C.D., Ramos, E.A.G., Favacho, A.R.M., Reis, M.G., Dasch, G.A., de Lemos, E.R.S., Ko, A.I., 2011. Eschar-associated spotted fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. Emerg. Infect. Dis. 17, 275–278.

Sonenshine DE, Nicholson WL, Lane RS. Ticks (Ixodida). In: Mullen G, Durden L, editors. Medical and veterinary entomology. 1st ed. Amsterdã: Academic Press Elsevier Science; 2002. p. 517-558.

Souza, C.E., Pinter, A., Donalisio, M.R., 2015. Risk factors associated with the transmission of Brazilian spotted fever in the Piracicaba river basin, State of São Paulo, Brazil. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., Uberaba, v. 48, n. 1, p. 11-17.

Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Mantovani, E., Brandão, P., Richtzenhain, L.J., Yoshinari, N.H., 2010. Novel spotted fever group rickettsioses, Brazil. Emerging Infectious Diseases, 16(3): 521-523.

Szabó, M.P.J.; Pinter, A.; and Labruna, M.B., 2013a. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3:27.

Tabarelli, M., Pinto, L.P., Silva, J.M.C., Hirota, M.M., Bedê, L.C., 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. Megadiversidade, v. 1, 1.

Taylor, L.H., Latham, S. M., Woolhouse, M.E.J., 2001. Risk factors for human disease emergence. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B 356 (1411): 983-989.

Vescio, F.M., Busani, L., Mughini-Gras, L., Khoury, C., Avellis, L., Taseva, E., Giovanni Rezza, G., Christova, I., 2012. Environmental correlates of Crimean-Congo haemorrhagic fever incidence in Bulgaria. BMC Public Health, 12:1116.

World Health Organization (WHO) (2011) disponível em: http://www.who.int/immunization/topics/tick_encephalitis/en/. Acesso em: 20 jan 2014.

Capítulo 2

Riquétsias associadas a carrapatos de carnívoros selvagens e cães domésticos em área de Cerrado no Estado de Goiás, Brasil

RESUMO

Foi objetivo deste trabalho identificar espécies de riquetsias em carrapatos de canídeos selvagens e cães domésticos em região de contato entre esses, sob intenso impacto antrópico, em área do Cerrado brasileiro. Para pesquisa de riquetsias, todas as amostras foram submetidas individualmente ao teste de reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificação do gene que codifica a enzima citrato sintase ou CS2 (*glTA*), presente em todas as riquetsias. As amostras positivas nesta primeira PCR, foram então testadas para o gene *ompA*, presente em riquetsias do grupo da febre maculosa (GFM). Protocolos adicionais para amplificação do gene *ompB* e novo protocolo para amplificação de gene específico presente em *Rickettsia bellii*, também foram utilizados. Foram testadas 119 amostras de carrapatos da região de Cumari, sendo 55 de cães domésticos e 64 de carnívoros selvagens, estes últimos, pertencentes a oito espécies: *Chrysocyon brachyurus*, *Lycalopex vetulus*, *Conepatus semistriatus*, *Cerdocyon thous*, *Eira barbara*, *Puma concolor*, *Procyon cancrivorus* e *Nasua nasua*. Cinco amostras amplificaram genes presentes em riquetsias, todos coletados em *C. thous*. Amostras de carrapatos das espécies *A. ovale* e *A. dubitatum* coletadas de *Cerdocyon thous*, amplificaram gene presente no grupo da febre maculosa e simultaneamente, gene presente em *R. bellii*, demonstrando a possibilidade de co-infecção por riquetsias de dois grupos distintos em um mesmo carrapato.

PALAVRAS-CHAVE: cães, carnívoros, carrapatos, cerrado.

INTRODUÇÃO

Distúrbios ambientais causados pelo ser humano, como a perda e fragmentação de habitats, o isolamento genético das populações selvagens e a crescente proximidade do homem e seus animais domésticos com o ambiente silvestre, favorecem a introdução de novos patógenos em populações nativas, tornando-se uma ameaça à biodiversidade (Cunningham et al., 2003). As pressões provocadas sobre o ambiente, como desmatamento, fragmentação, mudanças no uso da terra, têm impacto sobre a biologia e ecologia de artrópodes vetores, e consequentemente, sobre a transmissão de certos patógenos (Otranto et al., 2009).

A procura por moradias em áreas verdes e a reconstituição de áreas naturais aproxima as pessoas do ambiente selvagem. Neste contexto, o cão é um agente de grande importância, devido a sua proximidade com o homem e livre trânsito entre ambientes selvagens e domésticos (Queirogas et al., 2010). Relatos sobre carrapatos de animais selvagens em cães são frequentes, exemplo disso, o carrapato *Amblyomma ovale*, parasita de carnívoros em sua forma adulta (Labruna et al., 2005) é comum em cães que adentram áreas naturais do Cerrado e Mata Atlântica (Queirogas et al., 2012; Szabó et al., 2013a). De forma similar, adultos do *Amblyomma aureolatum*, carrapato de carnívoros selvagens e vetor da Febre Maculosa Brasileira, parasita cães que adentram na Mata Atlântica (Scinachi et al., 2017).

De maneira oposta, animais selvagens que acessam áreas antropizadas podem acidentalmente ser parasitados por carrapatos típicos de animais domésticos, como o carrapato do boi (*Rhipicephalus microplus*) e o carrapato do cão doméstico (*R. sanguineus*) (Dantas-Torres et al. 2010; Labruna et al. 2005; Szabó et al. 2001). Canídeos selvagens também podem ser afetados por patógenos de canídeos domésticos, como revelou estudo no Brasil realizado em ambiente silvestre com presença de populações humanas (Curi et al., 2010).

A alta prevalência do carrapato *Amblyomma sculptum* em animais domésticos, selvagens e no ambiente, confirma ser esta uma espécie generalista e amplamente distribuída no Cerrado e Pantanal (Campos Pereira et al., 2000; Cançado, 2008, Ramos et al., 2016; Szabó et al., 2007; Veronez et al., 2010), inclusive em áreas sobre impacto antrópico (Garcia et al., 2013; Queirogas et al., 2012). É o principal transmissor da bactéria *Rickettsia rickettsii* no Brasil, responsável pela doença de maior letalidade entre as riquetsioses no país, conhecida por Febre Maculosa Brasileira (Labruna, 2009). No entanto, *R. rickettsii* e outras riquetsias do grupo da febre maculosa (GFM), têm sido encontradas em diferentes espécies de carrapatos (Almeida et al., 2013a, b; Matias et al., 2015; Ogrzewalska et al., 2013).

A raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) são espécies típicas do Bioma Cerrado (Jácomo et al., 2004) e que ocorrem em áreas sobre impacto antrópico, como propriedades rurais com atividade agropecuária (Lemos et al., 2011). Sabe-se que as atividades agropecuárias são as principais formas de ocupação desse bioma, que tem cerca de 34% de sua extensão apenas considerados não-antropizados (Machado et al. 2004). A proximidade cada vez mais frequente de animais selvagens e domésticos é confirmada pelo parasitismo de animais silvestres por carrapatos comumente encontrados em animais domésticos (Martins et al., 2015) e vice-versa (Queirogas et al., 2012).

Considerando-se a interferência sobre áreas naturais, e que os cães, animais em estreito contato com os seres humanos, compartilhem a mesma área que canídeos selvagens nestes ambientes sobre impacto antrópico, este estudo teve por objetivo associar espécies de carrapatos infestando canídeos selvagens e cães domésticos com riquetsias em região de contato entre esses hospedeiros em área do Cerrado brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

As coletas foram realizadas no município de Cumari, região do Limoeiro (18°15'S, 48°09'W), localizada no sudoeste de Goiás, e abrangia propriedades criadoras de gado (*Bos taurus indicus*). A região estudada está inserida no bioma Cerrado e foi representada por fragmentos de cerrado sensu stricto e floresta semi-decídua original e secundária pequenos e médios (até 500 ha) misturadas com pastagem exótica (*Brachiaria* sp.), pequenas culturas anuais (milho, cana-de-açúcar e soja) e silvicultura (seringueiras). O clima é caracterizado por uma estação quente e úmida (outubro a março) e uma estação fria e seca (abril a setembro) (Sano & Almeida 1998). Algumas amostras também foram obtidas no município vizinho, Araguari, no Estado de Minas Gerais, que apresenta vegetação e características climáticas semelhantes. Outras ainda foram coletadas em uma reserva natural (17 ° 46'S e 48 ° 39'O) a 77 km de Cumari, Parque Estadual da Serra de Caldas Novas (PESCAN), Estado de Goiás. Esta reserva tem 12.500 ha, com clima similar, mas com fitofisionomias de Cerrado preservadas (Sano & Almeida 1998).

Esta região foi escolhida para pesquisa de riquetsias nestes animais, pois se encontrava no Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, coordenado por docente da Universidade Federal de Goiás (Frederico Gemesio Lemos), cujo projeto definiu os pontos de amostragem coincidentes com áreas utilizadas por canídeos selvagens: raposa do campo (*Lycalopex vetulus*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).

Captura dos canídeos selvagens e cães domésticos

Os animais selvagens foram capturados em armadilhas de gaiola utilizando como iscas sardinha enlatada e frango frito que foram substituídos a cada três dias ou após uma captura.

As armadilhas foram colocadas em locais com registro prévio da presença dos animais por meio de identificação de pegadas e fezes, ou observação direta. Foram distribuídas nos locais estudados, sob vegetação para proteção do sol da manhã e evitando a presença de formigas agressivas. Os animais capturados foram anestesiados para exame clínico, biometria, coleta de amostras biológicas e identificação conforme protocolo disponível em Lemos (2016). Após a recuperação completa da anestesia, os animais foram libertados no seu ponto de captura. Carnívoros capturados acidentalmente nas armadilhas também foram inspecionados para presença de carrapatos. Os cães domésticos foram contidos manualmente e tiveram a superfície corporal inspecionada por cerca de 10 minutos para coleta de carrapatos, estes foram acondicionados em frascos identificados. O projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG; processo número 086/14) e pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU; processo número 089/14).

Coleta e identificação de carrapatos

As coletas foram realizadas nos anos de 2008 a 2014. Os carrapatos coletados foram acondicionados em frascos individuais identificados por carnívoro ou por cão e transportados para o Laboratório de Ixodologia. Carrapatos adultos e ninfas foram identificados de acordo com chaves dicotômicas (Martins et al. 2010; Onofrio et al. 2006) e por comparação com a coleção de referência do Museu de Carrapatos do Laboratório de Ixodologia da UFU. Após este procedimento os carrapatos foram mantidos em álcool 70 GL ou congelados a -70 °C.

Extração de DNA e detecção de riquetsias

Uma amostra dos carrapatos coletados nas regiões mencionadas anteriormente, armazenados no Laboratório de Ixodologia da UFU, foi submetida à extração de DNA para posterior pesquisa de riquetsias. Os carrapatos adultos e ninfas identificados foram processados individualmente para extração de DNA pelo método de tiocianato de guanidina

(Sangioni et al. 2005). Algumas amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) com o primer 16S para amplificar uma porção de cerca de 460 pares de base do gene mitocondrial 16S rDNA (Mangold et al, 1998) para confirmar o sucesso da extração.

Para pesquisa de riquetsias, todas as amostras foram submetidas individualmente a uma PCR para amplificação do gene que codifica a enzima citrato sintase ou CS2 (*gltA*), característico do gênero *Rickettsia*, conforme descrito por Labruna et al. (2004). As amostras positivas nesta primeira PCR, foram posteriormente testadas para outras reações. A primeira amplifica um fragmento do gene *ompA*, que codifica uma proteína de membrana externa de 190-kDa, presente apenas em riquetsias do GFM (Regnery et al., 1991). Protocolo adicional foi utilizado para amplificar o gene rickettsial *ompB*, presente no GFM e Grupo do Tifo (Roux & Raoult, 2000). As amostras que amplificaram o gene *gltA* e não amplificaram fragmentos presentes no GFM, foram testadas para *R. bellii*, utilizando protocolo descrito por Szabó et al., 2013. Em cada PCR foram incluídos controles negativo e positivo. Amostras positivas foram purificadas e enviadas para sequenciamento em laboratório credenciado para posterior comparação das sequências através do programa BLAST (Altschul et al. 1990). As sequências de primers utilizados nestas reações encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Primers utilizados nas reações em cadeia da polimerase para pesquisa de riquetsias

Primer	Sequência (5'-3')	Frag. amplif.	Gene/ região	Referência
16S-F	CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T	460 pb	16S	Mangold et
16S-R	GCT CAA TGA TTT TTT AAA TTG CTG T			al., 1998
CS-78	GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT	401 pb	<i>gltA</i>	Labruna et
CS-323	GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T			al., 2004
Rr190.70p	ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA	532 pb	<i>ompA</i>	Regnery et
Rr190.602n	AGT GCA GCA TTC GCT CCC CCT			al., 1991
120-M59	CCG CAG GGT TGG TAA CTG C	862 pb	<i>ompB</i>	Roux and
120-807	CCT TTT AGA TTA CCG CCT AA			Raoult, 2000
BELLI-F	ATC CTG ATT TGC TGA ATT TTT T	338 pb	<i>gltA</i>	Szabó et al.,
BELLI-R	TGC AAT ACC AGT ACT GAC G			2013

RESULTADOS

Quanto à presença de riquetsias foram analisados no total, 119 carrapatos da região de Cumari, sendo 55 de cães domésticos e 64 de carnívoros selvagens. Diversos outros carnívoros foram capturados acidentalmente e desses, carrapatos coletados e avaliados. Os carnívoros pertenceram à oito espécies diferentes, a saber: *Chrysocyon brachyurus*, *Lycalopex vetulus*, *Conepatus semistriatus*, *Cerdocyon thous*, *Eira barbara*, *Puma concolor*, *Procyon cancrivorus* e *Nasua nasua*. As espécies, número e estágio de vida de carrapatos analisados para riquetsias, assim como as espécies animais à qual pertenciam, são apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Espécies de carnívoros e número de carrapatos avaliados quanto à presença de *Rickettsia* sp. na região de Cumari, Goiás e adjacências.

Nome científico	Nome popular (Nº hosp. avaliados)	<i>R.sanguineus</i>	<i>D. nitens</i>	<i>A. sculptum</i>	<i>A. ovale</i>	<i>R. microplus</i>	<i>A. dubitatum</i>
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Lobo Guará (4)			3N 3F			
<i>Lycalopex vetulus</i>	Raposinha (13)			5N 5F 2M	1F	1F	
<i>Conepatus semistriatus</i>	Jeritataca (2)			1N	1F		
<i>Cerdocyon thous</i>	Cachorro do mato (32)			19N 4F 2M	1F		4N 2F
<i>Eira barbara</i>	Irara (2)			1N 1F			
<i>Puma concolor</i>	Onça parda (5)		1M	2N	1F	1M	1N
<i>Procyon cancrivorus</i>	Mão pelada (1)				1F		
<i>Nasua nasua</i>	Quati (1)			1F			
<i>Canis lupus familiaris</i>	Cão doméstico (32)	2F 1M		51N 1F			
Total	92	3	1	101	5	2	7

N: ninfa; M: macho; F: fêmea

Os carrapatos coletados nos cães domésticos e submetidos à PCR não apresentaram amplificação de genes riquetsiais. Quanto aos carnívoros, apenas a espécie *Cerdocyon thous*, popularmente conhecida como cachorro-do-mato, exibiu cinco amostras positivas em PCR, cada qual pertencente a um animal. A tabela 3 apresenta as espécies de carrapatos positivas e os genes amplificados.

Tabela 3. Espécies de carrapatos pertencentes a Cachorro do Mato da região de Cumari, que apresentaram amostras positivas em PCR

<i>Cerdocyon thous</i>	Origem do Hospedeiro	Carrapato	Estágio	CS2	<i>ompB</i>	<i>R. bellii</i>
A	Cumari	<i>A. sculptum</i>	Ninfa	positivo		
B	Cumari	<i>A. ovale</i>	Fêmea	positivo	positivo	positivo
C	Cumari	<i>A. dubitatum</i>	Fêmea	positivo		
D	Cumari	<i>A. dubitatum</i>	Ninfa	positivo	positivo	positivo
E	Cumari	<i>A. dubitatum</i>	Ninfa	positivo		positivo

Nenhuma das amostras amplificou o gene *ompA*. Três amostras foram positivas em PCR que amplifica gene presente exclusivamente em *Rickettsia bellii* (Szabó et al., 2013), destas, duas (amostras B e D) foram positivas também para o gene *ompB*, reação esta que foi repetida por sete vezes para confirmação.

As amostras positivas para o gene *ompB* foram enviadas para sequenciamento, mas apresentaram produtos de baixa qualidade, não sendo possível a análise comparativa de sequências pelo GenBank. Quanto aos produtos da PCR para *R. bellii*, os primers são específicos, portanto não foram enviados para sequenciamento.

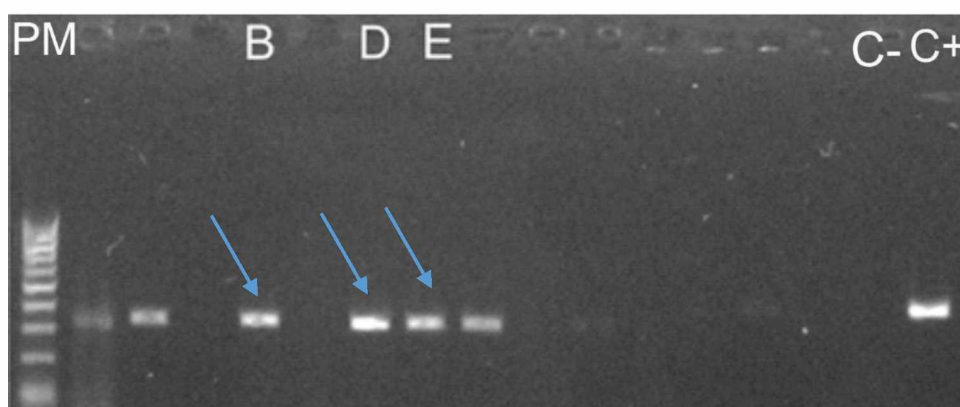


Figura 1. Eletroforese de produtos de PCR para detecção de *R. bellii*. B,D,E: amostras de carrapatos coletadas em *Cerdocyon thous* (conforme tabela 3). C+: controle positivo (*R. bellii* cultura de células); C-: controle negativo (água para biologia molecular); PM: padrão de peso molecular de 100 pb. As setas indicam as bandas formadas pelo produto de PCR com tamanho de “amplicon” esperado (338 pb).

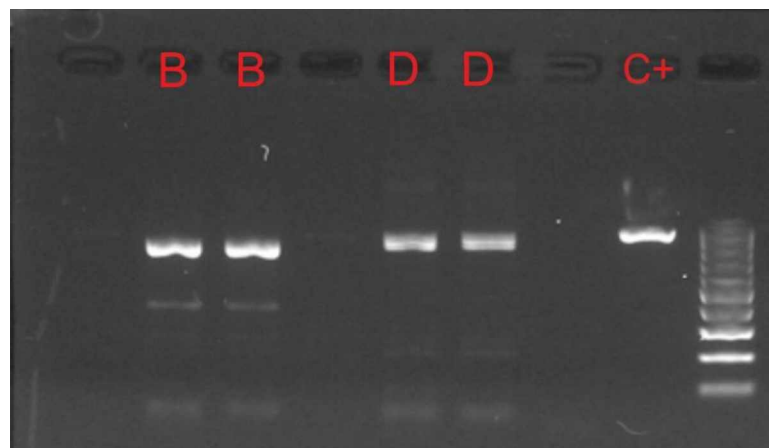


Figura 2. Eletroforese de produtos de PCR para detecção de gene *ompB*. B, D: amostras em repetição de carrapatos coletadas em *Cerdocyon thous* (conforme tabela 3) com bandas formadas pelo produto de PCR com tamanho de “amplicon” esperado (862 pb). C+: controle positivo (*R. parkeri* cepa NOD cultura de células); C-: controle negativo (água para biologia molecular); PM: padrão de peso molecular de 100 pb.

DISCUSSÃO

Foi objetivo foi avaliar a maior diversidade de espécies de carrapatos de diversos hospedeiros selvagens e o cão convivendo em fragmentos do Cerrado e áreas rurais e que permitiriam um intercâmbio do parasito. De fato, das seis espécies de carrapatos coletados e avaliados, algumas são típicas de carnívoros selvagens na forma adulta, como é o caso de *A. ovale* (Labruna et al., 2005) e outras essencialmente mantidas por animais domésticos e com origem externa à região Neotropical como *R. microplus* e *R. sanguineus* (Battesti e Bechara, 2006). Porém a espécie mais prevalente foi *A. sculptum*, razão pela qual um número maior de amostras foi submetido à pesquisa de riquetsias.

Amblyomma sculptum também foi a espécie mais encontrada parasitando animais silvestres, inclusive canídeos, em outros trabalhos realizados em regiões de Cerrado (Bastos et al., 2016; Curi et al., 2010; Martins et al., 2015). Esta espécie generalista, pertencente ao complexo *A. cajennense* (Beati et al., 2013; Nava, et al., 2014), e amplamente distribuída em complexos savânicos como Cerrado e Pantanal (Ramos et al., 2016; Szabó et al., 2007), é a

principal responsável pela transmissão da bactéria *Rickettsia rickettsii* no Brasil (Labruna, 2009). Estava infestando sete das oito espécies de carnívoros silvestres avaliadas e também encontrada nos cães domésticos indicando ser um vetor que potencialmente transmite microorganismos entre diversas espécies de hospedeiros carnívoros. Dessa espécie de carrapato apenas uma ninfa apresentou produto (banda) fraco pelo primer CS2 em reação que amplifica um gene presente em todas as riquetsias. Outros produtos não foram gerados na PCR com os outros primers e não foi possível determinar a qual espécie pertencia essa riquetsia.

Por outro lado, em uma espécie de carrapato de elevada relevância, *A. ovale*, parasitando *Cerdocyon thous*, foi encontrada uma riquetsia. Ao longo do projeto todo foram coletados apenas 3 fêmeas, 3 ninfas e 6 larvas dessa espécie em cães domésticos da Reserva PESCAN e da região de Cumari (dados não publicados). De fato, essa espécie de carrapato é encontrada em números mais reduzidos no Cerrado (Szabó et al., 2007) quando comparado com a Mata Atlântica (Sabatini et al., 2010; Szabó et al., 2013). Esta espécie é comumente encontrada parasitando carnívoros (Curi et al., 2010; Labruna et al., 2005), sendo também registrada em cães domésticos que transitam em reserva ou em seu entorno (Queirogas et al., 2010), foi considerado um dos mais importantes carrapatos na região Neotropical (Guglielmone et al., 2006).

Recentemente constatou-se associação do *A. ovale*, cães domésticos e áreas naturais (Sabatini et al., 2010; Szabó et al., 2013a) com uma riquetsia patogênica para seres humanos no Brasil (Silva et al., 2011; Spolidorio et al., 2010), designada *Rickettsia* cepa Mata Atlântica, responsável por uma doença mais branda do que a transmitida por *R. rickettsii*. Amostra de carrapato *A. ovale* coletado na América Central revelou pela primeira vez a presença de *Rickettsia* cepa Mata Atlântica em hospedeiro selvagem neste local (Lopes et al., 2016). Nesses trabalhos constatou-se a infecção do *A. ovale* na Mata Atlântica em,

aproximadamente, 10% dos carrapatos com a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (Sabatini et al., 2010; Szabó et al., 2013).

Neste estudo, a amostra de *A. ovale* positiva para riquetsia, apresentou amplificação tanto para *R. bellii*, quanto para o gene *ompB*. Segundo Roux & Raoult (2000), o gene *ompB* é amplificado em riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) e do Grupo do Tifo (GT), não havendo amplificação desse gene para *Rickettsia bellii*. Naquele momento, esses mesmos autores consideravam inadequada a classificação que dividia o gênero *Rickettsia* em dois grupos (GFM e GT), uma vez que *R. canadensis* e *R. bellii* não se enquadravam em nenhum dos dois (Roux & Raoult, 2000). Estudos recentes classificaram as riquetsias em quatro grupos: grupo do tifo (TG), onde estão presentes *R. typhi* e *R. prowazekii*, membros de relevância em saúde pública; o grupo *Rickettsia canadensis*; grupo *Rickettsia bellii* e o grupo da febre maculosa (GFM) (Merhej e Raoult, 2010; Parola et al., 2013).

Diante disso, a explicação para amplificação de produtos para dois grupos diferentes de riquetsias pode ser uma co-infecção, ou seja, amostras de carrapatos infectadas com *R. bellii* concomitantemente com uma espécie pertencente ao GFM, isto também explicaria o fato do sequenciamento não ter demonstrado resultado satisfatório. Szabó et al. (2013), demonstraram através de isolamento, ser possível que um mesmo espécime esteja infectado com dois tipos de riquetsias, esse carrapato inclusive, pertencia à espécie *A. ovale*.

Três amostras também positivas para riquetsia em PCR, pertenciam à espécie *A. dubitatum*, sendo que uma delas foi positiva simultaneamente para *Rickettsia bellii* e o gene *ompB*, aplicando-se também a ela a explicação anterior. *Amblyomma dubitatum* é um carrapato que apresenta todos os estágios parasitários fortemente associados com capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), embora já tenha sido coletado em diversas espécies de mamíferos, inclusive *Cerdocyon thous*, portanto, é possível que variáveis ambientais determinem sua distribuição (Nava et al., 2010). Esta espécie de carrapato já foi registrada

albergando *R. bellii*, de patogenicidade desconhecida, e também riquetsias do grupo da febre maculosa (Labruna et al., 2004; Matias et al., 2015). Autores sugerem que exista uma co-evolução simbiótica de *R. bellii* com carrapatos do gênero *Amblyomma*, devido à elevada ocorrência deste agente riquetsial nas espécies deste gênero (Labruna et al., 2004)

De seis amostras de *A. dubitatum* analisadas, cada uma pertencente a um animal da espécie *Cerdocyon thous*, três foram positivas para riquetsia. Esta ocorrência pode ter sido ao acaso, mas outros estudos são necessários para confirmar a alta prevalência de infecção nesta espécie de carrapato, uma vez que há possibilidade de espécies antropofílicas serem infectadas via co-alimentação no mesmo hospedeiro (Randolph et al., 2011). Esta espécie de carrapato está estritamente relacionada com a capivara, hospedeiro amplificador da bactéria *R. rickettsii* na natureza (Souza et al., 2009) e pode, eventualmente, picar seres humanos (Labruna et al., 2007).

Amostras de carrapatos com DNA de riquetsias foram encontradas apenas em cachorros-do-mato. Tal fato pode ter ocorrido pela análise de maior número de amostras nesta espécie (n=32) embora maior número de amostras tenha sido analisado em cães domésticos (n=55). *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) é o canídeo neotropical mais amplamente distribuído e habita principalmente ambientes florestados. Possui hábitos alimentares generalistas, que podem influenciar positivamente sua capacidade de sobrevivência em ambientes alterados pelo homem (Rocha et al., 2008). Ainda que de forma especulativa pode-se supor que o hábito generalista deve expor esses animais a uma gama grande de ambientes e carrapatos aumentando a chance de infestação por carrapatos infectados, pelo menos perante os cães domésticos.

Canídeos selvagens têm sido acometidos por doenças emergentes e reemergentes transmitidas por vetores e associadas a impactos antrópicos (Aguirre 2009). A identificação de agentes transmitidos por vetores infectando animais selvagens pode ajudar a estabelecer

áreas de risco de doença para humanos e animais. Em nenhuma das das amostras de cães domésticos foram detectadas riquetsias. Porém considerando a simpatria nestas áreas, entre animais selvagens e domésticos e, sabendo-se que o cão adentra ambientes silvestres, de onde pode trazer patógenos causadores de doenças para o ser humano (Queirogas et al., 2010; Rozental et al., 2014), seria precoce considerar a ausência de patógenos no contexto estudado. Trabalhos adicionais envolvendo um número maior de amostras e espécies deverão ser realizados para uma avaliação mais fidedigna de interações entre riquetsias e carrapatos de canídeos domésticos e selvagens no Cerrado.

CONCLUSÕES

Amostras de carrapatos das espécies *A. ovale* e *A. dubitatum* coletadas de *Cerdocyon thous*, amplificaram gene presente no grupo da febre maculosa e simultaneamente, gene presente em *R. bellii*, demonstrando a possibilidade de co-infecção por riquetsias de dois grupos distintos em um mesmo carrapato.

Nas amostras coletadas em cães não foi detectado DNA de riquetsias, porém, a possibilidade de infecção por estes patógenos não deve ser desconsiderada, para tal, mais espécimes serão analisados.

REFERÊNCIAS

- Aguirre, A.A., 2009. Wild canids as sentinels of ecological health: a conservation medicine perspective. *Parasites & Vectors*, 2 (Suppl 1): S7. [online]. URL: <http://www.parasitesandvectors.com/content/2/S1/S7>
- Almeida, R.F.C., Garcia, M.V., Cunha, R.C., Matias, J., Labruna, M.B., Andreotti, R., 2013a. The first report of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma nodosum* in the state of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 156–159.
- Almeida, R.F., Garcia, M.V., Cunha, R.C., Matias, J., Silva, E.A., Matos, M.F.C., Andreotti, R., 2013b. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: first report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 60, 63–72.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Bastos, T.S.A., Madrid, D.M.C., Faria, A.M., Freitas, T.M.S., Linhares, G.F.C., 2016. Carrapatos em animais silvestres do bioma cerrado triados pelo CETAS, IBAMA GOIÁS. *Cienc. anim. bras.*, Goiânia, v.17, n.2, p. 296-302.
- Beati, L., Nava, S., Burkman, E.J., Barros-Battesti D., Labruna, M.B., Guglielmone, A.A., et al., 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol.* 13:267.
- Campos-Pereira, M., Szabó, M.P.J., Bechara, G.H. et al. 2000. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 37(6): 979-983.
- Cançado, P.H.D., 2008. Carrapatos de animais silvestres e domésticos no Pantanal Sul mato-grossense (Sub-região da Nhecolândia): espécies, hospedeiros e infestações em áreas com diferentes manejos. Tese de doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 65p.
- Cunningham, A.A., Daszak, P., Rodriguez, J.P., 2003. Pathogen pollution: defining a parasitological threat to biodiversity conservation. *J Parasitol* 89:878–883
- Curi, N.H.A., Araújo, A.S., Campos, F.S. et al., 2010. Wild canids, domestic dogs and their pathogens in Southeast Brazil: disease threats for canid conservation. *Biodiversity and Conservation*, 19(12): 3513-3524.
- Dantas-Torres F, Ferreira DR, de Melo LM, Lima PA et al. 2010. Ticks on captive and free-living wild animals in northeastern Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 50:181-189.
- Garcia, M.V., Silva, D. C., Almeida, R.F.C., Cunha, R. C., Matias, J., Barros, J. C., Andreotti, R., Szabó, M.P.J., 2013. Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v. 22, n. 1, p. 124-128.
- Guglielmone, A.A.; Szabó, M.P.J.; Martins, J.R.S.; Estrada-Peña, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. Em: Barros-Battesti, D, M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. (Eds.). *Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies*. Capítulo 7. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, p. 115-138, 2006.

- Jácomo ATA, Silveira L, Diniz-Filho JAF. 2004. Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in central Brazil. *Journal of Zoology*, 262(1): 99-106.
- Otranto, D., Dantas-Torres, F., Breitschwerdt, E.B., 2009b. Managing canine vector-borne diseases of zoonotic concern: part one. *Trends Parasitol.* 25 (4), 157–163.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Bouyer, D.H. et al., 2004b. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol*; 41:1073-1081.
- Labruna, M.B., Jorge, R.S.P., Sana, D.A., Jácomo, A.T.A., Kashivakura, C.K., Furtado, M.M., et al., 2005. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. *Exp.Appl. Acarol.* 36, 149–163.
- Labruna, M.B., Pacheco, R.C., Ataliba, A.C., and Szabó, M.P.J., 2007. Human parasitismo by the capybara tick, *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Entomol. News* 118, 77–80.
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. In: *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*, 1166, 2009, New York. *Annals New York Academy of Sciences*. p.156–166.
- Lemos, F.G., Azevedo, F.C., Costa, H.C.M, May Jr, J.A., 2011. Human threats to hoary and crab-eating foxes in Central Brazil. *Canid News* 14.2 [online]. URL: http://www.canids.org/canidnews/13/Hoary_and_crabeating_foxes_in_Brazil.pdf.
- Lopes, M.G., May Junior, J., Foster, R.J., Harmsen, B.J., Sanchez, E., Martins, T.F., Quigley, H., Marcili, A., Labruna, M.B., 2016. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. *Parasit. Vectors* 9, 62.
- Machado RB, Ramos-Neto M B, Pereira PGP et al. 2004. *Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro*. Conservation International do Brasil, Brasília.
- Mangold, A.J., Bargues M.D., Mas-Coma S., 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 84: 478-484.
- Matias, J., Garcia, M.V., Cunha, R. C., Aguirre, A.A.R., Barros, J.C., Csordas, B.G., Andreotti, R., 2015. Spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 6, 107–110.
- Martins, T.F., Peres, M.G., Costa, F.B., Bacchiega, T.S., Appolinario, C.M., Antunes, J.M.A.P., Allendorf, S.D., Vicente, A.F., Megid, J., Labruna, M.B., 2015. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild small rodents (Rodentia: Cricetidae) in three areas of the state of São Paulo, Brazil. *Ciênc. Rural* (in press).
- Merhej, V., Raoult, D., 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 86:379 –405.
- Nava, S., Venzal, J.M., Labruna, M.B., Mastropaolo, M., Gonzáles, E.M., Mangold, A.J., et al., 2010. Hosts, distribution and genetic divergence (16SrDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl.Acarol.* 51, 335–351.

- Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* sp., *Amblyomma interandinum* sp. and *Amblyomma patinoi* sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 252–76.
- Ogrzewalska, M., Martins, T., Capek, M., Literak, I., Labruna, M.B., 2013. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks and Tick Borne Diseases*, v.4, p.145–147.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovski, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 657–702.
- Queirogas VLD, Oliveira LMD, Marques RL et al. 2010. Carrapatos (Acari: Ixodidae) em cães domésticos no Parque Estadual Serra de Caldas Novas, Goiás: considerações epidemiológicas. *Biota Neotrópica*, Campinas, 10 (1): 347-349.
- Queirogas VL, Del Claro K, Nascimento ART, Szabó MPJ. 2012. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. *Experimental and Applied Acarology*, 57(1): 75-82.
- Ramos, V.N., Piovezan, U., Franco, A.H.A., Rodrigues, V.S., Nava, S., Szabó, M.P.J., 2016. Nellore cattle (*Bos indicus*) and ticks within the Brazilian Pantanal: ecological relationships. *Exp Appl Acarol*, 68:227–240.
- Randolph S. E., 2011. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2, 179–182.
- Regnery, R. L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.173, p.1576-1589.
- Rocha, V.J., Aguiar, L.M., Silva-Pereira, J.E., et al., 2008. Feeding habits of the crab-eating fox, *Cerdocyon thous* (Carnivora: Canidae), in a mosaic area with native and exotic vegetation in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 25(4), 594-600.
- Rozental, T., Ferreira, M.S., Gomes, R., Costa, C.M., Barbosa, P.R.A., Bezerra, I.O., et al., 2015. A cluster of *Rickettsia rickettsii* infection at an animal shelter in an urban area of Brazil. *Epid infect*, 143(11):2446–50.
- Roux, V. & Raoult, D., 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1449-1455.
- Sabatini, G.S., Pinter, A., Nieri-Bastos, F., Marcili, A., Labruna, M. B., 2010. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their *Rickettsia* in an Atlantic rainforest reserve in the State of São Paulo, Brazil. *J. Med. Entomol.* 47, 913–916.
- Sano SM, Almeida SD. 1998 *Cerrado: environment and flora*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados.
- Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A.M., Schumaker, T.T.S., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M.B., 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. *Emerg Infect Dis* 11: 265-270.

- Scinachi, C.A., Takeda, G.A.C.G., Mucci, L.F., Pinter, A., 2017. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. *Acta Tropica*, 166: 225-233.
- Silva, N., Ereemeeva, M.E., Rozental, T., Ribeiro, G.S., Paddock, C.D., Ramos, E.A.G., et al., 2011. Eschar-associated spotted fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 275–278.
- Souza, C.E., Moraes-Filho, J., Ogrzewalska, M., Uchoa, F.A., Horta, M.C., Souza, S.S.L., et al., 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochaeris hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet. Parasitol.* 161, 116–121.
- Spolidorio, M.G.; Labruna, M.B.; Mantovani, E.; Brandão, P.; Richtzenhain, L.J., Yoshinari, N.H., 2010. Novel spotted fever group rickettsioses, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3): 521-523.
- Szabó MPJ, Cunha TM, Pinter A et al. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 25 (10-11): 909-916.
- Szabó MPJ, Olegário, MMM Santos ALQ 2007. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Experimental and Applied Acarology*, 43, 73-84.
- Szabó, M. P., Nieri-Bastos, F.A., Spolidorio, M.G., Martins, T.F., Barbieri, A.M., Labruna, M. B., 2013. 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*, London v.140, p.719–728.
- Szabó, M.P.J.; Pinter, A.; and Labruna, M.B., 2013a. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:27.
- Veronez, V.A., Freitas, B.Z., Olegário, M.M.M. et al., 2010. Ticks (Acari: Ixodidae) within various phytophysiognomies of a Cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 50 (2): 169-179.

Capítulo 3

Carrapatos e Riquétsia do Grupo da Febre Maculosa em Tamanduás (*Myrmecophagidae*) no Cerrado e Pantanal

RESUMO

Este estudo, fornece o maior volume de dados sobre carrapatos em tamanduás no Brasil, referente a um período de 18 anos. Também foi avaliada a infecção riquetsial de carrapatos de tamanduás por reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como alvo uma sequência parcial do gene que codifica a enzima citrato sintase (*gltA*), um fragmento da proteína de membrana externa de 190- kDa do gene *ompA*, além de um fragmento do gene *ompB*, que codifica outra proteína da membrana externa de rickettsia de 135-kDa. Protocolo adicional foi utilizado para detecção de *Rickettsia bellii*. Carrapatos foram analisados por PCR a partir de 33 tamanduás (*Myrmecophaga tridactyla* e *Tamandua tetradactyla*), pertenciam a oito espécies: *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma nodosum*, *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma parvum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma calcaratum* e *Amblyomma auricularium*. Oito amostras de *A. nodosum* e três amostras de *A. sculptum* detectaram genes de riquetsias do grupo da febre maculosa (GFM) através da PCR. As sequências de *ompA* analisadas exibiram identidade de 100% com quatro sequências de carrapato *A. nodosum*. Os resultados indicam que *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa (GFM) em *A. nodosum* e possivelmente em *A. sculptum* estava circulando em Minas Gerais e estado de São Paulo.

PALAVRAS-CHAVE: Tamanduá, Cerrado, Pantanal, carrapato, riquetsia

INTRODUÇÃO

Informações sobre a ocorrência e diversidade de carrapatos em animais silvestres no Brasil são ainda restritas. No entanto, esses parasitos atuam como reservatórios e/ou vetores de diversos agentes infecciosos, transmitindo uma variedade maior de microrganismos patogênicos do que qualquer outro grupo de vetores (Jongejan; Uilenberg, 2004; Sonenshine et al., 2002). Mesmo em zonas urbanas, particularmente na periferia, há a possibilidade de contato do homem com carrapatos de áreas naturais. De fato, animais selvagens e seus parasitos são comuns nestas áreas, como indicado pela alta frequência de animais mortos por atropelamento como capivaras, canídeos selvagens e tamanduás nas rodovias próximas de centros urbanos (Garcia et al., 2013).

Dentre os diversos microrganismos em carrapatos que parasitam animais selvagens, diferentes espécies de riquetsias são particularmente patogênicas para seres humanos (Labruna, 2009). As riquetsioses constituem um grupo de doenças causadas por bactérias intracelulares obrigatórias e pertencentes à família Rickettsiaceae e ao gênero *Rickettsia*, doenças estas que afetam o homem e outros hospedeiros vertebrados (Parola et al., 2005). A bactéria *Rickettsia rickettsii* é globalmente a mais letal para os seres humanos e com ampla distribuição no Brasil, particularmente na região sudeste (Lemos et al., 1997; Oliveira et al., 2016).

Os tamanduás são espécies selvagens com ampla distribuição geográfica no Brasil (Reis, 2006) e que albergam várias espécies de carrapatos, inclusive um dos vetores da bactéria *R. rickettsii*, *Amblyomma sculptum* (complexo *Amblyomma cajennense*) (Arzua et al., 2005; Bechara et al., 2001; Campos Pereira et al., 2000; Martins et al., 2004; Martins et al., 2012). Os mesmos autores relatam uma diversidade de espécies de carrapatos sobre os

tamanduás que incluem *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma pseudoconcolor*.

Importante notar que algumas dessas espécies de carrapatos possuem ciclo de vida complexo. Por exemplo, *A. nodosum* e *A. calcaratum* incluem as aves como hospedeiras habituais para as formas imaturas (Labruna et al., 2007; Pascoal et al., 2013; Tolesano-Pascoli et al., 2010) enquanto *A. sculptum* parasita os mais diversos hospedeiros, domésticos ou selvagens, tanto na forma adulta como nas formas imaturas (Campos Pereira et al., 2000; Ramos et al., 2014; Szabó et al., 2001). Estas observações indicam que carrapatos de origens diversas convergem para os tamanduás, eventualmente albergando microrganismos patogênicos. Por outro lado, pouco se sabe sobre os agentes patogênicos em carrapatos de tamanduás. Diante dos expostos o objetivo deste trabalho foi registrar as espécies de carrapatos encontradas em tamanduás (Família Myrmecophagidae) e possíveis riquetsias albergadas por eles em regiões do Cerrado e Pantanal brasileiro.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisados carrapatos coletados de tamanduás-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) do acervo do Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia, no município de Uberlândia, Minas Gerais. Foram considerados apenas os dados de animais de origem geográfica, ao menos em nível de município, e data de coleta (mês e ano) conhecidos. Os carrapatos desse acervo vieram em sua maioria de animais atropelados e mortos em rodovias e em menor número daqueles encaminhados para hospitais veterinários pela polícia ambiental, entre os anos de 1999 e 2016.

As coletas de carrapatos dos animais foram realizadas com auxílio de pinças, e estes, armazenados em frascos individuais por animal. Quando possível foram mantidos vivos, entretanto a maioria morreu, quando então foram armazenados em álcool 70^o GL. Todos os espécimes foram identificados sob lupa estereoscópica, seguindo-se as chaves dicotômicas propostas por Barros-Battesti et al. (2006) e Martins et al. (2010).

Além da identificação das espécies, os parâmetros utilizados para descrição da infestação por carrapatos para cada espécie de hospedeiros foram a intensidade média de infestação (número total de carrapatos encontrados/número de hospedeiros infestados) e prevalência de infestação (número de hospedeiros infestados/número de hospedeiros vistoriados) de acordo com Bush et al. (1997). Foi ainda determinada a amplitude da infestação para cada espécie (número maior e menor de carrapatos encontrados em um animal).

Pesquisa de riquetsias

Quando foi possível manter os carrapatos vivos, estes foram submetidos ao teste de hemolinfa e coloração de Gimenez para rastreamento de agentes com morfologia similar à de riquetsias conforme previamente descrito (Burgdorfer, 1970; Gimenez, 1964). A extração de DNA foi realizada através de maceração, pelo método de tiocianato de guanidina (Sangioni et al. 2005). Para confirmar presença de riquetsias, a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi realizada com os primers CS78 e CS323, que amplificam um fragmento de 401 pares de bases (pb) do gene *gltA* de todas as espécies de riquetsia (Labruna et al., 2004a). Quando o produto esperado foi observado no gel de eletroforese, as amostras foram testadas para dois outros protocolos de PCR; um amplifica um fragmento de 532 pb do gene *ompA*, que codifica a proteína de membrana externa de 190-kDa, encontrada somente em espécies de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM), utilizando-se os primers Rr190.70p e Rr190.602n, de

acordo com Regnery et al. (1991). A outra PCR amplifica um fragmento de 862pb do gene *ompB*, que codifica uma proteína da membrana externa de riquetsia de 135-kDa, utilizando-se os primers 120-M59 e 120-807 (Roux & Raoult, 2000).

Algumas amostras, nas quais houve amplificação para o gene *gltA* (CS), mas não amplificaram fragmentos dos genes *ompA* e *ompB*, foram ainda testadas por novo protocolo de PCR, visando à amplificação de outro fragmento do gene *gltA*, com 338 pares de bases, presente somente em *Rickettsia bellii* (Szabó et al., 2013). Em cada PCR foram incluídos um controle negativo e um positivo, e o produto amplificado foi purificado utilizando-se o Kit para purificação de produto de PCR GeneJET (Thermo Scientific). O sequenciamento foi realizado em laboratório credenciado, sendo posteriormente a sequência de nucleotídeos editada usando-se o programa LASERGENE (DNASTar) e comparada com aquelas disponíveis no banco de dados GenBank, utilizando-se o algoritmo BLAST (Altschul et al., 1990), para confirmar similaridade genética com espécies de riquetsias.

RESULTADOS

No período de 18 anos foram obtidos dados de 72 tamanduás-bandeira e 29 tamanduás-mirim. Os animais eram provenientes do sudeste e centro-oeste brasileiros, de quatro estados (Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Mato Grosso do Sul) e o Distrito Federal, sendo 33 municípios com presença de tamanduá-bandeira e 19 com tamanduá-mirim (Anexo 1). Em tamanduás-bandeira foram coletados no total 1491 carrapatos de sete espécies diferentes e em tamanduás-mirim, 380 carrapatos de três espécies. As espécies e números de carrapatos estão detalhados no anexo 1 (T. bandeira) e anexo 2 (T. mirim). Os parâmetros das infestações estão apresentados nas tabelas 1 (T. bandeira) e 2 (T. mirim) abaixo.

Tabela 1. Parâmetros das infestações de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) no sudeste e centro-oeste brasileiros de 2002 a 2016.

Espécies de Carrapato	Número de hospedeiros Infestados	Frequência infestação (%)	Intensidade média de infestação (N)	Amplitude de Infestação	Nº de Municípios
<i>A.ovale</i>	1	1,4	1	1	1
<i>A.sculptum</i>	51	70,8	16,8	1-168	28
<i>A.parvum</i>	1	1,4	1	1	1
<i>A.nodosum</i>	49	68,1	6,7	1-39	27
<i>A.calcaratum</i>	7	10,1	6,9	1-20	6
<i>A.auricularium</i>	1	1,4	1	1	1
<i>R.microplus</i>	3	4,3	44,3	1-122	3
Total	65	90,3	22	1-175	33

Tabela 2. Parâmetros das infestações de carrapatos em tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) no sudeste e centro-oeste brasileiros de 1999 a 2014.

Espécies de Carrapato	Número de hospedeiros infestados	Frequência infestação (%)	Intensidade média de infestação (N)	Amplitude de infestação	Nº de Municípios
<i>A.nodosum</i>	28	96,6	13,2	1-52	18
<i>A.sculptum</i>	2	6,9	2,5	2-3	2
<i>R.sanguineus</i>	1	3,4	2	-	1
Total	29	100	13,1	1-52	19

Nota-se que em tamanduá-bandeira a espécie de carrapato mais prevalente e com elevadas intensidades de infestação foi *A. sculptum* seguido de perto por *A. nodosum*. Estas duas espécies de carrapatos estiveram presentes na maioria dos 33 municípios em que se coletou amostras. A terceira espécie de carrapato mais prevalente, *A. calcaratum*, esteve presente em apenas seis municípios e em uma aparente distribuição focal na região de Araxá-MG (incluindo Cristais Paulista-SP) além de duas localidades mais isoladas (Britânia-GO e Piratininga-SP). Das quatro espécies restantes, três foram representadas por apenas um

indivíduo em uma localidade (*A. auricularium*, *A. ovale* e *A. parvum*). *Rhipicephalus microplus* foi encontrado em três tamanduás-bandeira e constatou-se naquele de Patrocínio-MG, uma infestação intensa representada pelos três estágios do carrapato. As Figuras 1 e 2 ilustram a distribuição geográfica das três espécies de carrapatos mais prevalentes em tamanduá-bandeira e tamanduá-mirim, respectivamente.

As infestações do tamanduá-mirim foram quase que exclusivamente por *A. nodosum*, não sendo observados nestes nenhum *A. calcaratum*, enquanto *A. sculptum* foi encontrado em apenas três animais em baixas infestações (dois animais com um e um animal com dois carrapatos) e apenas no estágio de ninfa. *Rhipicephalus sanguineus* (um macho e uma fêmea) foi encontrado em apenas um animal. Esse animal estava concomitantemente infestado por quatro machos e duas fêmeas de *A. nodosum*. Ressalte-se, porém, que a coleta de carrapatos neste animal foi feita excepcionalmente dias depois de sua internação no Hospital Veterinário da Universidade Federal de Uberlândia.

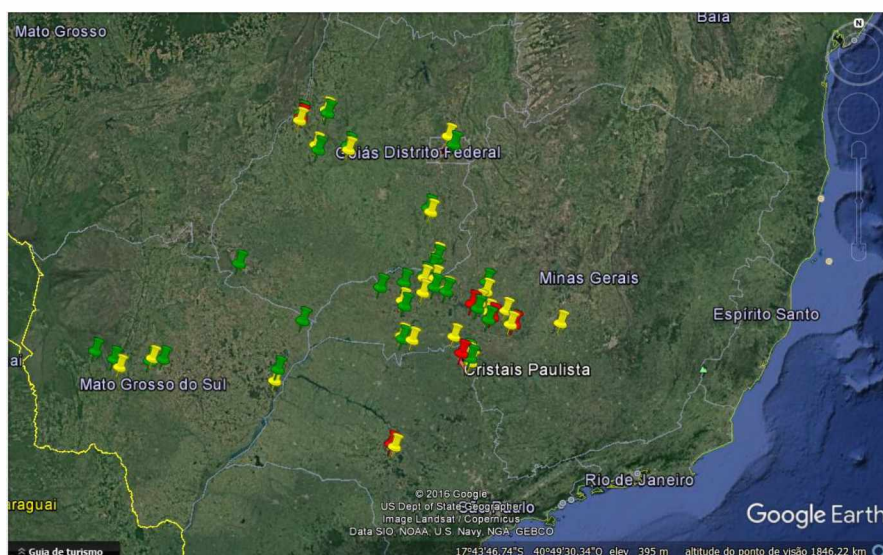


Figura 1. Localização geográfica das espécies de carrapato *Amblyomma sculptum* (marcador verde), *Amblyomma nodosum* (marcador amarelo) e *Amblyomma calcaratum* (marcador vermelho) coletados de tamanduás-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) de 2002 a 2016, Brasil. Cada marcador corresponde a um município que tenha tido pelo menos um hospedeiro com a espécie de carrapato correspondente à cor.

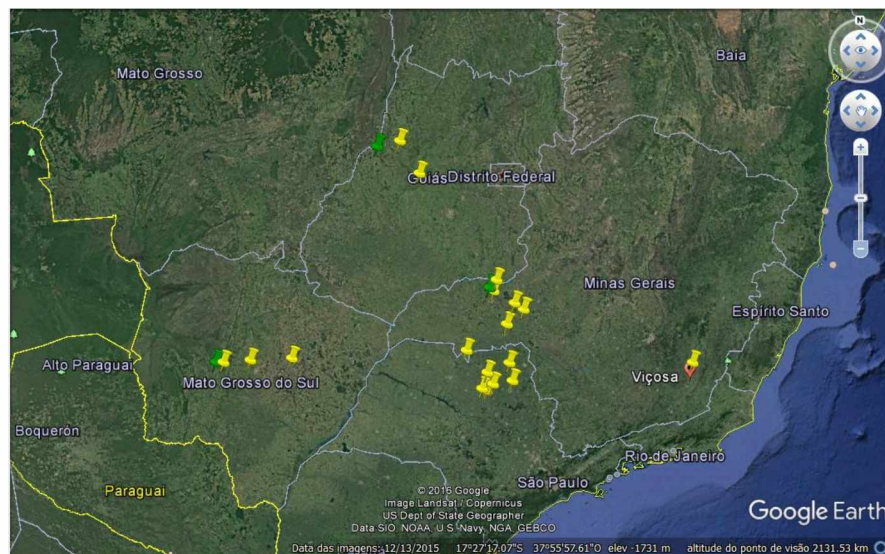


Figura 2. Localização geográfica das espécies de carrapato *Amblyomma sculptum* (marcador verde) e *Amblyomma nodosum* (marcador amarelo) e coletados de tamanduás-mirim (*Tamandua tetradactyla*) de 1999 a 2014, Brasil. Cada marcador corresponde a um município que tenha tido pelo menos um hospedeiro com a espécie de carrapato correspondente à cor.

Devido à dificuldade em se manter os carrapatos vivos, o teste de hemolinfa foi realizado somente em sete carrapatos adultos (4 *A. sculptum* e 3 *A. nodosum*). Dos quais, apenas um *A. nodosum* apresentou estruturas semelhantes a riquetsias. DNA de riquetsias foi pesquisado em 169 carrapatos de 33 animais e destes, treze *A. nodosum* (11 machos e 2 fêmeas) e três *A. sculptum* (2 fêmeas e uma ninfa ingurgitada) de nove animais exibiram bandas na PCR para o gene *gltA*. Dentre estas, onze apresentaram bandas para o gene *ompA* e três simultaneamente para o gene *ompB*. Uma amostra apresentou banda apenas para o gene *ompB*. Amostras referentes a três hospedeiros amplificaram primers específicos para *Rickettsia bellii*. A discriminação por amostra analisada é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3. Carrapatos com amplificação do DNA de riquetsias de carrapato de tamanduás de acordo com a espécie e origem geográfica dos hospedeiros discriminadas por número de amostras.

Hosp.	Data	CS2 (<i>gltA</i>)	<i>R. bellii</i>	<i>ompA</i>	<i>ompB</i>	Sequenciamento	Local (GFM)
TM 1	31/07/09	1M(<i>A.nodosum</i>)	-	+	+	SB	Pantanal (MS)
TB2	31/07/09	F(<i>A.sculptum</i>) 1M(<i>A.nodosum</i>)	-	+	+	NS	Pantanal (MS)
TB 3	04/10/09	1M(<i>A.nodosum</i>)	-	+	-	Rickettsia sp.NOD	Bebedouro-SP
TB 4	21/12/09	1F(<i>A.nodosum</i>)	-	+	-	Rickettsia sp.NOD	Perdizes-MG
TB 5	22/03/10	1M(<i>A.nodosum</i>)	+	-	-	NS	Uberlândia-MG
TB 6	26/04/10	1F(<i>A.nodosum</i>) 1F(<i>A.nodosum</i>) 1M(<i>A.nodosum</i>)	+	-	-	NS NS NS	Uberlândia-MG
TB 7	28/05/10	1M(<i>A.nodosum</i>) 1M(<i>A.nodosum</i>) 1M(<i>A.nodosum</i>)	-	+	-	NS Rickettsia sp.NOD Rickettsia sp.NOD	Uberlândia (Represa)
TB 8	23/02/11	1 F(<i>A.sculptum</i>) 2M(<i>A.nodosum</i>) 2M(<i>A.nodosum</i>)	-	+	-	NS NS NS	Patrocínio
TB 9	01/07/16	1N(<i>A.sculptum</i>)	-	+	-	SB	Patrocínio (MG)

* TM: tamanduá-mirim; TB: tamanduá-bandeira/ Em negrito hospedeiros com resultado confirmado.

* M: macho; F: fêmea; N: ninfa

As amostras amplificadas de cada gene estão sinalizados por +; as não amplificadas por -; NS: não submetidas ao PCR; SB: sequências de baixa qualidade.

Quatro amostras de *A. nodosum* de tamanduá-bandeira, pertencentes a três animais, obtiveram produto satisfatório para sequenciamento do gene *ompA*. Outras duas enviadas para sequenciamento do mesmo gene não puderam ser analisadas, devido à baixa qualidade das sequências. Três amostras pertencentes a outros três animais amplificaram gene específico para *R. bellii*. As demais amostras, referentes a outros três animais, não apresentaram produto satisfatório para sequenciamento. Todas as amostras sequenciadas (4) com êxito apresentaram 100% de identidade entre si. A análise pelo BLAST revelou que as sequências parciais amplificadas para o gene *ompA* de *A. nodosum* foram 100% idênticas à outras quatro sequências correspondentes do gene de *Amblyomma nodosum* cadastradas no GenBank:

Rickettsia sp. NOD (Ogrzewalska et al., 2009), *Rickettsia* sp. não cultivada (Almeida et al., 2013), *Rickettsia* sp. não cultivada clone 33 (Torga et al., 2015, não publicado), e *Rickettsia* endossimbionte of *A. nodosum* (Lugarini et al., 2015). A Tabela 4 apresenta a comparação de uma das sequências, uma vez que é 100% idêntica às outras três, com outras riquetsias encontradas no Brasil e Argentina.

Tabela 4. Identidade da sequência de nucleotídeos de fragmento amplificado do gene *ompA* de *Rickettsia* sp em *Amblyomma nodosum* encontrado em Tamanduá-bandeira no município de Uberlândia em 2010.

Identidade nucleotídeos	aminoácidos	Isolados	Local	Origem	Carrapato
100%	100%	<i>Rickettsia</i> sp. não cultivada (JX421686)	Brasil (MS)	Tamanduá	<i>A. nodosum</i>
(446/446)		<i>Rickettsia</i> sp. NOD (EU567180)	Brasil (M. Atlântica)	Ave	<i>A. nodosum</i>
		<i>Rickettsia</i> sp. clone 33 não cultivada (KP686060)	Brasil (Cerrado)	Ave	<i>A. nodosum</i>
		<i>Rickettsia</i> endossimbionte <i>A. nodosum</i> (KM262193)	Brasil (Nordeste)	Ave	<i>A. nodosum</i>
98,7%	96,6%	<i>R. cooperi</i> * AR (KM116017)	Argentina	Capivara	<i>A. dubitatum</i>
		<i>R. cooperi</i> BR (AY362706)	Brasil	Ambiente	<i>A. cooperi</i> *
98,4%	95,9%	<i>R. parkeri</i> BR (JN126321)	Brasil	Ave	<i>A. parkeri</i>

**Amblyomma cooperi* = *Amblyomma dubitatum*

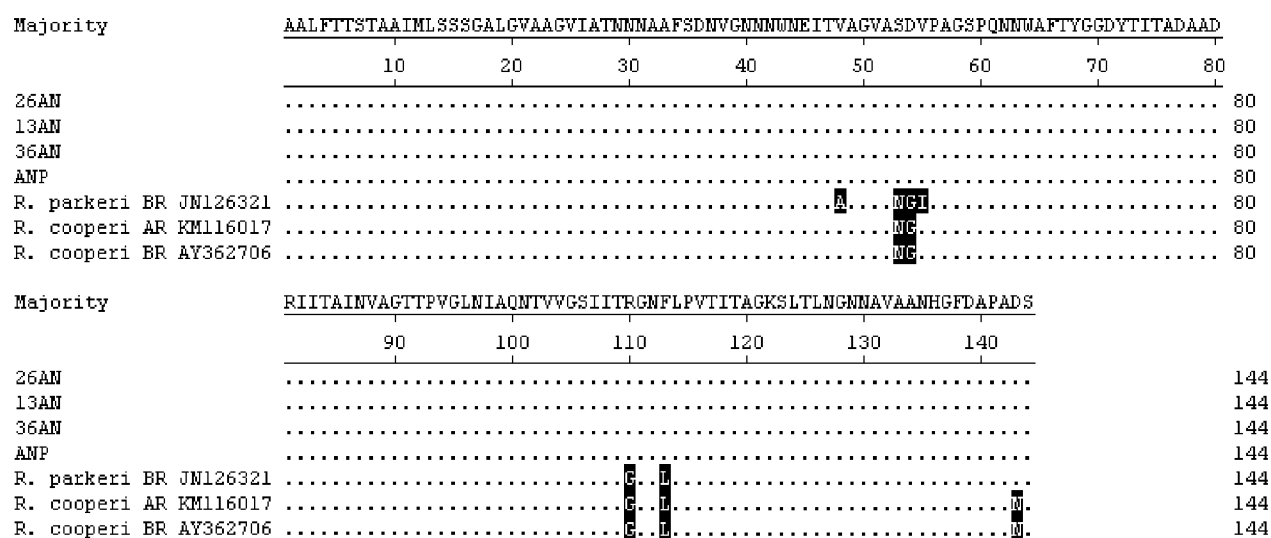


Figura 3. Comparação das sequências deduzidas de aminoácidos das amostras de Tamanduás-bandeira com outros isolados disponíveis no GenBank.

DISCUSSÃO

As infestações dos tamanduás por carrapatos estão necessariamente subestimadas. A maioria destes dados provém de animais atropelados e nestes, muitos carrapatos se perderam com o tempo incerto de permanência na rodovia após o acidente. Neste período foram expostos, entre outros, às intempéries do clima e animais necrófagos que deverão ter reduzido o número dos ectoparasitos. Além disso, as coletas foram prejudicadas pelas condições frequentemente perigosas e desconfortáveis em rodovias estreitas e, em muitos casos, o avançado estado das alterações cadavéricas. Nessas condições, foi dificultada a localização de ninfas e principalmente larvas dos carrapatos sobre o corpo dos animais. Outro viés dos dados se refere à distribuição geográfica, determinada majoritariamente pelo deslocamento dos pesquisadores em determinadas rodovias. Entretanto, apesar dos expostos, as observações fornecem o maior volume de dados sobre carrapatos em tamanduás no Brasil, considerando número de animais e amplitude geográfica.

Observou-se uma diferença muito grande entre as infestações de tamanduá-bandeira e tamanduá-mirim. Enquanto no primeiro predominaram as infestações por *A. nodosum* e *A. sculptum* e de *A. calcaratum* em menor número, em tamanduá-mirim as infestações foram quase que exclusivamente por *A. nodosum*. A razão para essa diferença nas espécies de carrapatos nos dois tamanduás é incerta mas pode ser atribuída em parte aos hábitos e características corpóreas dos dois animais conforme revisto por Medri e colaboradores (2006).

Segundo esses autores, o tamanduá-bandeira é essencialmente terrestre e percorre extensas áreas diariamente para visitar diversas colônias de formigas/cupins. Ademais possui um corpo maior e uma cauda comprida com pelos grossos e longos. Essas características devem facilitar o contato com o carrapato *A. sculptum*, espécie amplamente disseminada e

prevalente no Cerrado (Szabó et al., 2007; Veronez et al., 2010). O registro da área de vida de tamanduá-bandeira é de até 1900 ha no Pantanal, por outro lado, são animais solitários e a densidade destes é baixa (Medri et al., 2006). É também digno de nota nos resultados aqui relatados, a observação repetida de fêmeas de *A. sculptum* ingurgitando. Este conjunto de fatores sugere que tamanduás possam ser investigados como hospedeiros primários desta espécie de carrapato. Evidentemente a densidade menor deste hospedeiro na ampla área de vida pode ter um efeito restritivo para a manutenção de populações muito grandes de carrapato, mas poderá ter efeito potencializador dos níveis de infestação do ambiente.

O tamanduá-mirim por sua vez, possui hábito escansorial, área de vida muito menor, um corpo menor e a cauda preênsil sem os pelos longos característicos do tamanduá-bandeira. Esse conjunto de características deve de forma oposta dificultar o contato com *A. sculptum*.

A infestação por adultos de *A. nodosum* e também por *A. calcaratum* no caso tamanduá-bandeira já foi relatada na literatura (Campos Pereira et al., 2000; Cutolo et al., 2000; Martins et al., 2004). Porém o local em que ocorre a infestação desses animais é uma incógnita. As formas imaturas desses carrapatos se alimentam em aves passeriformes (Martins et al., 2014; Ogrzewalska et al., 2009; Pascoal et al., 2013; Tolesano-Pascoli et al., 2010) que deverão deixar as ninfas ingurgitadas (que sofrerão a ecdise para adultos) em locais visitados pelos tamanduás.

É importante observar a distribuição mais focal de *A. calcaratum* na região de Araxá, em Britânia-GO e Piratininga-SP. A razão para essa distribuição geográfica é desconhecida e dados adicionais de carrapatos em aves e de tamanduás deverão ser compilados para se visualizar uma distribuição mais fidedigna e que permita correlações ecológicas, uma vez que aves são hospedeiras dos estágios imaturos deste carrapato (Ogrzewalska et al, 2013).

As outras espécies de carrapatos foram encontradas em números reduzidos e baixa prevalência. Estas infestações devem ser consideradas ocasionais ou acidentais, em especial a infestação por *R. microplus*, o carrapato do boi, em tamanduás-bandeira e de *R. sanguineus*, carrapato do cão, em tamanduá-mirim. As duas espécies de carrapatos não são neotropicais e foram introduzidas com a colonização das Américas (Guglielmone et al., 2006). No primeiro caso a infestação deve ter ocorrido quando o tamanduá se deslocou por pasto de bovinos e no segundo caso em um hospital veterinário durante o internamento do animal.

Fica também evidente que este animal selvagem, mesmo que em números reduzidos, poderá carrear *R. microplus* entre pastos e deve ser considerado em eventuais tentativas de controle total deste ectoparasito. Esta espécie de carrapato inclusive, foi encontrada em um hospedeiro que também albergava *A. nodosum* com resultado positivo para *Rickettsia* sp. do Grupo da Febre Maculosa (tamanduá-bandeira 52, anexo 1). Assim, estes casos não devem ser negligenciados pois demonstram situações em que animais selvagens e vetores exógenos entram em contato gerando riscos de transmissão de microrganismos patogênicos por vias dantes insuspeitas.

O carrapato ixodídeo *Amblyomma sculptum* até recentemente era considerado uma única espécie conhecida como *Amblyomma cajennense*, distribuída ao sul dos Estados Unidos, México, América Central, Caribe e todos os países da América do Sul, com exceção de Chile e Uruguai, baseado em estudos morfológicos e análises moleculares, recebeu nova classificação (Beati et al., 2013; Nava et al., 2014). Ao complexo *Amblyomma cajennense* pertencem seis espécies, das quais duas estão presentes no Brasil, sendo *Amblyomma sculptum* a espécie presente na maior parte do país, inclusive nas regiões de estudo deste trabalho (Martins et al., 2016). Este carrapato é considerado o principal responsável pela transmissão da riquetsiose que no Brasil é conhecida por Febre Maculosa Brasileira (Guedes et al., 2011; Labruna, 2009). No entanto, *Rickettsia rickettsii* e outras riquetsias do grupo da

Febre Maculosa têm sido encontradas em diferentes espécies de carrapatos (Almeida et al., 2013; Ogrzewalska et al., 2012; Ogrzewalska et al., 2013; Szabó et al., 2013).

Em três amostras de *A. sculptum* (coletadas de tamanduá-bandeira) foram detectados genes de riquetsias do Grupo da Febre maculosa (GFM) através da PCR, sendo um destes hospedeiros oriundo do Pantanal, e os outros dois do município de Patrocínio, Minas Gerais, área de intensa atividade agrícola, onde o contato entre animais domésticos e selvagens se torna provável na zona rural. Uma das amostras positivas era de uma ninfa de *A. sculptum* e sabe-se que seres humanos são frequentemente picados por esta espécie de carrapato, em todos os estágios parasitários, especialmente ninfas. (Guglielmone et al., 2006a; Labruna, 2009). Duas destas amostras não apresentaram produto suficiente para serem sequenciadas, e outra, enviada para sequenciamento, apresentou picos sobrepostos indicando possível co-infecção, não sendo possível que a análise fosse concluída.

Identificou-se duas espécies de riquetsias neste trabalho, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia* cepa NOD (GFM). Os primers utilizados para detecção de *Rickettsia bellii* são específicos, razão pela qual, as amostras não foram sequenciadas. *R. bellii* representa um agente riquetsial de patogenicidade desconhecida, mas acredita-se que não seja patogênico para humanos (Labruna et al., 2009). Esse agente já foi registrado em uma ampla variedade de espécies de carrapatos no Brasil e América do Sul (Barbieri et al., 2012; Ogrzewalska et al., 2012). A elevada ocorrência de infecção de carrapatos do gênero *Amblyomma* com esta riquetsia sugere uma co-evolução simbiótica destas espécies (Labruna et al., 2004b). Carrapatos de dois hospedeiros da região de Uberlândia-MG, e de um hospedeiro de Patrocínio-MG, todos tamanduás-bandeira, possuíam genes para *Rickettsia bellii* e para o GFM simultaneamente. Acredita-se que a presença de riquetsias não-patogênicas dentro de uma população de carrapatos possa minimizar a transmissão de riquetsias patogênicas (Macaluso et al., 2002).

Em 33 hospedeiros nos quais os carrapatos foram analisados por PCR, oito animais possuíam carrapatos positivos para riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, sendo, portanto, a prevalência de infecção nos hospedeiros elevada (24%). Quatro amostras, pertencentes a três hospedeiros, dos municípios de Uberlândia-MG, Perdizes-MG e Bebedouro-SP, foram identificadas por sequenciamento do gene *ompA*. Mesmo pertencendo a diferentes localidades, as amostras apresentaram 100% de identidade entre si, e comparando-as com sequências apresentando alta identidade no GenBank, esta riquetsia já foi registrada em ampla área no Brasil.

Estes resultados sugerem que este agente pertença ao um grupo de riquetsias filogeneticamente próximas à *R. parkeri* (*Rickettsia parkeri*-like) ou sejam variantes da mesma espécie, todas do Grupo da Febre Maculosa. No país, já foram registradas quatro riquetsias que, ao que tudo indica, pertençam ao mesmo grupo. São elas: *Rickettsia* cepa NOD, *Rickettsia cooperi*, *Rickettsia* cepa Mata Atlântica e *Rickettsia parkeri*, estritamente relacionadas entre si. Duas delas são sabidamente patogênicas para humanos, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia* cepa mata Atlântica. Esta última foi registrada recentemente em caso clínico humano no estado de São Paulo, em que as análises filogenéticas indicaram cepa semelhante a *R. africae*, *R. parkeri* e *R. sibirica*. (Paddock et al., 2004; Paddock et al., 2008; Spolidorio et al., 2010).

Uma vez que tamanduás são amplamente distribuídos no Cerrado (Medri et al., 2006) é esperado que *A. nodosum* esteja presente em todo esse bioma. Picadas deste ixodídeo em seres humanos não são descritas na literatura, mas a ocorrência em cães domésticos foi registrada, o que representa um risco para o ser humano (Mazioli et al., 2012). Diversos estudos já relataram o papel das aves como hospedeiras de estágios imaturos de carrapatos (Pascoal et al., 2013; Tolesano-Pascoli et al, 2010; revisto por Ogrzewalska et al., 2016) e que estes podem abrigar microrganismos potencialmente patogênicos para os seres humanos, tais

como riquetsias (Ogrzewalska et al., 2009; 2016). Aves podem albergar e difundir carrapatos vetores de agentes infecciosos, portanto, poderiam atuar como disseminadoras, permitindo que riquetsias de *A. nodosum* alcançassem outras espécies de carrapatos, mais agressivos para os seres humanos. A presença de riquetsia em carrapatos *A. sculptum*, como foi detectado neste estudo, é motivo de preocupação, uma vez que este ectoparasita é uma espécie generalista, parasitando tanto animais domésticos quanto selvagens (Martins et al., 2004; Pereira et al, 2000).

CONCLUSÕES

Tamanduás-bandeira e mirim possuem elevada prevalência de infestação por carrapatos, mas com diferenças relevantes quanto à composição das espécies de parasitos.

Registra-se, pela primeira vez, *Rickettsia* sp., pertencente ao Grupo da Febre Maculosa (GFM), em *A. nodosum* proveniente de tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), em Minas Gerais. Esse resultado reafirma a elevada prevalência e ampla distribuição geográfica deste genótipo do GFM no Brasil.

A infestação simultânea de tamanduás com *A. nodosum* e *A. sculptum* permite o contato e difusão de riquetsias de um carrapato para o outro, situação que merece investigações adicionais por potencial importância epidemiológica.

REFERÊNCIAS

- Almeida, R.F., Garcia, M.V., Cunha, R.C., Matias, J., Labruna, M.B., Andreotti, R. 2013. The first report of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma nodosum* in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v.4, p.156-159.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- Arzua, M., Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., 2005. Catalogue of the tick collection (Acari: Ixodidae) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool* 22: 623-632.
- Barbieri, A.R.M., Romero, L., Labruna, M.B., 2012. *Rickettsia bellii* infecting *Amblyomma sabanerae* ticks in El Salvador. *Pathog Glob Heal*; 106:188-189.
- Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, H., 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo/BR: Vox/ICTTD-3/Butantan. 1 ed. cap. 1, p. 1-2.
- Beati, L., Nava, S., Burkman, E.J., Barros-Battesti D., Labruna, M.B., Guglielmone, A.A., et al., 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol.* 13:267.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Almeida-Filho, W.V., Bechara J.N., Pereira, R.J., Garcia, J.E., et al., 2001. Ticks associated with armadillo (*Euphractus sexcinctus*) and anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) of Emas National Park, state of Goiás, Brazil. *Ann N Y Acad Sci*; 969: 290-293.
- Burgdorfer, W., 1970. Hemolymph test. A technique for detection of *Rickettsiae* in ticks. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.19, n.6, p. 1010–1014.
- Bush, A., Lafferty, K.D., Lotz, J.M., Shostak, A.W., 1997. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *J. Parasitol.*, 83, 575-583.
- Campos Pereira, M., Szabó, M.P.J., Bechara, G.H., Matushima, E.R., Duarte, J.M., Rechav, Y., et al., 2000. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. *J Med Entomol*; 37(6): 979-983.
- Cutolo, A.A., Labruna, M.B., Tonin, F.B., Sartor, I.F., 2000. *Amblyomma calcaratum* parasitando tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) em São Paulo. *Arq Bras Med Vet Zootec*; 52 (2):152-3.
- Garcia, M.V., Silva, D. C., Almeida, R.F.C., Cunha, R. C., Matias, J., Barros, J. C., Andreotti, R., Szabó, M.P.J., 2013. Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal*, v. 22, n. 1, p. 124-128.

- Gimenez, D.F., 1964. Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. *Stain technology*, v.39, p.135-140.
- Guedes, E., Leite, R.C., Pacheco, R.C., Silveira, I., Labruna, M.B., 2011. Rickettsia species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.20, p.308–311.
- Jongejan, F, Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, London, v. 129, Supplement S1, p. S3-S14.
- Guglielmone, A.A.; Szabó, M.P.J.; Martins, J.R.S.; Estrada-Peña, A. Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal. Em: Barros-Battesti, D, M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. (Eds.). Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Capítulo 7. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, p. 115-138, 2006.
- Guglielmone, A.A., Beati, L., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Nava, S., Venzal, J.M., Mangold, A.J., Szabó, M.P.J., Martins, J.R., González-Acuña, D., Estrada-Peña, A., 2006a. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp. Appl. Acarol*; 40: 83–100.
- Labruna, M.B., McBride, J.W., Bouyer, D.H., Camargo, L.M., Camargo, E.P., Walker, D.H., 2004. Molecular evidence for a spotted fever group Rickettsia species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v.41, p.533-537.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Horta, M.C., Bouyer, D.H., McBride, J.W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S.M., Walker, D.H., 2004a. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42 p. 90–98.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Bouyer, D.H. et al., 2004b. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol*; 41:1073-1081.
- Labruna, M.B., Pacheco, R.C., Ataliba, A.C., Szabó, M.P.J., 2007. Human parasitism by the capybara tick, *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Entomol. News* 118, 77–80.
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. In: *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*, 1166, 2009, New York. *Annals New York Academy of Sciences*. p.156–166.
- Labruna, M.B. et al., 2009. Rocky Mountain Spotted fever in Dogs, Brazil. *Emerg Infect Dis*, v.15, n.3, p.458-460
- Labruna M.B., Soares, J.F., Martins, T.F., Soares, H.S., Cabrera, R.R., 2011. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol*.54:41–9.
- Labruna, M.B., Mattar, S., Nava, S. et al., 2011a. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal, *Rev Med Vet Zootec*. 16:2435-2457.

- Lemos, E.R.S., Machado, R.D., Ávila, Pires, F.D.A.; Machado, S.L., Costa, L.M.C., Coura, J.R., 1997. Rickettsiae-infected Ticks in an Endemic Area of Spotted Fever in the State of Minas Gerais, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 92, n.4.
- Lugarini, C., Martins, T.F., Ogrzewalska, M., Vasconcelos, N.C.T., Ellis, V.A., Oliveira, J.B., Pinter, A., Labruna, M.B., Silva, J.C.R., 2015. Rickettsial agentes in avian ixodid ticks in northeast Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. V.6 (3), 364-375.
- Macaluso, K. R., Sonenshine, D. E., Ceraul, S. M., Azad, A. F., 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second rickettsia. *J. Med. Entomol.* 39:808–813.
- Martins, J.R, Medri, I.M., Oliveira, C.M., Guglielmone, A., 2004. Occurrence of ticks on giant anteater (*Myrmecophaga tridactyla*) and collared anteater (*Tamandua tetradactyla*) in the pantanal region of Mato Grosso do Sul State, Brazil. *Ciência Rural*, Santa Maria, v 34, p 293-295.
- Martins, T. F., Onofrio, V. C., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., 2010. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks Tick-Borne Dis.*, v,1, p.75–99.
- Martins, T.F. et al., 2012. Ticks on free-living wild mammals in Emas National Park, Goiás State, central Brazil. *Systematic and Applied Acarology*, v.16, n.3, p.201-206.
- Martins, T.F; Fecchio, A.; Labruna, M.B., 2014. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) on wild birds in the Brazilian Amazon. *Systematic & Applied Acarology* 19(4): 385–392. <http://dx.doi.org/10.11158/saa.19.4.1>
- Martins, T.F., Barbieri, A.R.M., Costa, F.B., Terassini, F.A., Camargo, L.M.A., Peterka, C.L.R., Pacheco, R.C., Dias, R.A., Nunes, P.H., Marcili, A., Scofield, A., Campos, A. K., Horta, M.C.; Guilloux, A.G.A., Benatti, H.R., Ramirez, D.G., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasit Vectors*. 31(9) :186.
- Mazioli, R., Szabó, M., Mafra, C., 2012. *Amblyomma nodosum* (Acari: Ixodidae) parasitizing a domestic dog in Colatina, Espírito Santo, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal, v.21, p.428-432.
- Medri, I.M.; Mourão, G.M.; Rodrigues, F.H.G., 2006. Ordem Xenartra. Capítulo 4 pgs: 71-100. Em: *Mamíferos do Brasil*. Reis, N.R.; Peracchi, A.L.; Pedro, W.A.; Lima I.P. (eds). Londrina, Paraná, 437p.
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius,1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* sp., *Amblyomma interandinum* sp. and *Amblyomma patinoi* sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 252–76.

- Oliveira, S.V., Guimarães, J.N., Reckziegel, G.C., Neves, B.M.C., Araújo-Vilges, K.M., Fonseca, L.X., Pinna, F.V., Pereira, S.V.C., Caldas, E.P., Gazeta, G.S., Gonçalves, R.G., 2016. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. V. 22:2.
- Ogrzewalska, M., Pacheco, R.C., Uezu, A., Richtzenhain, L.J., Ferreira, F., Labruna, M.B., 2009. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v.103, p.413-425.
- Ogrzewalska, M., Pacheco, R.C., Uezu, A., Richtzenhain, L.J., Ferreira, F., Labruna, M.B., 2009a. Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting Birds in an Atlantic Rain Forest Region of Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 46, n.5, p.1225-1229.
- Ogrzewalska, M., Saraiva, D.G., Moraes-Filho, J., Martins, T.F., Costa, F.B., Pinter, A., Labruna, M.B., 2012. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology*. 139:1283–1300.
- Ogrzewalska, M., Martins, T., Capek, M., Literak, I., Labruna, M.B., 2013. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks and Tick Borne Diseases*, v.4, p.145–147.
- Ogrzewalska, M., Pinter, A., 2016. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, v. 53, n. 1, p. 1-31.
- Paddock, C.D. et al., 2004. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin Infect Dis*. V.38, p.812-813.
- Paddock, C.D., Fernández, S., Echenique, G.A., Summer, J.W., Reeves, W.K., Zaki, S.R., Remondegui, C.E., 2008. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* 78: 687-692.
- Parola P, Davoust B, Raoult D 2005. Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res* 36: 469-492.
- Pascoal, J. O., Amorim, M. P., Olegário, M. M. M., Melo, C., Silva Júnior, E. L., Ogrzewalska, M., Labruna, M. B., Szabó, M. P. J., 2013. Ticks on birds in a savanna (Cerrado) reserve on the outskirts of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Jaboticabal v. 22, n. 1, p. 46-52.
- Pereira, M. de C., Szabó, M.P.J., Bechara, G.H., Matushima, E.R., Duarte, J.M.B., Rechav, Y., Fielden, L., Keirans, J.E., 2000. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with wild animals in the Pantanal region of Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v.37, p.979-983.
- Ramos, V. N., Osava, C. F., Piovezan, U., Szabó, M.P.J., 2014. Complementary data on four methods for sampling free-living ticks in the Brazilian Pantanal. *Braz. J. Vet. Parasitol*, v. 23, n. 4, p. 516-521.
- Regnery, R. L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, Washington, v.173, p.1576-1589.

- Reis, N.R., Peracchi, A.L., Pedro, W.A., Lima, I.P., 2006. Mamíferos do Brasil. Londrina: Universidade Estadual de Londrina; 2006.
- Roux, V. & D. Raoult, 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1449-1455.
- Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A.M., Schumaker, T.T.S., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M.B., 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. Emerg Infect Dis 11: 265-270.
- Spolidorio, M.G.; Labruna, M.B.; Mantovani, E.; Brandão, P.; Richtzenhain, L.J., Yoshinari, N.H., 2010. Novel spotted fever group rickettsioses, Brazil. Emerging Infectious Diseases, 16(3): 521-523.
- Sonenshine DE, Nicholson WL, Lane RS. Ticks (Ixodida). In: Mullen G, Durden L, editors. Medical and veterinary entomology. 1st ed. Amsterdã: Academic Press Elsevier Science; 2002. p. 517-558.
- Szabó, M.P.J., Cunha, T.M., Pinter, A. et al., 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. Experimental and Applied Acarology, 25 (10-11): 909-916.
- Szabó, M.P., Olegário, M.M., Santos, A.L.Q., 2007. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. Experimental and Applied Acarology, Netherlands v.43, p.73-84.
- Szabó, M. P., Nieri-Bastos, F.A., Spolidorio, M.G., Martins, T.F., Barbieri, A.M., Labruna, M. B., 2013. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agente of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. Parasitology, London v.140, p.719–728.
- Tolesano-Pascoli, G.V., Torga, K., Franchin, A.G., Ogrzewalska, M. Gerardi, M., Martins, M.M., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., Marçal Júnior, O., 2010. Ticks on birds in a forest fragment of Brazilian cerrado (savannah) in the municipality of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 19 :244-248.
- Veronez, V.A.; Freitas, B.Z.; Olegário, M.M.M. Carvalho, W.M.; Pascoli, G.V.T.; Thorga, K.; Garcia, M.V.; Szabó, M.P.J., 2010. Ticks (acari: ixodidae) within various phytophysiognomies of a cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. Experimental and Applied Acarology, 50(2):169-179.

Anexo I. Carrapatos de Tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) de acordo com data e município de coleta. Brasil 2002 a 2016.

	Data	Município	Estado	<i>A.sculptum</i>	<i>A.nodosum</i>	<i>A.calcaratum</i>	<i>A.auricularium</i>	<i>A.ovale</i>	<i>A.parvum</i>	<i>Am. spp</i>	<i>R.microplus</i>
1	25/03/2002	Igarapava	SP		1M/1F						
2	26/11/2002	Cristais Paulista	SP	4M	26M/2F	20M					
3	27/12/2002	Piratininga	SP		1F	1M					
4	16/05/2003	Franca	SP		1M/1F						
5	-/09/2003	Chapadão do Céu	GO							1N	
6	-/09/2003	Chapadão do Céu	GO	3N							
7	-/09/2003	Chapadão do Céu	GO	1F							
8	23/03/2004	Franca	SP	7M/4F	6M						
9	17/11/2005	Pires do Rio	GO	10M/9F	14M/4F					2N	
10	19/11/2005	Martinésia	MG	24M/14F	28M/11F					1N	
11	21/11/2006	Uberlândia	MG	25M/12F/22N	3M/1F						
12	25/01/2007	Uberlândia	MG	10M/3F	3M/1F						
13	30/01/2007	Frutal	MG	3M	1M						
14	23/02/2007	Planura	MG		2M/1F						
15	04/03/2007	Uberlândia	MG	21M/1F	3F						
16	26/04/2007	Uberlândia	MG	8M/1F	1F						
17	04/07/2007	Monte Alegre	MG	1N							
18	24/07/2007	Frutal	MG	5N	1M						

19	04/02/2008	Uberlândia	MG								
20	11/02/2008	Brasília	DF	1M	4M						
21	28/05/2008	Pratinha	MG	1M/1F	5M/1F	8M/3F					
22	07/06/2008	Uberlândia	MG								
23	23/06/2008	Uberlândia	MG		1F						
24	10/07/2008	Uberaba	MG								2M/3F
25	05/08/2008	Indianópolis	MG	2M/1F	18M/6F						
26	25/08/2008	Uberlândia	MG								
27	29/08/2008	Frutal	MG	6F							
28	05/12/2008	Prata	MG	54M/3F							1M/15F
29	17/02/2009	Araxá	MG	10M/3F/7L	10M	3M/1F					
30	17/02/2009	Britania	GO	15M	1F				1M		
31	09/04/2009	Uberlândia	MG		1M						
32	28/04/2009	Uberlândia	MG								
33	08/05/2009	Uberlândia	MG	2M/5F	9M/1F						
34	19/05/2009	Araxá	MG								
35	19/05/2009	Ibiá	MG		2M						
36	23/05/2009	Goiás Velho	GO	43M/21F	8M						
37	23/05/2009	Jussara	GO	11M/6F	5M						
38	02/06/2009	Uberlândia	MG	1N							
39	08/06/2009	Britania	GO	14M/3F/5N	2M/1F	2M					

40	09/07/2009	Bom Despacho	MG		1M						
41	14/07/2009	Uberlândia	MG		1M						
42	26/07/2009	Paranaíba	MS	2F							
43	31/07/2009	Aquidauana	MS	2M/4N	1F						
44	31/07/2009	Terenos	MS	2M/1F	1M						
45	08/10/2009	Britania	GO	16M/4F	2M/1F	2M					
46	28/10/2009	Uberlândia	MG	4M	1M						
47	07/12/2009	Araguari	MG	5M/2F	5M/2F						
48	15/12/2009	Araguari	MG	9M/2F	9M						
49	21/12/2009	Perdizes	MG	34M/26F	17M/21F	3M/5F		1F			
50	22/03/2010	Uberlândia	MG	3M	1M						
51	26/04/2010	Uberlândia	MG		5M/3F						
52	28/05/2010	Uberlândia	MG	2N	10M						2F/3N
53	30/05/2010	Uberlândia	MG		3M						
54	27/07/2010	Britânia	GO	3M/2F	4M/1F		1M				
55	30/08/2010	Uberlândia	MG	6M/1F	2M/1F						
56	18/09/2010	Cumari	GO	4M/5F/6N	1M						
57	12/10/2010	Britânia	GO		5M						
58	26/10/2010	Uberlândia	MG	2M	5M/5F						
59	01/02/2011	Btitânia	GO	9M/2F							
60	08/02/2011	Cumari	GO	16M/28F							

61	23/02/2011	Patrocínio	MG	152M/16F	7M						
62	07/04/2011	Uberlândia	MG		2M/1F						
63	27/07/2011	Prata	MG								
64	27/07/2011	Prata	MG								
65	29/07/2011	Miranda	MS	1M							1M
66	30/01/2012	Campo Grande	MS	2M							
67	30/01/2012	Campo Grande	MS	6M/1F							
68	03/02/2013	Três Lagoas	MS	13M	1M						
69	04/08/2013	Araguapaz	MG	3M/1F/3N	3M/1F						
70	18/04/2015	Cumari	GO	3M/3F							
71	20/06/2016	Ituiutaba	MG	1M/1F/4N							
72	01/07/2016	Patrocínio	MG	16N							17M/8F/94N/3L

M-Macho; F-Fêmea; N- Ninfa; L-Larva

Anexo II. Carrapatos de Tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*) de acordo com data e município de coleta. Brasil 1999 a 2014.

	Data	Município	Estado	<i>A.sculptum</i>	<i>A.nodosum</i>	<i>R.sanguineus</i>	<i>Amblyomma spp.</i>
1	01/02/1999	Jaboticabal	SP		1M/1F		
2	20/06/2000	Orlândia	SP		5M/2F		
3	10/10/2002	Viçosa	MG		11M/2F		
4	15/09/2003	Taquaritinga	SP		11M/1F		1N
5	11/11/2004	Ribeirão Preto	SP		2M/2F		
6	18/09/2005	Uberlândia	MG		8M/2F		
7	04/10/2005	Bebedouro	SP		21M/11F		
8	-/-/2006	Cândido Rodrigues	SP		13M/1F		
9	23/05/2006	Araguapaz	GO		4M		
10	25/05/2006	Candido Rodrigues	SP		15M/2F		
11	27/05/2006	Araguapaz	GO		1M/1F		
12	04/09/2007	Guaraci	SP		3M/2F		
13	04/11/2007	Araguari	MG		10M/3F		
14	23/11/2007	Uberlândia	MG		4M/1F	1M/1F	
15	01/09/2008	Aquidauna	MS	2N	16M/3F		2N
16	27/10/2008	Uberlândia	MG		12M/4F		1N
17	19/05/2009	Santa Juliana	MG		10M/1F		

18	31/07/2009	Terenos	MS		22M
19	06/09/2009	Araguari	MG		7M/1F
20	04/10/2009	Bebedouro	SP		21M/11F
21	08/10/2009	Britania	GO	3N	
22	25/11/2009	Uberlândia	MG		29M/6F
23	25/11/2009	Nova Ponte	MG		1M
24	22/10/2010	Uberlândia	MG		44M/8F
25	02/12/2010	Uberlândia	MG		5M/2F
26	29/11/2010	Uberlândia	MG		13M/1F
27	03/02/2013	Ribas do Rio Pardo	MS		2M/1F
28	20/06/2013	Uberaba	MG		1M/1F
29	09/03/2014	Goiás Velho	GO		5M/2F

Capítulo 4

***Flavivirus* associados a carrapatos de animais domésticos,
capivaras, roedores e ambiente em regiões de Cerrado e Mata
Atlântica, Brasil**

RESUMO

O gênero *Flavivirus* inclui muitos arbovírus causadores de doenças em humanos, como aqueles responsáveis por encefalites virais. No entanto, as pesquisas concentram-se sobre espécies transmitidas por mosquitos. Considerando-se a carência de informações sobre arbovírus transmitidos por carrapatos no Brasil, este estudo teve o objetivo de pesquisar por flavivírus na maior variedade possível de espécies de carrapatos, acervo do Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia- MG, coletados em Mata Atlântica e Cerrado. A extração do RNA viral foi realizada com Trizol®, os oligonucleotídeos utilizados para a síntese de DNA complementar (cDNA) e as PCR's, em dois "rounds, " para amplificar uma sequência parcial do gene que codifica a proteína NS5 de uma variedade de flavivírus. Para detecção do vírus do carrapato Mogiana (MGTV), flavivírus detectado em carrapato de bovinos, foram utilizados oligonucleotídeos que amplificam sequência parcial do gene que codifica a proteína NS3 de MGTV. Não houve sucesso na detecção de RNA do gênero *Flavivirus* com amostras extraídas de carrapatos de equinos, caninos, capivaras, roedores e ambiente. Porém, sequências nucleotídicas obtidas de amostras de carrapato de bovino *Rhipicephalus microplus* do município de Uberlândia, Minas Gerais, apresentaram identidade com sequências de MGTV descritas anteriormente. A importância desse vírus é ainda desconhecida e demanda mais estudos para se determinar possíveis efeitos sobre hospedeiros, uma vez que zoonoses virais transmitidas por carrapatos são problemas de saúde pública em diversas partes do mundo.

PALAVRAS-CHAVE: carrapatos, Cerrado, flavivírus, Mata Atlântica, MGTV.

INTRODUÇÃO

Arboviroses (doenças causadas por vírus e transmitidas por artrópodes) são mantidas na natureza em ciclos complexos envolvendo vetores artrópodes (principalmente mosquitos e carrapatos) que, após a infecção, transmitem esses microrganismos quando se alimentam do sangue do animal que parasitam (principalmente de aves e mamíferos) (Figueiredo et al., 2007).

As mudanças ecológicas produzidas pelo homem podem aumentar a prevalência de vetores, criar novos reservatórios ou induzir arbovírus a se adaptarem a novos ciclos de manutenção. Exemplo disso, é a reemergência da Febre hemorrágica da Criméia e Congo em humanos na Turquia, enfermidade causada por um vírus da família Bunyaviridae e gênero *Nairovirus*, transmitida por carrapatos *Hyalomma marginatum marginatum* que foi associada à fragmentação ambiental intercalando áreas de agricultura com áreas naturais (Estrada-Peña, 2014).

O gênero *Flavivirus*, da família Flaviviridae, compreende mais de 70 espécies de vírus, incluindo muitos transmitidos por artrópodes. Membros deste gênero, tais como o vírus da Dengue (DENV), o vírus da febre amarela (YFV), o vírus oeste do Nilo (WNV), o vírus da encefalite japonesa (JEV) e o vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV), são altamente patogênicos para a espécie humana, constituindo um dos principais problemas internacionais em termos de saúde pública (Fernandes-Garcia et al., 2009).

O TBEV, agente patogênico que afeta o sistema nervoso central humano, difundiu-se extensivamente em algumas regiões do mundo. Os casos humanos de infecções por TBEV têm aumentado nos últimos 30 anos dramaticamente colocando em perigo a saúde pública em vários países europeus (Charrel et al., 2004). Os hospedeiros principais para o vírus são

pequenos roedores, enquanto os seres humanos são hospedeiros acidentais (Achazi et al., 2011).

As mudanças climáticas, a crescente popularidade de atividades ao ar livre e mudanças no uso da terra são um risco potencial para o aumento no número de casos humanos de arboviroses (Mansfield et al., 2009; Süss, 2008).

No Brasil, a pesquisas sobre vírus transmitidos por carrapatos são extremamente escassas. Em 1999, Figueiredo e colaboradores encontraram um flavivírus em carrapato *Amblyomma cajennense* (hoje *A. sculptum*) em uma capivara doente em Matão-SP, mas não caracterizaram este flavivírus. Recentemente, pesquisadores detectaram em glândulas salivares de carrapatos *Rhipicephalus microplus*, RNA's com sequências nucleotídicas semelhantes às que codificam as proteínas não estruturais NS3 e NS5 de flavivírus. Foi realizado o isolamento desse vírus potencialmente novo e altamente divergente do gênero *Flavivirus*, nomeado vírus do carrapato Mogiana (MGTV) (Maruyama et al., 2013).

Tanto o Cerrado quanto a Mata Atlântica são biomas extremamente ameaçados por atividades humanas, considerados “hotspots” da biodiversidade global (Cincotta et al., 2000). Nos últimos 35 anos, mais da metade da extensão original do Cerrado, de dois milhões de quilômetros quadrados, foi destinada à agricultura, sendo o desmatamento deste bioma, mais acelerado do que na Floresta Amazônica (Marris, 2005). Por outro lado, as atividades agrícolas intercaladas com áreas naturais aumentam a probabilidade de contato entre parasitas de animais selvagens e domésticos.

Quanto à Mata Atlântica, segundo dados do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE-2016), nos últimos 28 anos, foram perdidos 1.850.896 ha, ou 18.509 km², o que equivale à área de 12 cidades de São Paulo. Atualmente, restam apenas 8,5% de remanescentes florestais acima de 100 ha. Se somados todos os fragmentos de floresta nativa acima de 3 ha, restam 12,5% dos 1,3 milhões de km² originais, sendo que Minas Gerais lidera o desmatamento no

país. Na maioria dos casos de zoonoses emergentes por arbovírus, as formas de introdução permanecem obscuras, no entanto, para arboviroses transmitidas por carrapatos, as atividades humanas parecem contribuir para a propagação a longas distâncias e o estabelecimento da doença em novos ecossistemas alterados por atividades humanas (Pfeffer & Dobler, 2010).

A maioria das investigações realizadas no Brasil enfatiza arboviroses transmitidas por mosquitos (Cruz et al., 2009; Figueiredo, 2007; Nunes et al., 2009; Romano-Lieber & Iversson, 2000), principalmente na região Amazônica. Em função das imensas áreas de floresta equatorial, o Brasil apresenta ecossistemas propícios para emergência/re-emergência e manutenção de arboviroses. Muitos desses agentes virais apresentam importância médica para o homem (Parreira et al., 2012).

Considerando-se as mudanças ecológicas produzidas pelo ser humano, intensificando o contato do homem e animais domésticos com vários parasitos dos ecossistemas originais, incluindo os carrapatos e patógenos a eles associados, o potencial dos carrapatos como vetores de bioagentes e a carência de informações sobre vírus encontrados em carrapatos no Brasil, este trabalho teve por objetivo pesquisar, em carrapatos, microrganismos do gênero *Flavivirus* em áreas naturais de Cerrado e Mata Atlântica em diferentes condições de preservação e adjacentes a áreas antropizadas.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa por flavivírus foi realizada através da procura por RNA viral e tentativas de isolamento em cultivo celular de amostras de carrapatos coletados em seis locais, tanto alterados por atividades humanas (Araguapaz – GO; Cumari – GO; Fazenda Capim Branco, Uberlândia-MG; Parque do Sábíá, Uberlândia-MG) quanto em ambientes preservados (Parque

Nacional Grande Sertão Veredas –MG; Parque Nacional do Iguaçu-PR). Os carrapatos coletados nestas áreas pertenciam ao acervo do Laboratório de Ixodologia-UFU. Algumas áreas de coleta mesclam ambientes alterados e preservados concomitantemente, sendo o Parque Nacional do Iguaçu, a única região com características de Mata Atlântica, e as outras regiões representantes do Cerrado.

Áreas de estudo

Fazenda Capim Branco - MG

A fazenda é propriedade da Universidade Federal de Uberlândia, no Município de Uberlândia, em Minas Gerais. Em uma área de 373 ha, possuiu setores de produção agrícola, bovinocultura de corte, ovinocultura, caprinocultura e equinocultura. A propriedade possuiu extensas áreas nativas de Cerrado associadas ao rio Uberabinha, que corta a fazenda. Nestas áreas, foram avistados diversos animais da fauna do Cerrado como Tamanduá-bandeira, Tamanduá-mirim, Veado catingueiro entre outros. Nesta propriedade, foram analisados, quanto à presença de flavivírus, carrapatos coletados em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*), mantidos em sistema extensivo de criação com acesso à vegetação natural, no ano de 2016.

Parque do Sabiá - MG

O Parque do Sabiá, localizado a, aproximadamente, seis km do centro da cidade de Uberlândia –MG, é um dos principais locais de lazer do município. Possui cerca de 185 ha, dos quais 40 são de remanescentes de vegetação nativa (Floresta Mesófila Semidecídua, Cerradão, Mata de Galeria e uma pequena Vereda). Está totalmente inserido na área urbana e abriga 149 espécies de aves registradas (Franchin; Marçal, 2004). O conjunto hidrográfico é composto por três nascentes que abastecem sete represas e originam um grande lago, todos utilizados por uma população de capivaras. Por pertencer ao bioma Cerrado, o clima é característico, com duas estações bem definidas, uma seca e outra chuvosa (Sano & Almeida,

1998). As análises dos carrapatos deste local foram realizadas com ixodídeos coletados em capivaras e no ambiente nos anos de 2010 e 2011 e armazenados a -80°C. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Utilização Animal sob o protocolo CEUA/UFU 065/12.

Araguapaz - GO

A Fazenda Moenda da Serra está localizada (15 ° 04' 18" S, 50° 25' 03" O, 336 m de altitude, na sede da fazenda no Município de Araguapaz, no estado de Goiás. Esta fazenda de 960 ha tem 60% de sua área preservada. A vegetação nativa dominante é um cerrado denso, às vezes formando mosaicos com cerrado mais aberto e pastagens nativas. Seu terreno é constituído de serras e planícies. O clima é característico de região de Cerrado, ou seja, verão chuvoso e inverno muito seco. A principal atividade econômica da fazenda é a criação comercial de cágados. São ainda mantidos na fazenda, gado nelore, poucas vacas de leite, equinos, suínos e cães, na maioria das vezes mantidos soltos e com acesso aos fragmentos de áreas naturais da região. Segundo moradores da fazenda, a fauna silvestre é muito rica incluindo animais como anta, onça-pintada e parda, entre outros. Uma extensa área de assentamentos, com pequenas propriedades empreendendo diversas atividades agrícolas, é vizinha à essa propriedade. Deste local, foram analisados, quanto à presença de flavivírus, carrapatos coletados no ambiente e em animais domésticos (caninos e equinos) em visitas à campo nos anos de 2012 e 2014. Os protocolos de captura e manuseio dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética de Utilização Animal da Universidade Federal de Uberlândia, análise final 037/13.

Cumari – GO

A região do Limoeiro, município de Cumari (18°15'S, 48°09'O), fica localizada no sudeste do estado de Goiás e abrange, aproximadamente, 50 propriedades, a maioria criadora de gado (*Bos indicus*). A vegetação da região é composta por fragmentos remanescentes de Cerrado (campos abertos, matas de galeria e florestas semidecíduas) e pastagem exótica

(*Brachiaria* sp.) destinada à alimentação do gado, criado em manejo extensivo. O clima é caracterizado por uma estação quente e úmida (outubro a março) e uma estação fria e seca (abril a setembro) (Sano & Almeida 1998). Foram analisados carrapatos coletados em cães das propriedades dessa região nos anos de 2013 e 2014. O projeto obteve aprovação pelo Comitê de Ética de Utilização Animal (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (UFG; processo número 086/14) e pela Universidade Federal de Uberlândia (UFU; processo número 089/14).

Parque Nacional Grande Sertão Veredas (PNGSV) - MG

Localizado no noroeste de Minas Gerais é uma das últimas reservas naturais de Cerrado no Brasil. Criado em 1989, tem sua sede localizada no Município de Chapada Gaúcha – MG, no noroeste do estado, divisa com a Bahia. Possui uma área de 230.853,42 hectares. A administração é feita pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). O clima é característico das savanas do Centro-Oeste, com duas estações bem definidas, época seca no inverno e chuvas no verão, com temperaturas médias anuais em torno de 23°C. Segundo dados fornecidos pelo Parque, a vegetação é dominada pelo Cerrado, sendo o maior parque do país com essa predominância, onde são identificadas as fitofisionomias: cerrado sentido restrito (denso e típico), cerradão, cerrado ralo, carrasco, vereda, mata de galeria, formações campestres (campo sujo e campo limpo) e agricultura/pastagens artificiais. A fauna abriga 22 espécies de anfíbios, 31 espécies de répteis, 244 espécies de aves e 56 espécies de mamíferos (BARBIERI, 2016). Foram analisados carrapatos do ambiente coletados em pontos não específicos na campanha de fevereiro de 2014 realizada neste local. Licença para as coletas no Parque foi concedida pelo ICMBio, autorização nº 25554-1.

Parque Nacional do Iguaçu

O Parque Nacional do Iguaçu ($25^{\circ} 05'$ a $25^{\circ} 41'S$ $53^{\circ} 40'$ a $54^{\circ} 38'O$), no Paraná, foi o segundo parque nacional brasileiro a ser criado. Atualmente sua área total é de 185.262,2 ha. Composta majoritariamente por floresta estacional semidecidual, sendo que nas porções altas, a mais de 800 m do nível do mar, pode ser encontrada a floresta ombrófila mista, ou mata de araucária. Quanto à biodiversidade de fauna, já foram registradas 45 espécies de mamíferos e 200 espécies de aves. São 14 os municípios localizados no entorno do parque exercendo atividades agrícolas diversas.

Neste parque, em 2016, foram coletados carrapatos de duas trilhas para pesquisa de flavivírus. A primeira, está situada próxima da área turística do parque, ao lado do rio Iguaçu, a uma altitude de 220 m, coordenadas $25^{\circ} 39'03,5"S$; $54^{\circ} 26'26,7"O$, no município de Foz do Iguaçu. A segunda trilha não fica em área turística e dista, aproximadamente, 85 km em linha reta da primeira. Localiza-se no município de Céu Azul, a uma altitude de 800 m e coordenadas $25^{\circ} 07'58,8"S$; $53^{\circ} 49'17,4"O$. Alguns carrapatos avulsos foram coletados próximo à primeira trilha, próximo da área turística, altitude de 200 m ($25^{\circ} 37' 15,3" S$ $54^{\circ} 28' 11,8"O$). Licença para as atividades no Parque foi concedida pelo ICMBio, autorização nº 48141-4.

Coleta de carrapatos no ambiente

As coletas de carrapato foram realizadas por arraste de flanela, inspeção visual da vegetação e/ou com armadilhas de gelo seco conforme Figura 1 (Szabó et al., 2009, Terassini et al., 2010).



Figura 1. Métodos de coleta de carrapatos no ambiente. A: armadilha de gelo seco; B: visualização sobre a vegetação; C: arraste de flanela.

Fonte: Arquivo do Laboratório de Ixodologia-UFU

Cada área de coleta possuía uma metodologia própria no que diz respeito à número de visitas, pontos de coleta, locais das armadilhas, pois engloba diferentes projetos realizados pelo Laboratório de Ixodologia da Universidade Federal de Uberlândia (Labix-UFU), cada qual com licença própria obtida junto ao Comitê de Ética de Utilização Animal. De maneira geral, a inspeção visual foi realizada em locais de vegetação mais densa e em trilhas de animais bem definidas. Após inspeção, as trilhas foram percorridas com arraste de flanela. Na ausência de trilhas bem definidas, apenas o arraste foi realizado. Armadilhas de gelo seco foram usadas em áreas do Cerrado ou na periferia da Mata Atlântica. Destaca-se que armadilhas de gelo seco são ineficazes em áreas no interior da Mata Atlântica (Szabó et al., 2009).

Coleta de carrapatos em hospedeiros

Os animais domésticos (caninos, equinos e bovinos) foram inspecionados por meio de observação visual e percepção tátil nas propriedades onde estas coletas foram realizadas. O processo de contenção das capivaras para coleta de carrapatos foi realizado pela equipe de veterinários do Parque do Sabiá, após sedação com xilazina e cetamina, quando houve manejo da população residente no Parque.

Identificação dos carrapatos

Os carrapatos coletados no campo foram acondicionados em frascos individuais identificados por local de coleta ou por animal e transportados para o Labix, onde foram armazenados à - 80°C até posterior utilização. Carrapatos adultos e ninfas foram identificados de acordo com chaves dicotômicas (Onofrio et al. 2006, Martins et al. 2010) e por comparação com a coleção de referência do Museu de Carrapatos do Labix-UFU.

Extração de RNA para detecção de flavivírus

A pesquisa de RNA viral foi realizada apenas com carrapatos que chegaram vivos ao laboratório ou naqueles congelados vivos a -80 °C. A extração do RNA foi realizada com Trizol® (Life Technologies Corp. Grand Island, EUA) seguindo as instruções do fabricante, porém com volume reduzido. Os carrapatos foram macerados com 20 µl de trizol e ressuspensos com 150 µl de PBS. Após centrifugação, a 11.000xg por 10 minutos a 4°C, 125µl da suspensão foram misturados com 375 µl de Trizol em um novo microtubo e a mistura incubada por 5 min à temperatura ambiente. Em seguida, 100 µl de clorofórmio foram adicionados, seguindo-se de nova agitação e incubação por mais 5 min. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g a 4°C por 15 min e a fase superior transferida para outro tubo, no qual realizou-se adição de 300 µl de isopropanol, homogeneização por inversão e incubação à temperatura ambiente por 10 min. O tubo foi centrifugado a 12.000 x g a 4°C por 10 min e o sobrenadante desprezado. O RNA foi lavado com 500 µl de etanol 75% e ressuspenso com 20 µl de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). As amostras de RNA foram armazenadas a -80°C até utilização para detecção molecular de flavivírus.

Deteccão molecular de vírus em carrapatos

A detecção de flavivírus foi realizada por transcrição reversa – reação em cadeia da polimerase (RT-PCR). O uso dos oligonucleotídeos para a síntese de DNA complementar (cDNA) e as PCR's, em dois “rounds”, foi baseado nos estudos de Moureau et al. (2007) com alteração do “primer” PF2R por adição na extremidade da sequência de promotor do SP6 RNA polimerase. Enquanto o “primer” utilizado para a nested PCR, o FLVNS5FR, foi modificado da sequência da sonda descrita por Johnson et al. (2010), por adição na extremidade 5' da sequência de promotor T7. Os primers utilizados amplificam uma sequência parcial do gene que codifica a proteína NS5 de uma gama de flavivírus. Para cada reação, foi utilizado um controle negativo e um controle positivo do gênero *Flavivirus* (DENV3- sorotipo 3 do vírus da dengue, ou SLEV- vírus da encefalite de Saint Louis, obtidos de cultura celular).

A detecção do vírus do carrapato Mogiana (MGTV) foi realizada em carrapatos de bovinos da Fazenda Capim Branco em Uberlândia e seguiu o protocolo estabelecido por Maruyama et al. (2013), com exceção do “primer” utilizado para nested PCR, elaborado neste estudo, com base na comparação de 43 sequências nucleotídicas parciais do gene NS3 de MGTV relatadas por Maruyama et al. (2013). Para tal, utilizou-se apenas controle negativo, pois não havia controle positivo para essas reações, com a necessidade de confirmação por sequenciamento no caso de amostras positivas.

Para a reação de transcrição reversa, 5 µl do RNA extraído foi misturado com 0,5 µM do “primer” reverso (com exceção para flavivírus geral, em que 0,5 µM de cada “primer” foi utilizado para transcrição) e a mistura foi incubada a 95°C por 3 min e resfriada em gelo por 1 min. Ao tubo, foram adicionados cada um dos desoxirribonucleotídeos para concentração final de 1mM, tampão fornecido pelo fabricante e 200U de transcriptase reversa de MMLV (Bioron® ou Invitrogen®). A amostra foi incubada a 37°C por 1 h e a enzima foi inativada a

70°C por 5 min. As principais informações das PCR's para amplificação de sequências nucleotídicas de flavivírus e MGTV estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Principais informações das PCR's para detecção de vírus em carrapatos.

Reação	Primer <i>Flavivirus</i> geral	Sequência	Temp. de "annealing"	Gene /região alvo	Fragmento amplificado (bp)	Referência
1ª PCR	PF1S (F)* SP6PF2R (R)*	TGYRTBTAYAACATGATGGG CTAGCATTTAGGTGACACTAGT GTCCCADCCDGC DGTRTC	58°C...45°C/30s (Touchdown) 45°C/30s	NS5	290	Moureau et al. (2007)
Nested- PCR	T7nFLVNS5FR SP6	TAATACGACTCACTATAGGGRC MATHTGGTWCATGTGG CTAGCATTTAGGTGACACTA	45°C/30s	NS5	242	Johnson et al. (2010)
MGTV						
1ª PCR	317-5-126 (F) 317-3-383 (R)	GTTACGGCTTCAGGAACCAA GGAGGGTTGCATTTT TAGCA	54°C/30s	NS3	260	Maruyama et al. (2013)
Nested- PCR	MGTV FNAA• 317 -3-383	GGAACCAAGGGGATGATAA GGAGGGTTGCATTTT TAGCA	48°C/30s	NS3	240	• Elaborado neste estudo

*(F): *Foward* / (R): *Reverse*

Identificação dos patógenos, sequenciamento e análise

Os segmentos amplificados foram purificados utilizando QIAquick PCR purification kit (Qiagen®) e submetidos ao sequenciamento nucleotídico utilizando BigDye® terminator v3.1 (ACTGene, Alvorada –RS). Os eletroferogramas foram analisados, as sequências editadas com o programa SeqMan Pro do pacote Lasergene (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EUA) e submetidas à busca por sequências similares depositadas no GenBank através da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Tentativa de Isolamento de Flavivírus em células Vero

A tentativa de isolamento de vírus foi realizada em células Vero. Para esse fim amostras de carrapatos adultos mantidos a -80 °C foram descongelados e tratados com 500 µL de álcool-iodado durante 15 minutos para desinfecção. Em seguida foram lavados com PBS

(500 µL) (procedimento repetido por 2 vezes). Os carrapatos foram divididos em 2 fragmentos com uma lâmina estéril e descartável. Um fragmento foi destinado à extração para PCR. O outro foi submetido ao cultivo celular: Células da linhagem Vero foram cultivadas em placas de cultura celular de 24 poços em meio DMEM contendo soro fetal bovino (SFB) 10%, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 0,1 mg/ml, anfotericina B 2,5 µg/ml a 37°C e CO₂ 5%. Estas placas foram inoculadas com a suspensão do macerado de carrapatos, utilizando o meio descrito acima, porém com SFB 2%. A placa foi incubada a 37°C por sete dias e as células observadas em microscópio óptico para possível observação de efeito citopático (ECP) causado por flavivírus.

RESULTADOS

No total, foram testadas amostras de RNA de 376 carrapatos por RT-PCR para presença de microrganismos do gênero *Flavivirus*. No Cerrado, os carrapatos foram coletados de animais domésticos (bovinos, equinos, caninos), capivaras, roedores e do ambiente; enquanto da Mata Atlântica, os espécimes foram somente do ambiente. Onze espécies de carrapatos da família Ixodidae e um da família Argasidae foram analisados. As espécies coletadas no Cerrado foram: *Amblyomma sculptum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus*, *Dermacentor nitens*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma rotundatum*, *Amblyomma naponense* e *Ornithodoros* sp.. Examinou-se da região de Mata Atlântica, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma brasiliense* e *Amblyomma ovale*, sendo esta última, a única espécie averiguada nos dois tipos de Bioma. As espécies e número de carrapatos analisados por local estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Espécies e número de carrapatos submetidos à pesquisa de RNA de *Flavivirus* de acordo com o local de coleta e hospedeiro.

Local	Coleta (Nº de hosp.)	<i>A.sculptum</i>	<i>R.sanguineus</i>	<i>R.microplus</i>	<i>D.nitens</i>	<i>A.ovale</i>	<i>A.dubitatum</i>	<i>A.parvum</i>	<i>A.rotundatum</i>	<i>A.naponense</i>	<i>A.brasiliense</i>	<i>A.incisum</i>	<i>Ornithodoros</i> <i>sp.</i>
PNI	Ambiente	-	-	-	-	1F	-	-	-	-	9M/ 4F	6M/ 1F	-
PNGSV	Ambiente	14M/ 24F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Parque Sabiá	Ambiente Capivaras(15)	16M/ 7F 9M/ 6F	- -	- -	- -	- -	1M/ 1F 7M/ 13F	- -	- -	- -	- -	- -	- -
Capim Branco	Bovinos (18)	-	-	18M/ 40F	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumari- GO	Caninos (17)	31N	1F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Araguapaz -GO	Caninos (10) Equinos (5) Roedores (3) Suíno (1) Ambiente	3M/ 3F 10M/ 5F - 2F 25M/ 27F	40M/ 14F - - - -	- - - - -	- 12M/ 6F - - -	4M/ 3F - - - 1M/ 2F	- - - - -	2F - 1M - 1M	- - - - 1F	- - - - 1F	- - - - -	- - - - -	- - 3N - -

Quanto à RT-PCR para detecção de RNA do gênero *Flavivirus* com 318 amostras extraídas de equinos, caninos, capivaras, roedores e ambiente, observou-se formação de bandas inespecíficas com produtos de amplificação divergentes do tamanho esperado, na maioria das amostras (Figura 2). Alguns dos produtos de RT-PCR apresentaram tamanho semelhante ao esperado, porém, a reação de sequenciamento apresentou baixa qualidade, assim, não foi possível determinar sua sequência nucleotídica.

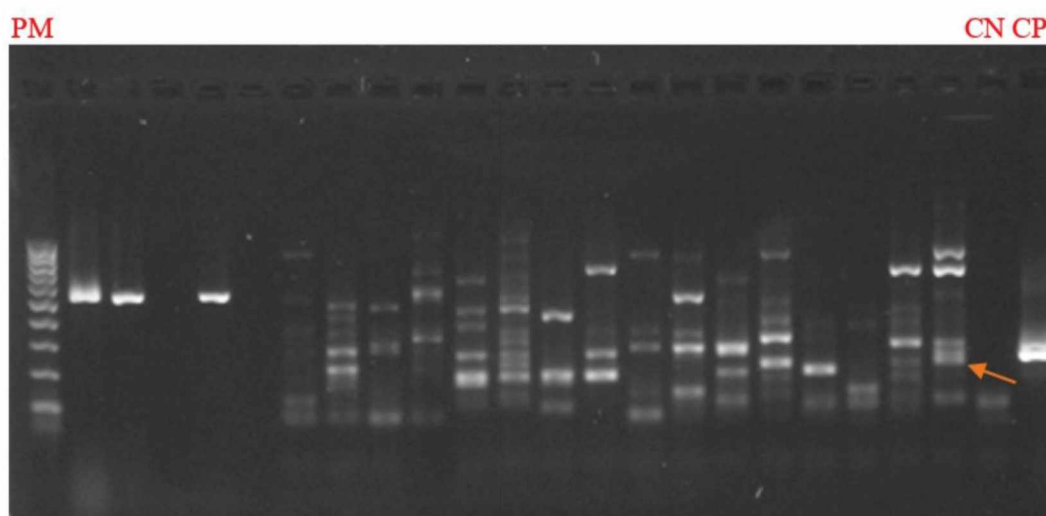


Figura 2. Eletroforese de produtos de RT-PCR para detecção de RNA do gênero *Flavivirus* com amostras de RNA extraídas de carrapatos do ambiente do PNI. PM: padrão de peso molecular de 100pb; CN: controle negativo; CP: controle positivo. A seta indica a banda formada pelo produto de RT-PCR com tamanho de “amplicon” semelhante ao esperado.

Com relação à RT-PCR para detecção de MGTV, foram testadas amostras de RNA extraídas de 58 carrapatos, da espécie *R. microplus*, coletadas em bovinos da Fazenda Capim Branco. Sete amostras (18 carrapatos extraídos em “pools”), pertencentes a animais diferentes, apresentaram produto de amplificação com tamanho semelhante ao esperado (Figura 3). Como não havia controle positivo para MGTV, três amostras foram selecionadas e enviadas para sequenciamento. Sequências nucleotídicas dessas três amostras foram obtidas e uma delas revelou identidade de aproximadamente 98% com a amostra Mogiana tick virus isolate (JQ289033-1) depositada no GenBank por Maruyama e colaboradores (2013). Essas amostras divergiram cerca de 1% entre si na análise de nucleotídeos (Figura 4).

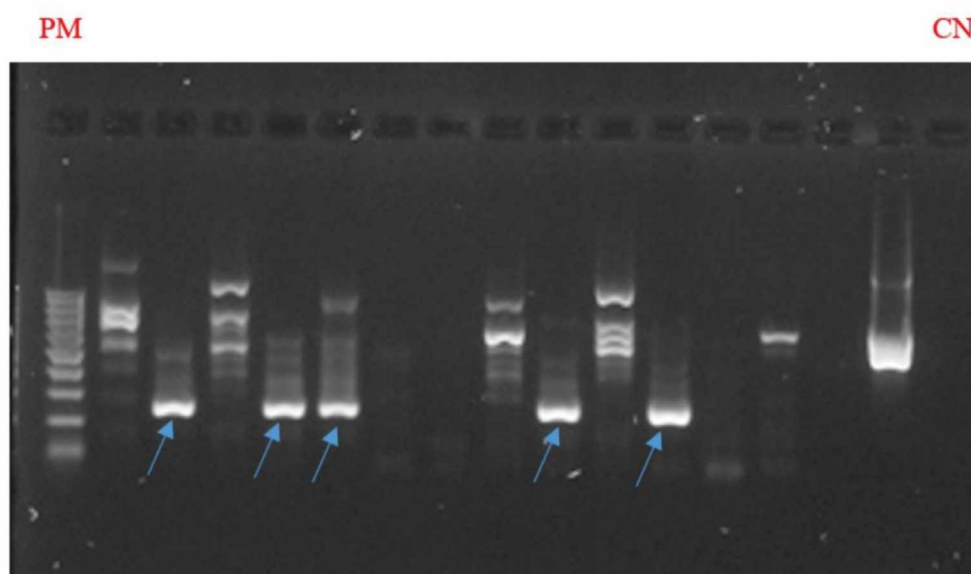


Figura 3. Eletroforese dos produtos de nested-RT-PCR para MGTV. As amostras de RNA's testadas foram extraídas dos carrapatos coletados em bovinos da Fazenda Capim Branco, Uberlândia, MG, da espécie *R. microplus*. PM: padrão de peso molecular de 100pb; CN: controle negativo. As setas indicam o tamanho esperado do produto de RT-PCR em cinco amostras.

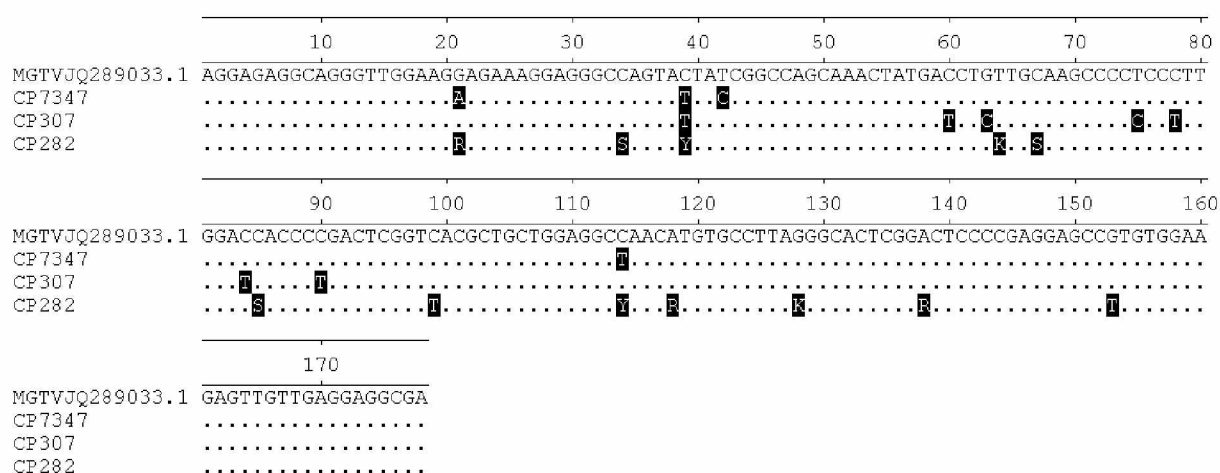


Figura 4. Alinhamento do nucleotídeo 61 ao 238 da sequência de referência de MGTV de número de acesso JQ289033.1 com as sequências obtidas de bovinos da Fazenda Capim Branco.

As tentativas de isolamento em células vero foram realizadas com seis carrapatos adultos (01 *R. sanguineus*; 01 *A. ovale* e 04 *A. sculptum*), mas não houve sucesso, devido a contaminação do material utilizado.

DISCUSSÃO

Considerando a pesquisa ainda incipiente no Brasil, as dimensões continentais do país e a elevada biodiversidade, optou-se por pesquisar por flavivírus na maior variedade possível de espécies de carrapatos e na mais ampla distribuição geográfica possível. A amostragem deve ser considerada reduzida em função dos expostos, porém a tentativa deste estudo de avaliar a presença de *Flavivirus* é a primeira pesquisa no Brasil envolvendo carrapatos de ambiente e abrangendo tal variedade de espécies animais, assim como essa gama de espécies de carrapatos para determinada finalidade.

Foram avaliados espécimes de 12 espécies de carrapatos representando, a ixodofauna nativa e aquela exótica, em sua maioria associada a animais domésticos. Desses animais, além do *R. microplus*, foram coletadas as espécies *D. nitens*, *A. sculptum* e *R. sanguineus*, parasitas usuais de bovinos, equinos e caninos preferencialmente (Barros-Battesti et al., 2006).

Considerando a importância dos cães como animais próximos ao homem, e que exploram o ambiente que os cerca, há grande possibilidade de carreamento de patógenos do meio selvagem para o ser humano (Pinter e Labruna, 2006; Queirogas et al., 2010). Os carrapatos encontrados em cães e avaliados neste estudo quanto à presença de flavivírus pertenciam às espécies *R. sanguineus*, *A. sculptum*, *A. ovale* e *A. parvum*. Não há relatos do envolvimento dessas espécies na transmissão de vírus, mas são vinculadas à transmissão de outros patógenos, especialmente riquetsias (Labruna, 2009; Pacheco, et al., 2007; Szabó et al., 2013a).

As infestações por *R. sanguineus* ocorrem, quase que exclusivamente, em cães domésticos, que parecem não desenvolver resistência aos carrapatos, sendo comuns as reinfestações. (Szabó et al., 1995). Este carrapato é um importante vetor de doenças para cães, relacionado inclusive à transmissão de riquetsias (Claerebout et al., 2013), mas não com vírus.

Estudos de soroprevalência de infecção causada por TBEV na Europa mostraram que os cães são susceptíveis à infecção por este vírus. No entanto, os carrapatos transmissores desse patógeno pertencem aos gêneros *Dermacentor* e *Ixodes*, principalmente (Bajer et al., 2013; Pfeffer & Dobler, 2011).

Neste estudo, amostras da espécie *A. sculptum* foram coletadas apenas em áreas de Cerrado, tanto em vida livre no ambiente, quanto em equinos, caninos, suíno e capivaras. Estes dados corroboram com as pesquisas que consideram esta uma espécie de carrapato típica do Cerrado, ausente em áreas preservadas de Mata Atlântica, mas capaz de se estabelecer em áreas degradadas desse bioma (Szabó et al., 2007; Szabó et al., 2009; Veronez et al., 2010). Ademais é um carrapato generalista na escolha de hospedeiros e infesta o homem, animais domésticos e selvagens (Barros-Battesti et al., 2006). Apesar de não ter sido detectado molecularmente nenhum flavivírus nesta espécie, com o teste utilizado neste estudo, é conveniente que ela continue sendo pesquisada, pois sua associação com riquetsias é de extrema importância para a saúde pública (Labruna, 2009; Souza et al., 2015).

Figueiredo et al. (1999), foram os primeiros a relatarem a presença de um flavivírus em carrapato *Amblyomma sculptum* coletado em uma capivara doente em Matão-SP. Esse vírus não foi caracterizado e as pesquisas referentes a arboviroses no Brasil concentram-se até hoje sobre aquelas transmitidas por mosquitos (Romano-Lieber e Iversson, 2000; Figueiredo, 2007; Casseb et al., 2013), exceto no estudo realizado por Maruyama et al. (2013) no qual foi descrito o flavivírus MGTV identificado em *R. microplus* de bovinos. As alterações ambientais antropogênicas criaram nichos adequados para algumas espécies, como o *A. sculptum*, que são favorecidas por ambientes verdes alterados (Szabó et al., 2006), tais mudanças possibilitam sua associação com patógenos emergentes.

Neste estudo, *A. ovale* esteve associado aos ambientes de Mata Atlântica, Cerrado e cães. Parasita de carnívoros na forma adulta, frequentemente se alimenta em cães que

adentram as matas (Labruna et al., 2005; Szabó et al., 2013b). Também é importante a pesquisa de patógenos nesta espécie, que recentemente foi associada a uma riquetsiose emergente e patogênica para seres humanos no Brasil (Spolidorio et al., 2010; Silva et al., 2011) que envolve em seu ciclo esta espécie, áreas naturais e cães (Sabatini et al., 2010; Szabó et al., 2013a).

Carrapatos *A. parvum* se alimentam de uma variedade de hospedeiros, sendo registrados inclusive em carnívoros e humanos (Guglielmone et al., 2006; Labruna et al., 2005; Szabó et al., 2007), além de registros em roedores (Nava et al., 2008). Desta espécie de carrapato, foram analisadas para flavivírus duas fêmeas coletadas em cães e dois machos, um coletado em ambiente de Cerrado e outro em roedor desse mesmo bioma. Riquetsias de patogenicidade desconhecida também já foram registradas nesta espécie em outros países (Pacheco et al., 2007; Paddock et al., 2010). Devido a capacidade de se alimentar em roedores e humanos, possui características necessárias para transmissão de agentes infecciosos para esses seres.

Os três estágios do carrapato *A. dubitatum* são relacionados a capivaras (Nava et al., 2010), desta forma, só foram avaliados espécimes coletados no Parque do Sabiá (Uberlândia), única área com presença confirmada deste hospedeiro. Associado à *Rickettsia bellii*, de patogenicidade desconhecida (Brites-Neto et al., 2013; Labruna, 2004b), este carrapato também já foi associado a uma riquetsia do grupo da febre maculosa no estado do Mato Grosso (Matias et al., 2015). Isso reforça a importância de estudos para determinar o papel desta espécie na transmissão de patógenos, especialmente pelo fato de que capivaras também são hospedeiras para *A. sculptum* (Pacheco et al., 2009) e o mecanismo de “co-feeding” ou co-alimentação é extremamente importante na transmissão de vírus, como aqueles que causam encefalites (TBEV) (Randolph, 2011). Assim, a possibilidade de transmissão de

patógenos entre carrapatos de diferentes espécies que se alimentam em um mesmo sítio do hospedeiro, sem a necessidade de estar em período de viremia, não deve ser descartada.

Quanto às espécies *A. naponense* e *A. rotundatum*, foi examinada apenas uma fêmea de cada espécie, coletadas em ambiente de Cerrado. A primeira tem como hospedeiros preferenciais suídeos selvagens como o porco-do-mato (*Tayassu tajaca*), queixada (*Tayassu pecari*), podendo parasitar espécies como tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e quati (*Nasua nasua*), além de suínos domésticos (Guimarães et al., 2001; Jones et al., 1972.; Labruna et al., 2002a). A segunda, *A. rotundatum*, é comum em répteis e anfíbios, mas acidentalmente pode parasitar hospedeiros homeotérmicos (Barros-Battesti et al., 2006; Jones, 1972).

As únicas duas espécies encontradas somente em ambiente de Mata Atlântica foram *A. brasiliense* e *A. incisum*, sendo que a primeira é endêmica na América do Sul, com registros na Argentina, Paraguai e Brasil (Guglielmone et al. 2003; Ogrzewalska et al. 2007; Szabó et al. 2009). *Amblyomma incisum* Neumann é uma espécie importante de carrapato na Mata Atlântica do Brasil, altamente dependente do ambiente de floresta, que tem as antas como principais hospedeiros para o estágio adulto (Szabó et al., 2009). As duas espécies merecem avaliação, uma vez que estágios imaturos, especialmente ninfas, apresentam alta agressividade para seres humanos (Aragão, 1936; Szabó et al., 2006).

Os únicos representantes da família *Argasidae* encontrados foram três ninfas do gênero *Ornithodoros*, coletadas em roedores *Cavia* sp. e *Thrichomys* sp. e analisadas para presença de vírus. Trata-se de uma espécie nova ainda em fase de descrição (Martins, comunicação pessoal). Várias espécies de carrapatos desse gênero foram descobertas recentemente na América do Sul (Venzal et al., 2013; Venzal et al., 2015). Na Ásia, são frequentemente associados com o vírus Karshi, um flavivírus que causa encefalite em humanos (Turell, 2015). Apesar de não ter sido detectado flavivírus nos espécimes aqui

coletados, espécies de *Ornithodoros* estão relacionadas a outros vírus transmitidos por carrapatos na Ásia, África e Europa, como o vírus da Peste Suína Africana, o único arbovírus de DNA, da família *Asfarviridae*, transmitido por *O. moubata* (Labuda e Nuttall, 2004).

De todas as amostras testadas, apenas sete de carrapatos *R. microplus* coletados em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) na Fazenda Capim Branco-Uberlândia, apresentaram amplificação de tamanho esperado com RT-PCR para MGTV. A observação de amplificação inespecífica para presença de outros flavivírus na maioria das espécies de carrapatos analisadas pode ter ocorrido por fatores que estejam impedindo a padronização perfeita do protocolo. Fatores como concentração de reagentes, temperaturas e número de ciclos utilizados em termociclador podem afetar a eficiência dos produtos gerados (Boleda et al., 1996). Apesar das tentativas de adequação para otimização dos resultados, pode ser necessário um perfeito ajuste nas condições da reação.

O carrapato *R. microplus* (Cannestrini, 1887) parasita bovinos preferencialmente, no entanto, outros animais podem acidentalmente ser parasitados quando atravessam pastos muito infestados (Szabó et al., 2001). Quando ocorre alta infestação em gado, este carrapato pode, eventualmente, parasitar humanos durante a manipulação do animal (Barros-Battesti et al., 2006). Além de reduções na produção de leite e carne, e diminuição na qualidade do couro, transmite uma variedade de agentes infecciosos como protozoários, riquetsias, bactérias e vírus (Cupp, 1991). Estima-se que os prejuízos gerados por este parasita ao rebanho comercial brasileiro sejam em torno de US\$ 4 milhões/ano (Grisi, 2013). Apesar da raça europeia (*Bos taurus taurus*) ser mais susceptível à infestação por carrapatos *R. microplus*, a raça nelore também pode sofrer infestações, uma vez que animais apresentam resistência e susceptibilidade individuais, mesmo dentro de uma mesma raça (Paiva Neto, 2004).

Antes de 2013, não havia relatos de vírus da família *Flaviviridae* em *R. microplus* a não ser de partículas semelhantes a vírus encontradas em glândula salivar (Megaw, 1978). As

proteínas não estruturais NS3 e NS5 de *Flavivirus* realizam as atividades enzimáticas necessárias para replicação e montagem viral (Bollati et al., 2010). O vírus do carrapato Mogiana (MGTV) foi isolado recentemente de carrapatos coletados em touros da raça Holandesa por Maruyama et al., (2013), sendo esse o único trabalho de referência para MGTV.

Em 58 carrapatos (40 fêmeas e 18 machos) coletados de 18 animais, encontrou-se sete animais com carrapatos com RNA viral, indicando uma alta prevalência de animais com carrapatos infectados (38%). Os pools representavam dez fêmeas e sete machos da espécie *R. microplus*. Apesar do isolamento viral descrito por Maruyama et al., (2013) ter sido realizado com pools de fêmeas desta espécie, a detecção molecular foi realizada com amostras extraídas de machos, fêmeas e larvas não alimentadas, o que sugere uma possível transmissão transovariana do vírus, embora não tenham obtido sucesso no isolamento a partir de pools de larvas não alimentadas.

A transmissão vertical é uma estratégia para que arbovírus se mantenham na natureza mesmo sob circunstâncias adversas, como ocorre com TBEV, que apresenta entre outras, transmissão transovariana e transtadial (Dumpis et al., 1999). Apesar de não terem observado efeito citopático em todos os tipos de células inoculadas, resultados positivos de PCR sugerem que houve replicação do MGTV em linhagens de células de mamíferos e artrópodes, o que também sugere que esse seja um arbovírus verdadeiro (Maruyama et al., 2013).

Quanto à divergência de nucleotídeos entre as amostras que apresentaram amplificação para MGTV neste estudo, parece ser uma característica comum de vírus RNA, altas taxas de mutação com rápida evolução no genoma (Holland et al., 1982). Assim como no trabalho de Maruyama et al. (2013), substituições sinônimas de nucleotídeos foram observadas ao longo das sequências de amostras (Figura 5).

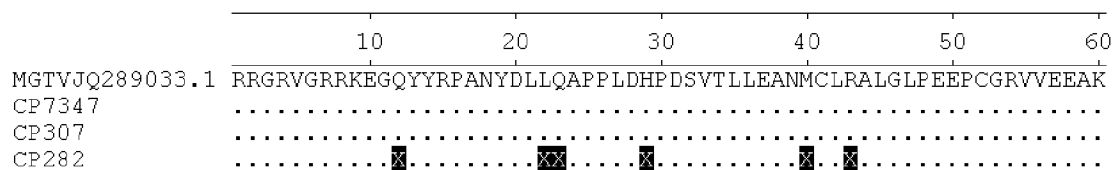


Figura 5. Comparação entre as sequências deduzidas de aminoácidos de MGTV, como referência (Maruyama et al., 2013), e as amostras da Fazenda Capim Branco, Uberlândia.

O significado e a importância desse vírus encontrado em *R. microplus* é por ora desconhecido e demanda pesquisas adicionais para se determinar sua abrangência geográfica e possíveis efeitos sobre o hospedeiro vertebrado e invertebrado. Além disso, a pesquisa por arbovírus em carrapatos no Brasil precisa ser expandida em termos numéricos e na abrangência geográfica. Este estudo, inicialmente acadêmico, pode se tornar fonte importante de informação anos a décadas mais tarde, como foi o caso do Zika vírus.

CONCLUSÕES

Este foi o estudo mais abrangente em relação a arbovírus transmitidos por carrapatos no Brasil.

Dentre onze espécies da família *Ixodidae* e uma da família *Argasidae*, avaliadas quanto à presença de *Flavivirus*, apenas a espécie *Rhipicephalus microplus* apresentou amostras positivas em reação em cadeia da polimerase (PCR) para a proteína não estrutural NS3 presente em flavivírus. Estas amostras apresentaram cerca de 98% de identidade com o Vírus do carrapato Mogiana (MGTV).

Apesar de não se conhecer o real significado desse achado, mais pesquisas são necessárias, uma vez que esse carrapato causa inúmeros prejuízos para a pecuária nacional e esse vírus pode ser um agente patogênico ainda desconhecido.

REFERÊNCIAS

- Achazi, K., Ruzek, D., Donoso-Mantke, O., Schlegel, M., Ali, H. S., Wenk, M.; Schmidt-Chanasit, J., Ohlmeyer, L., Ruhe, F., Vor, T., Kiffner, C., Kallies, R., Ulrich, R. G., Niedrig, M., 2011. Rodents as Sentinels for the Prevalence of Tick-Borne Encephalitis Virus. *Vector-borne and zoonotic diseases*, v. 11, n. 6.
- Aragão, H., 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.31, p.759-843, 1936.
- Beati, L., Nava, S., Burkman, E.J., Barros-Battesti D., Labruna, M.B., Guglielmone, A.A., et al., 2013. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. *BMC Evol Biol.* 13:267.
- Bajer, A., Rodo, A., Bednarska, M., Mierzejewska, E., Welc-Falęciak, R., 2013. *Babesia canis* and tick-borne encephalitis virus (TBEV) co-infection in a sled dog. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, v.20, n. 3, 426–430.
- Barbieri, A.R.M., 2016. Ecologia de carrapatos e riquetsias transmitidas por carrapatos em uma reserva de cerrado brasileiro. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, SP. 2016.
- Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3) /Butantan, 2006.223 p.
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E.A., Grard, G., Grimes, J.M., Hilgenfeld, R., Jansson, A.M., Malet, H., Mancini, E.J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., Moureau, G., Neyts, J., Owens, R.J., Ren, J., Selisko, B., Speroni, S., Steuber, H., Stuart, D.I., Unge, T., Bolognesi, M., 2010. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res*, 87: 125-148.
- Boleda, M.D., P. Briones, J. Ferrés, L. Tyfield & R. Pi. 1996. Experimental design: A useful tool for PCR optimization. *BioTechniques*, 21: 134-140.
- Brites-Neto, J., Nieri-Bastos, F.A., Brasil, J., Duarte, K.M.R., Martins, T.F., Veríssimo, C.J., Barbieri, A.R.M., Labruna, M.B., 2013. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in a Brazilian spotted fever-endemic area. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 367–372.
- Charrel, R. N., Attoui, H., Butenko, A. M., Clegg, J. C., Deubel, V. T., Frolova, V., Gould, E. A., Gritsun, T. S., Heinz, F. X., Labuda, M., Lashkevich, V. A., Loktev, V., Lundkvist, A., Lvov, D. V., Mandl, C. W., Niedrig, M., Papa, A., Petrov V. S., Plyusnin, A., Randolph, S., Suss, J., Zlobin, V. I., Lamballerie, X., 2004. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clinical Microbiology and Infection*, v. 10, n.12.
- Cincotta, R.P.; Wisniewski, J.; Engelman, R., 2000. Human populations in the biodiversity hotspots. *Nature*, v. 404, n.27, p. 990-992.

- Claerebout, E., Losson, B., Cochez, C., Casaert, S., Dalemans, A.C., Cat, A.D., Madder, M., Saegerman, C., Heyman, P., Lempereur, L., 2013. Ticks and associated pathogens collected from dogs and cats in Belgium. *Parasites & Vectors*, 6:183.
- Casseb, A. R.; Casseb, L. M. N.; Silva, S. P.; Vasconcelos, P. F. C., 2013. Arbovírus: importante zoonose na amazônia brasileira. *Veterinária e Zootecnia*, v. 20, n.3, 2013.
- Cruz, A. C. R.; Prazeres, A. S. C.; Gama, E. C., 2009. Vigilância sorológica para arbovírus em Juruti, Pará, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.25, n.11, p.2517-2523.
- Cupp, E.W. Biology of ticks. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.21, n.1, p.1-25, 1991.
- Dumpis, U., Crook, D., Oksi, J., 1999. Tick-Borne Encephalitis. *CID* 1999;28. Disponível em: <http://cid.oxfordjournals.org/>. Acesso em 29 jan 2014.
- Estrada-Peña, A., de la Fuente, J., 2014. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antivir. Res.*, 108, pp. 104–128.
- Fernandez-Garcia, M.D., Mazzon, M., Jacobs, M., Amara, A., 2009. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. 5(4):318-28.
- Figueiredo, T. M., Badra, S. J., Pereira, L. E., Szabó, M. P. J., 1999. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n.6, p.613-619.
- Figueiredo, L.T.M., 2007. Arboviroses emergentes no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n.2, p.224-229.
- Franchin, A.G., Marçal Júnior, O., 2004. A riqueza da avifauna no Parque Municipal do Sabiá, zona urbana de Uberlândia (MG). *Revista Biotemas*, v.17, n.1, p. 179-202.
- Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Keirans, J.E., Robbins, R.G., 2003. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region. *Atalanta*, Houten, The Netherlands, International Consortium on Ticks and Tickborne Diseases (ICTTD-2), 2003. 173 p.
- Guimarães, J.H., Tucci, E.C., Barros-Battesti, D.M. (Ed.) *Ectoparasitos de importância veterinária*. São Paulo: Editora Plêidade, Ltda.M.E., 2001. 213 p.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R.S., Barros, A.T.M., Cançado, P.H.D., Villela, H.S., 2013. Perdas econômicas potenciais devido ao parasitismo em bovinos no Brasil. *Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 11, n. 3.
- INPE. 2016. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Estudo aponta os riscos da exploração do Cerrado. Disponível em: http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=4370
- Johnson, N., *et al.*, 2010. Assessment of a novel real-time pan-flavivirus RT-polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis*, v.10, n.7, p.665-71.

- Jones, E.K., Clifford, C.M., Keirans, J.E., 1972. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the Western Hemisphere. Brigham Young University Science Bulletin. Biological series, v. 17, n. 5, p.1-40.
- Labuda, M.; Nuttall, P.A., 2004. Tick-borne viruses. *Parasitology*, v.129: S221-245.
- Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Schumaker, T.T.S., Camargo, E.P., 2002a. Parasitism of Domestic Swine (*Sus scrofa*) by *Amblyomma* Ticks (Acari: Ixodidae) on a Farm at Monte Negro, Western Amazon. *Journal of Medical Entomology*, v. 39, n. 1, p. 241-243.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Bouyer, D.H. et al., 2004b. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol*; 41:1073-1081.
- Labruna, M.B., Jorge, R.S.P., Sana, D.A., Jácomo, A.T.A., Kashivakura, C.K., Furtado, M.M., et al., 2005. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. *Exp.Appl. Acarol.* 36, 149–163.
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. In: *Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*, 1166, 2009, New York. *Annals New York Academy of Sciences*. p.156–166.
- Lopes, C.M.L. et al., 1998. Host specificity of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) with comments on the drop-off rhythm. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.93, p.347-351.
- Mansfield, K. L., Johnson, N., Phipps, L.P., J. R. Stephenson, J. R., Fooks, A. R, Solomon, T., 2009. Tick-borne encephalitis virus – a review of an emerging zoonosis. *Journal of General Virology* v. 90, p.1781–1794.
- Marris, E., 2005. The forgotten ecosystem. *Nature*, v.13, p.944-945.
- Martins, T. F., Onofrio, V. C., Barros-Battesti, D. M., Labruna, M. B., 2010. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks Tick-Borne Dis.*, v,1, p.75–99.
- Matias, J., Garcia, M.V., Cunha, R. C., Aguirre, A.A.R., Barros, J.C., Csordas, B.G., Andreotti, R., 2015. Spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 6, 107–110.
- Megaw, M.W., 1978. Virus-like particles pathogenic to salivary glands of the tick *Boophilus microplus*. *Nature* 271: 483-484.
- Moureau, G. et al., 2007. A real-time RT-PCR method for the universal detection and identification of flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*, v.7, p.467-77.
- Nava, S., Elshenawy, Y., Eremeeva, M.E., Sumner, J.W., Mastropaolo, M., Paddock, C.D., 2008. *Rickettsia parkeri* in Argentina. *Emerg Infect Dis*.14:1894–1897.
- Nava, S., Venzal, J.M., Labruna, M.B., Mastropaolo, M., Gonzáles, E.M., Mangold, A.J., et al., 2010. Hosts, distribution and genetic divergegence (16SrDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl.Acarol.* 51, 335–351.

- Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* sp., *Amblyomma interandinum* sp. and *Amblyomma patinoi* sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 252–76.
- Nunes, M.R.T., Barbosa, T.F.S., Casseb, L.M.N. et al., 2009. Eco-epidemiologia dos arbovírus na área de influência da rodovia Cuiabá-Santarém (BR 163), Estado do Pará, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v.25, n.12, p. 2583-2602.
- Ogrzewalska, M., Uezu, A., Ferreira, F., Labruna, M.B., 2007. Carrapatos (Acari: Ixodidae) capturados na reserva natural do Vale do Rio Doce, Linhares, Espírito Santo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n. 3, p. 177-179.
- Onófrio, V.C.; Labruna, M.B.; Pinter, A.; Giacomini, F.G.; Barros-Battesti, D.M. Comentários e chaves para as espécies de *Amblyomma*. In: Barros-Battesti, D.M. Arzua, M.; Bechara, H.G. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 1. ed. São Paulo/BR: Vox /ICTTD-3/ Butantan, 2006. cap. 6, p.53-71.
- Pacheco, R.C., Horta, M.C., Moraes-Filho, J., Ataliba, A.C., Pinter, A., Labruna, M.B., 2007. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. *Biomedica* 27, 364–371.
- Pacheco, R.C., Horta, M.C., Pinter, A., Moraes-Filho, J., Martins, T.F., Nardi, M.S., et al., 2009. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. *Rev.Soc.Bras.Med.Trop.* 42, 351–353.
- Paddock, C. D.; Fournier, P. E.; Sumner, J. W.; Goddard, J.; Elshenawy, Y.; Metcalfe, M. G.; Loftis, A. D.; Varela-Stokes, A., 2010. Isolation of *Rickettsia parkeri* and identification of a novel spotted fever group *Rickettsia* sp. from Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) in the United States. *Appl Envir. Microbiol.*, v 76, p. 2689-2696.
- Paiva-Neto, M.A., 2004. Circular técnica 34, agosto 2004, Embrapa
- Parreira, R.; Piedade, J.; Esteves, A., 2012. Vírus transmitidos por mosquitos. *Anais... Instituto de Higiene e Medicina Tropical*, v.11, p. 66-67.
- Pinter, A., Labruna, M.B., 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia felis* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 1078, 523–530.
- Pfeffer, M.; Dobler, G., 2010. Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasites & Vectors*, v.3, n.35.
- Queirogas VLD, Oliveira LMD, Marques RL et al. 2010. Carrapatos (Acari: Ixodidae) em cães domésticos no Parque Estadual Serra de Caldas Novas, Goiás: considerações epidemiológicas. *Biota Neotrópica*, 10 (1): 347-349.
- Randolph S. E., 2011. Transmission of tick-borne pathogens between co-feeding ticks: Milan Labuda's enduring paradigm. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2, 179–182.
- Romano-Lieber, N. S.; Iversson, L. B., 2000. Inquérito soropidemiológico para pesquisa de infecções por arbovírus em moradores de reserva ecológica. *Revista de Saúde Pública*, v. 34, n.3, p.236-42.

Sabatini, G.S., Pinter, A., Nieri-Bastos, et al., 2010. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their *Rickettsia* in an Atlantic rainforest reserve in the State of São Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 47(5): 913-916.

Sano SM, Almeida SD. 1998. Cerrado: environment and flora. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), Centro de Pesquisa Agropecuária dos Cerrados

Silva, N., Eremeeva, M.E., Rozental, T., Ribeiro, G.S., Paddock, C.D., Ramos, E.A.G., et al., 2011. Eschar-associated spotted fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 275–278.

Souza, C.E., Pinter, A., Donalisio, M.R., 2015. Risk factors associated with the transmission of Brazilian spotted fever in the Piracicaba river basin, State of São Paulo, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Uberaba, v. 48, n. 1, p. 11-17.

Spolidorio, M.G.; Labruna, M.B.; Mantovani, E.; Brandão, P.; Richtzenhain, L.J., Yoshinari, N.H., 2010. Novel spotted fever group rickettsioses, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3): 521-523.

Süss, J., 2008. Tick-borne encephalitis in Europe and beyond – the epidemiological situation as of 2007. *Euro Surveill* 13, 18916.

Szabó, M.P.J.; Mukai, L.S.; Rosa, P.C.S.; Bechara, G.H., 1995. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science*, v. 2, p 43-50.

Szabó MPJ, Cunha TM, Pinter A et al. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 25 (10-11): 909-916.

Szabó, M.P.J.; Labruna, M.B.; Castagnolli, K.C.; Garcia, M.V.; Pinter, A.; Veronez, V.A.; Magalhães, G.M.; Castro, M.B.; Vogliotti, A., 2006. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil: notes on host suitability. *Experimental and Applied Acarology*, v.39, n. 3-4, p. 338-346.

Szabó, M.P., Olegário, M.M., Santos, A.L.Q., 2007. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Experimental and Applied Acarology*, Netherlands v.43, p.73-84.

Szabó, M. P. J., Labruna, M. B., Garcia, M. V., Pinter, A., Castagnolli, K. C., Pacheco, R. C., et al., 2009. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 103, 57–72.

Szabó, M.P.J., Labruna, M.B., Garcia, M.V., Pinter, A., Castagnolli, K.C., Pacheco, R.C., Castro, M.B., Veronez, V.A., Magalhães, G.M., Vogliotti, A.; Duarte, J.M.B., 2009a. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 103:57-72.

Szabó, M.P.J.; Pinter, A.; and Labruna, M.B., 2013a. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:27.

Szabó, M.P.J.; Nieri-Bastos, F. A.; Spolidorio, M. G.; Martins, T.F.; Barbieri, A.M.; Labruna, M. B., 2013b. 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*, 140.

Terrassini, F.A.; Camargo, L.M.A.; Labruna, M.B., 2006. Diversidade, taxonomia e manejo de ácaros neotropicais. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, 1, 2006, Viçosa. Anais...Viçosa, 2006. p. 144.

Turell MJ., 2015. Experimental transmission of karshi (mammalian tick-borne Flavivirus group) virus by ornithodoros ticks >2,900 days after initial virus exposure supports the role of soft ticks as a long-term maintenance mechanism for certain flaviviruses. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(8).

Venzal, J. M., Nava, S., Terrassini, F. A., Ogrzewalska, M., Camargo, L. M. A., Labruna, M. B., 2013. *Exp. and App. Acarol.*, v 61, p. 131-141.

Venzal, J. M.; González-Acunã, D.; Muñoz-Leal, S.; Mangold, A. J.; Nava, S., 2015. Two new species of *Ornithodoros* (Ixodida; Argasidae) from the Southern Cone of South America. *Exp. and App. Acarol.*, v 66, p. 127-139.

Veronez, V.A.; Freitas, B.Z.; Olegário, M.M.M. Carvalho, W.M.; Pascoli, G.V.T.; Thorga, K.; Garcia, M.V.; Szabó, M.P.J., 2010. Ticks (acari: ixodidae) within various phytophysionomies of a cerrado reserve in Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 50(2): 169-179.