



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

Maíra Freitas Guimarães

**LEVANTAMENTO DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp. E
Coxiella burnetii EM MAMÍFEROS SILVESTRES E
PEQUENOS RUMINANTES NA REGIÃO DO PARQUE
NACIONAL DA SERRA DAS CONFUSÕES, PIAUÍ**

Petrolina, PE
2014

MAÍRA FREITAS GUIMARÃES

**LEVANTAMENTO DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp. E
Coxiella burnetii EM MAMÍFEROS SILVESTRES E
PEQUENOS RUMINANTES NA REGIÃO DO PARQUE
NACIONAL DA SERRA DAS CONFUSÕES, PIAUÍ**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Mauricio Claudio Horta

Petrolina, PE
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

FOLHA DE APROVAÇÃO

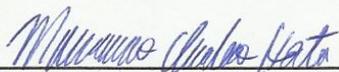
Maíra Freitas Guimarães

LEVANTAMENTO DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp. E *Coxiella burnetii* EM MAMÍFEROS SILVESTRES E PEQUENOS RUMINANTES NA REGIÃO DO PARQUE NACIONAL DA SERRA DAS CONFUSÕES, PIAUÍ

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Aprovado em: 05 de Dezembro de 2014.

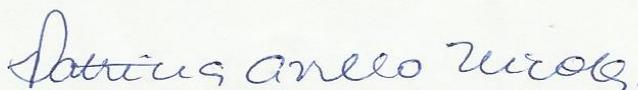
Banca examinadora



Prof. Dr. Mauricio Claudio Horta, UNIVASF
Orientador



Dr. Marcelo Bahia Labruna, USP
Examinador externo



Profª. Dra. Patrícia Avello Nicola Pereira, UNIVASF
Examinador externo

Mais uma vez me pergunto, por que quis trilhar esse caminho?
Caminho esse cheio de obstáculos, de incertezas.
O tempo foi passando, passando...que nem me dei conta.
Hoje minhas dúvidas não diminuíram,
Mas passei a ter algumas certezas.
A primeira delas: coragem!
Coragem para acreditar em mim mesma.
Coragem de enfrentar os medos.
Coragem de existir e fazer algo diferente.

Dedico esse trabalho a todas aquelas pessoas que ao meu lado foram cúmplices
nessa busca, especialmente a minha família que é o meu alicerce, o meu
verdadeiro reflexo de felicidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo que sou, por estar sempre ao meu lado em todos os momentos da minha vida, porque sei que sem ele não há esperança, não há paz, não há amor, tudo seria insignificante.

Aos meus pais, João e Bebeta, pelo amor e dedicação com que me criaram e educaram, pessoas as quais me espelho no caráter, simplicidade, alegria, com quem aprendi os primeiros passos e projetei meus primeiros sonhos.

Aos meus grandes amores, Uirá e Maria Rita, muito obrigada por existirem, pela compreensão, confiança, amor, dedicação, me sinto honrada de tê-los na minha vida. A vocês todo o meu amor.

Ao meu tio Wellington e minha querida Perpetinha, por todo o apoio que me foi dado durante esse tempo, muito obrigada por tudo, sem vocês seria muito mais difícil.

Às minhas irmãs, Vi e Jú, pelo carinho, por tudo de especial que construímos juntas e por entenderem minha ausência em alguns momentos.

Aos meus amados sobrinhos, Lucas, Júlia e João, por trazerem tanta alegria para nossa família.

À minha querida amiga Jú, por estarmos sempre juntas, mesmo distantes, por ser sempre um porto, a quem recorro em todos os momentos, agradeço por sua amizade, lealdade e confiança.

À minha Dolinha que tanto amo, estive muito ausente durante este tempo, mas ela iluminou muito os meus dias com seu amor puro e incondicional.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Mauricio Claudio Horta, por todo incentivo, conselhos, ensinamentos, por me encorajar em muitos momentos. Aprendi muito, e você foi com certeza peça fundamental. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna e toda sua equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), em especial ao Jonas, Andréa, Francisco e Tiago, pessoas incríveis que me acolheram e me ensinaram bastante durante todo o tempo em que estive em São Paulo.

Ao Jovem pesquisador da USP, Arlei Marcili, que me ensinou muito na primeira coleta de campo que fizemos. Ensinações estas que foram muito importantes para o andamento da pesquisa.

Aos guias do PNSC, que nos ajudaram durante as coletas, especialmente ao Agnaldo pela colaboração e solidariedade em vários momentos do trabalho.

Ao Instituto Chico Mendes (ICMBio), na pessoa do Sr. José Wilmington Ribeiro, pela colaboração ao nosso trabalho, desde a autorização para as atividades no Parque até o fornecimento de dados da área estudada.

Aos professores do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), pelos ensinamentos prestados.

Ao professor Dr. João José e a professora Dra. Jane Eyre Gabriel, pela dedicação e ensinamentos referentes às análises moleculares.

Aos funcionários do campus de Ciências Agrárias da UNIVASF, pela assistência, e em especial à Rosinha, pela doçura, profissionalismo e amizade.

Às minhas amigas do mestrado Isabela, Jennifer e Fernanda, pela amizade que nasceu nesses dois anos, pelos momentos em que estivemos juntas e que foram maravilhosos.

Aos companheiros do “Núcleo de Estudos em Zoonoses do Vale do São Francisco” (NEZOON), com quem convivi e aprendi bastante: Prof. Mauricio, Grace, Anne,

Andreina, Mariana, Ana Isabel, Lais, Elaine, Dália, Davi, Glauber, Denyse, Eline, Larissa, Thalita, Nara, Anna Maria, Kelly, Naylla, Ivo e Josenilton.

Ao grupo da Serra das Confusões, por todo apoio durante os trabalhos de campo, pelo aprendizado, parceria, brincadeiras. Enfim, nem tudo foi tão fácil, mas foi tudo muito bom, foram momentos inesquecíveis e sentirei saudades: Andreina, Dália, Davi e Nara.

As minhas queridas amigas Andreina, Anne e Grace, que foram muito importantes durante esta trajetória, que me deram suporte e me acolheram com carinho, pessoas que jamais esquecerei. Em especial à Andreina pela amizade que construímos e momentos que compartilhamos, agradeço por segurar a minha mão quando eu não queria voar, e voei, e cheguei aqui, serei sempre grata.

A Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), pela oportunidade de realizar mais uma meta em minha vida, instituição que me acolheu e pela qual tenho inteira confiança.

A CAPES, pela concessão da bolsa e pelo financiamento deste projeto.

Aos animais utilizados na pesquisa, seres puros, minha gratidão mais sublime.

E a todos aqueles que de alguma forma tornaram essa realização possível, o meu muito obrigada!

RESUMO

As enfermidades causadas por bactérias dos gêneros *Rickettsia* e *Coxiella* são transmitidas por artrópodes hematófagos, na sua maioria carrapatos, que atuam diretamente na transmissão de doenças com grande impacto na medicina veterinária e humana. O presente estudo objetivou realizar um levantamento da infecção por *Rickettsia* spp. e *Coxiella burnetii* em mamíferos silvestres e pequenos ruminantes na região do Parque Nacional da Serra das Confusões (PNSC), localizado no estado do Piauí, região nordeste do Brasil. Amostras de soro de 73 pequenos mamíferos silvestres (63 roedores e 10 marsupiais) e 355 pequenos ruminantes (202 caprinos e 153 ovinos) foram testadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e anti-*Coxiella burnetii*, sendo consideradas positivas quando apresentaram títulos ≥ 64 . Carrapatos em fase de parasitismo e de vida livre foram coletados e identificados. Para a detecção de DNA de *Rickettsia* spp. e *C. burnetii*, amostras de sangue dos animais silvestres e de carrapatos foram submetidas à Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR), utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos genes *gltA*, *ompA* (*Rickettsia* spp.) e *CAP* (*C. burnetii*). Amostras de carrapatos positivas na PCR foram submetidas ao sequenciamento de DNA e as sequências obtidas foram comparadas com as sequências disponíveis no GenBank a partir do aplicativo BLASTn. Das 73 amostras de soro de mamíferos silvestres, 8,2% (6) foram reagentes para *R. rickettsii*, com títulos variando de 64 a 128, sendo estas pertencentes aos roedores das espécies *Thrichomys apereoides*, *Galea spixii* e *Rhipidomys macrurus*, não sendo observada soropositividade nos marsupiais. Nenhum pequeno mamífero silvestre mostrou-se soropositivo para *C. burnetii*. Das 355 amostras de soro de pequenos ruminantes todas foram soronegativas para *R. rickettsii*. Foi verificada soropositividade em 2% (3/153) das amostras de ovinos para *C. burnetii*, com títulos variando de 64 a 4.096. As amostras de caprinos foram soronegativas para o referido antígeno. No total, foram coletados 297 carrapatos, sendo identificadas as espécies *Amblyomma* sp. (12), *Amblyomma auricularium* (70), *Amblyomma parvum* (18), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (56), *Rhipicephalus sanguineus* (15) e *Ornithodoros* sp. (126). Dos 101 carrapatos avaliados pela PCR, 27,7% (28) foram positivos para gene *gltA* e destes 50% (14) positivos para o gene *ompA*. Pela análise do padrão de identidade realizada a partir do sequenciamento, verificou-se a circulação de quatro espécies de riquetsias: *R. amblyommii*, *R. bellii*, *Candidatus R. andeanae* e *R. parkeri*. Estes resultados confirmam de forma inédita a circulação de agentes riquetsiais em animais silvestres e carrapatos na região estudada; relata a ocorrência sorológica de *C. burnetii* em ovinos e a infecção de carrapatos argasídeos por *Rickettsia* spp. pela primeira vez na América do Sul.

Palavras-chave: Febre Maculosa, Febre Q, roedores, marsupiais, caprinos, ovinos.

ABSTRACT

The diseases caused by bacteria from the genera *Rickettsia* and *Coxiella* are transmitted by haematophagous arthropods, mostly by ticks, which act directly on the transmission of diseases with major impact on veterinary and human medicine. The present study aimed to survey the infection of *Rickettsia* spp. and *Coxiella burnetii* in wild mammals and small ruminants in the National Park of Serra das Confusões (NPSC), located in the state of Piauí, Northeast of Brazil. Serum samples from 73 wild mammals (63 rodents and 10 marsupials) and 355 from small ruminants (202 sheep and 153 goats) were tested by Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) for the detection of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *C. burnetii*. The samples were considered positive when they showed titers ≥ 64 . Ticks in parasitic and free living stages were collected and identified. For the detection of DNA of *Rickettsia* spp. and *C. burnetii*, blood samples and ticks from wild animals were submitted to the Polymerase Chain Reaction (PCR) using specific oligonucleotide primers for the amplification of the *gltA*, *ompA* (*Rickettsia* spp.) and *CAP* (*C. burnetii*) genes. Positive samples from ticks were subjected to DNA sequencing, and the sequences obtained were compared to the sequences available in the GenBank from the BLASTn application. Of the 73 serum samples of wild mammals, 8.2% were positive for *R. rickettsii*, with titers ranging from 64 to 128, encompassing the *Thrichomys apereoides*, *Galea spixii* and *Rhipidomys* sp rodent species. On the other hand, no seropositivity was observed in marsupials; the small wild animals didn't show seropositivity for *C. burnetii*. All the 355 serum samples from small ruminants were seronegative for *R. rickettsii*. Seropositivity was verified in 2% (3/153) of the samples of sheep for *C. burnetii*, with titers ranging from 64 to 4096. The serum samples obtained from goats were seronegative to the above antigens. In total, 297 ticks were collected, and the following species were identified: *Amblyomma* sp (12), *Amblyomma auricularium* (70), *Amblyomma parvum* (18), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (56), *Rhipicephalus sanguineus* (15) and *Ornithodoros* sp. (126). Of the 101 ticks evaluated by PCR, 27.7% were positive for the *gltA* gene, from which 50% of those were positive for the *ompA* gene. From the analysis of pattern of identity held by sequencing, it was verified the circulation of three four rickettsial species: *R. amblyommii*, *R. bellii*, *Candidatus R. andeanae* and *R. parkeri*. These results confirm in an unprecedented manner, rickettsial agents circulating in ticks and wild animals in the study area; report the serological occurrence of *C. burnetii* in sheep and the infection of argasid ticks for *Rickettsia* spp. for the first time in South America.

Keywords: Spotted Fever, Q Fever, rodents, marsupials, goats, sheep.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Localização do Parque Nacional da Serra das Confusões, Piauí.....	38
FIGURA 2 - Áreas ambientais do PNSC selecionadas para captura de mamíferos silvestres. A - Japecanga, B - Muquém, C - Andorinha, D - Serra, E - Canto Verde, F - Sucumbido e G - Cajugaia. PNSC/Piauí, 2013.....	39
FIGURA 3 - Propriedades rurais no entorno do PNSC e presença de rebanhos caprinos e ovinos, Piauí 2013. A - Propriedade rural em Engenho Novo, B - Propriedade rural em Novo Araçá, C - Rebanho de caprinos e ovinos de uma propriedade rural em Canto Verde, D - Rebanho caprino e ovino em uma propriedade rural em Japecanga.....	39
FIGURA 4 - Número de animais silvestres capturados nas áreas ambientais do PNSC, Piauí, 2013.....	49
FIGURA 5 - Animais capturados por busca ativa. A - <i>Tolypeutes tricinctus</i> (Tatu bola); B - <i>Tamandua tetradactyla</i> (Tamanduá mirim). PNSC/PI, 2013.....	51
FIGURA 6 - Roedores capturados. A - <i>Thrichomys apereoides</i> (Punaré); B - <i>Galea spixii</i> (Preá); C - <i>Kerodon rupestris</i> (Mocó); D - <i>Rhipidomys macrurus</i> . PNSC/PI, 2013.....	51
FIGURA 7 - Marsupiais capturados. A - <i>Monodelphis domestica</i> (Cuíca do rabo curto); B - <i>Gracilinanus agilis</i> (Cuíca graciosa). PNSC/PI, 2013.....	52
FIGURA 8 - Amostras positivas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A - Soro de roedor silvestre reagente ao antígeno de <i>R. rickettsii</i> ; B - Soro de ovino reagente ao antígeno de <i>Coxiella burnetii</i>	58
FIGURA 9 - Localização das áreas ambientais positivas para <i>R. rickettsii</i> e das localidades rurais positivas para <i>C. burnetii</i> . PNSC, Piauí, 2013.....	59

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - Casos de febre maculosa confirmados no Brasil entre os anos de 2008 a 2012 (Ministério da Saúde - Adaptado SINAN, 2014).....	26
QUADRO 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações para identificação genotípica de <i>Rickettsia</i> spp. e <i>Coxiella burnetii</i>	45
QUADRO 3 - Concentração dos reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) segundo os genes avaliados.....	46
QUADRO 4 - Condições de amplificação das diferentes reações conforme os genes avaliados.....	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Ocorrência de pequenos mamíferos silvestres no Parque Nacional da Serra das Confusões, Piauí, 2013.....	50
TABELA 2 - Número de pequenos ruminantes amostrados em localidades adjacentes ao PNSC, Piauí, 2013.....	52
TABELA 3 - Faixa etária e ocorrência de caprinos e ovinos amostrados no PNSC, Piauí, 2013.....	53
TABELA 4 - Espécies de carrapatos identificadas em hospedeiros silvestres, domésticos, humanos e vida livre na região do PNSC, Piauí, 2013.....	54
TABELA 5 - Presença de carrapatos em fase parasitária em mamíferos silvestres capturados no PNSC, Piauí, 2013.....	55
TABELA 6 - Percentual de soropositividade de mamíferos silvestres e pequenos ruminantes frente à <i>Rickettsia rickettsii</i> e <i>Coxiella burnetii</i> através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), PNSC, Piauí, 2013.....	56
TABELA 7 - Títulos finais de reatividade apresentados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos brutos de <i>Rickettsia</i> spp. em soros de mamíferos silvestres no PNSC, Piauí, 2013.....	57
TABELA 8 - Títulos finais de reatividade apresentados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos de <i>Coxiella burnetii</i> em soros de ovinos em localidades rurais no entorno do PNSC, Piauí, 2013.....	57
TABELA 9 - Número e percentual total de carrapatos positivos na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para os genes pesquisados.....	61
TABELA 10 - Sequenciamento de produtos de PCR positivas de acordo com o vetor e animal de origem.....	62
TABELA 11 - Grau de identidade calculado para cada sequência de nucleotídeos entre as sequências avaliadas e as sequências de <i>Rickettsia</i> spp. disponíveis no GenBank, 2014.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAP	Capsular Polysaccharide Biosynthesis Protein
DNA	Deoxyribonucleic Acid - Ácido Desoxirribonucléico
Dntp	Nucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido EtilenodiaminoTetra-Acético
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
et al.	e colaboradores
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanate</i> - Isotiocianato de Fluoresceína
FM	Febre Maculosa
FMB	Febre Maculosa Brasileira
GA	Grupo Ancestral
GFM	Grupo da Febre Maculosa
GT	Grupo do Tifo
GTr	Grupo de Transição
<i>gltA</i>	Citrato cintase
ICMBio	Instituto Chico Mendes para Conservação da Biodiversidade
IgG	Imunoglobulina G
MgCL ₂	Cloreto de magnésio
min	Minuto
<i>OmpA</i>	<i>Outher Membrane Protein A</i> - Proteína Externa de Membrana A
PB	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> - Reação em Cadeia pela Polimerase
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotações por minuto
seg	Segundos
sp.	Espécie
spp.	Espécies
Taq	Enzima termoestável da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TE	Tampão Tris/EDTA
VL	Vida livre

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
X	Vezes
Kg	Quilograma
mM	MiliMol
mg	Miligrama
mL	Militros
mm	Milímetro
nº	Número
V	Volts
µL	Microlitro
µm	Micrometro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 AS RELAÇÕES AMBIENTAIS NA DINÂMICA DAS DOENÇAS VETORIAIS.....	19
2.2 SANIDADE ANIMAL.....	20
2.2.1 Animais silvestres.....	20
2.2.2 Pequenos ruminantes.....	20
2.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS.....	22
2.4 <i>Rickettsia</i> spp.....	23
2.4.1 Histórico.....	23
2.4.2 Taxonomia.....	23
2.4.3 Etiologia.....	24
2.4.4 Epidemiologia.....	24
2.4.5 Sintomatologia clínica.....	28
2.4.6 Diagnóstico.....	29
2.4.6.1 Diagnóstico indireto.....	29
2.4.6.2 Diagnóstico direto.....	29
2.5 <i>Coxiella burnetii</i>	30
2.5.1 Histórico.....	30
2.5.2 Taxonomia.....	31
2.5.3 Etiologia.....	31
2.5.4 Epidemiologia.....	32
2.5.5 Sintomatologia clínica.....	33
2.5.6 Diagnóstico.....	35
2.5.6.1 Diagnóstico indireto.....	35
2.5.6.2 Diagnóstico direto.....	35
3. OBJETIVOS.....	36
3.1 GERAL.....	36
3.2 ESPECÍFICOS.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
4.1 ÁREA DE ESTUDO.....	37
4.2 CAPTURA DE ANIMAIS SILVESTRES.....	40

4.3 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SANGUE.....	40
4.3.1 Mamíferos silvestres.....	40
4.3.2 Pequenos ruminantes.....	41
4.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS.....	42
4.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	42
4.6 EXTRAÇÃO DE DNA.....	43
4.6.1 Sangue.....	43
4.6.2 Carrapatos.....	44
4.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	44
4.7.1 <i>Rickettsia</i> spp.....	44
4.7.2 <i>Coxiella burnetii</i>	45
4.7.3 Análises dos produtos amplificados.....	47
4.8 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	47
5 RESULTADOS.....	49
5.1 MAMÍFEROS SILVESTRES CAPTURADOS.....	49
5.2 AMOSTRAGEM DE PEQUENOS RUMINANTES.....	52
5.3 OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS.....	53
5.4 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI).....	56
5.5 GEORREFERENCIAMENTO DA INFECÇÃO POR <i>R. rickettsii</i> E <i>C. burnetii</i>	58
5.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR).....	60
5.6.1 Sangue.....	60
5.6.2 Carrapatos.....	60
5.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	61
6 DISCUSSÃO.....	64
7 CONCLUSÃO.....	75
8 REFERÊNCIAS.....	77

1 INTRODUÇÃO

As áreas de mata preservada possuem grande potencial para estudos relacionados ao conhecimento da biodiversidade e das inter-relações existentes entre animais, patógenos, vetores e ambiente. O ambiente e suas populações estão intimamente ligados e interagem na constante busca do equilíbrio ecológico. Nesse contexto, a coexistência entre patógenos, vetores e hospedeiros constitui um elo indissolúvel na manutenção do ciclo epidemiológico de algumas doenças.

Os animais que vivem nessas áreas são fontes importantes para elucidação da epidemiologia de enfermidades que acometem diferentes hospedeiros, principalmente aquelas que representam risco à saúde humana. A sanidade da população de animais silvestres constitui um indicativo da qualidade ambiental e de como essa população convive e mantém-se ao mesmo tempo com a presença de agentes patogênicos. Esses animais são, muitas vezes, reservatórios de doenças que podem acometer animais domésticos e o homem. Tanto as espécies de animais silvestres, como as espécies domésticas, podem ser portadoras de doenças zoonóticas ou de grande impacto em sistemas de produção animal, sendo assim de grande relevância o estudo de ambientes preservados e suas áreas adjacentes para compreender a dinâmica da transmissão de determinadas doenças vetoriais.

A epidemiologia de doenças transmitidas por vetores biológicos tem se comportado diferentemente em regiões geográficas diversas, contribuindo para emergência e reemergência de algumas enfermidades, que surgem como consequência das intensas alterações do ambiente, bem como pela alta capacidade de adaptação desses vetores. Estas doenças podem surgir de forma epidêmica, causando alta morbidade e/ou mortalidade ou de forma endêmica ficando restritas a áreas específicas.

As doenças causadas por bactérias dos gêneros *Rickettsia* e *Coxiella* são encontradas em várias partes do mundo, podendo infectar uma variedade de hospedeiros vertebrados, sendo transmitidas por artrópodes hematófagos, principalmente pelos carrapatos. Os animais domésticos e silvestres estão frequentemente expostos a diferentes espécies de carrapatos, dependendo da distribuição destes artrópodes no ambiente. Sabe-se que nas adjacências de áreas

preservadas existem populações de animais domesticados e populações humanas, e que essa proximidade, muitas vezes, favorece a sobreposição dos ciclos silvestre e doméstico de algumas doenças. Assim, animais de produção criados na proximidade de ecossistemas preservados podem compartilhar ectoparasitas com animais silvestres, permitindo a circulação e disseminação dessas bactérias para ambientes antrópicos. Desta forma, os pequenos ruminantes podem ser parasitados por estes vetores, ocasionando o aparecimento de manifestações clínicas, que podem causar a redução do desempenho produtivo dos rebanhos e conseqüentemente gerar perdas econômicas significativas, sejam elas pelo efeito direto do parasitismo ou como conseqüência da patogenia da doença.

Visando a sustentabilidade do setor pecuário e conseqüentemente um maior aproveitamento econômico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos é indispensável minimizar os efeitos de doenças que podem acometer os animais de produção. Nesse contexto, a sanidade animal exerce um papel fundamental, pois a presença de enfermidades nos rebanhos pode comprometer a lucratividade ou até mesmo inviabilizar essas atividades.

O estudo sorológico e o emprego de técnicas moleculares na detecção de bactérias veiculadas por carrapatos são imprescindíveis para o conhecimento sobre o ciclo epidemiológico dessas doenças em animais silvestres e domésticos. Dados sobre a ocorrência de ectoparasitismo e doenças veiculadas por carrapatos, especialmente as causadas por bactérias dos gêneros *Rickettsia* e *Coxiella*, nas espécies caprina e ovina são escassos e muito ainda há de ser esclarecido sobre a epidemiologia dessas enfermidades em animais de produção. Também se torna importante conhecer o perfil silvestre de ambas as infecções em áreas ambientalmente preservadas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 AS RELACÕES AMBIENTAIS NA DINÂMICA DAS DOENÇAS VETORIAIS

Os intensos processos de degradação ambiental dos biomas brasileiros têm gerado desequilíbrios ecológicos, os quais favorecem o surgimento de novas doenças e a disseminação de outras já existentes (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2000). De fato, o aparecimento de doenças emergentes e reemergentes tem se tornado causa de preocupação em todo mundo (WHO, 2014). As relações existentes entre patógenos, hospedeiros e vetores são extremamente dinâmicas e estão constantemente sujeitas às pressões ambientais, tendendo ao equilíbrio ecológico, entretanto, a ação antrópica pode interferir neste processo (PATZ et al., 2004).

As intervenções humanas no ambiente contribuem para o deslocamento de vetores ou de agentes etiológicos do meio silvestre para populações assentadas em áreas próximas, facilitando a disseminação de agentes infecciosos e parasitários para novos hospedeiros e ambientes (CARVALHO et al., 2009). Já em 2001, Shaw et al. (2001) constatavam a expansão zoogeográfica de artrópodes e das infecções transmitidas por eles, como decorrência de mudanças climáticas e da maior acessibilidade a certos nichos ambientais.

A preservação de nichos naturais, por meio da criação de áreas de conservação, tem aproximado o homem do ecossistema silvestre, muitas vezes sem considerar as relações patógeno-vetor-hospedeiro e nem o fato de que o encontro de nichos ecológicos distintos pode favorecer a difusão de vetores e patógenos entre populações de animais domésticos, silvestres e o homem. Szabó et al. (2003) demonstraram que a introdução de carrapatos de animais domésticos e das doenças transmitidas por estes em áreas preservadas geram impactos em nichos naturais, modificando o comportamento desses vetores.

Segundo Silva (2005), os estudos dessas interações, analisadas individualmente ou coletivamente, podem servir como modelos importantes para o entendimento do processo saúde-doença em estudos ecológicos, biológicos e epidemiológicos.

2.2 SANIDADE ANIMAL

2.2.1 Animais silvestres

Os animais silvestres, sejam de vida livre ou de cativeiro, podem ser portadores e/ou reservatórios de doenças de potencial relevância na medicina veterinária, na saúde pública, na economia e na biologia da conservação (ACHA; SZYFRES, 2003). Essas doenças podem ser de origem viral, bacteriana ou parasitária, e a sua ocorrência pode gerar impactos para população e biodiversidade local. Embora os animais de vida livre possam apresentar sintomatologia clínica, as formas de infecção subclínica são mais frequentes, representando maiores riscos à saúde humana e a outros animais, o que dificulta o controle dessas enfermidades (BARBOSA; MARTINS; MAGALHÃES, 2011).

O estudo epidemiológico das doenças que acometem os animais silvestres é imprescindível para o conhecimento dos focos naturais, pois permite avaliar quais são os fatores de risco associados e como elas se comportam no ambiente primário (MARVULO, 2006). A sanidade dessa população animal revela a vulnerabilidade do ambiente frente ao processo de disseminação de agentes patogênicos (CARVALHO et al., 2009).

Poucos são os estudos realizados sobre aspectos patológicos relacionados às doenças em animais silvestres de vida livre, devido à dificuldade de acesso a essa população animal, aos reduzidos indicadores clínicos e as barreiras de controle sanitário (ACHA; SZYFRES, 2003).

2.2.2 Pequenos ruminantes

Na região semiárida do nordeste brasileiro os pequenos ruminantes possuem grande importância, seja econômica ou social (ALENCAR et al., 2010). Uma grande parte dos sistemas de criação desses animais não são tecnificados e utilizam práticas de exploração pecuária resultantes de programas da agricultura familiar (COUTINHO et al., 2013). Nestes casos, os animais são criados extensivamente, o tamanho dos rebanhos é reduzido, geralmente misto, destinado à

produção de carne e leite, principalmente para consumo próprio e/ou como fonte alternativa de renda (AGUIAR, 2007).

O desenvolvimento deste segmento pecuário é limitado por inúmeros fatores, entre eles a alta incidência de doenças. De acordo com Borges (2000), as espécies caprina e ovina são suscetíveis a uma série de enfermidades que podem interferir na produtividade dos animais e oferecer riscos à saúde pública. A ocorrência ou não dessas doenças está intimamente condicionada, entre outros fatores, à relação dos animais com o ambiente onde estão inseridos e conseqüentemente ao sistema de produção adotado (EMBRAPA, 2014). Os pequenos ruminantes criados de forma extensiva têm acesso às áreas de mata e ao peridomicílio humano, situação que pode favorecer a disseminação de agentes infecciosos, parasitas e vírus. Segundo Aguiar (2007), cada animal doente representa não apenas prejuízos econômicos decorrentes das perdas de produtividade, mas também significa risco para saúde de outros animais do rebanho e para humanos, quando se trata de doenças zoonóticas.

Dentre as doenças que acometem essas espécies animais, destacam-se as parasitárias e infecciosas, acarretando baixa produtividade dos rebanhos e índices zootécnicos insatisfatórios, impedindo o desenvolvimento da caprino e ovinocultura em determinadas regiões do semiárido brasileiro (FONSECA; FERREIRA; AHID, 2009). As ectoparasitoses, por exemplo, são responsáveis por perdas econômicas significativas na produção de pequenos ruminantes (SUASSUNA-BEZERRA et al., 2010). Esses prejuízos estão relacionados não somente as doenças transmitidas, mas também aos efeitos diretos da ação dos ectoparasitas, que exercem atividade espoliativa, causando irritações e estresses aos animais, ocasionando conseqüentemente déficit de desenvolvimento, perda de massa corporal e baixa produtividade (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; FONSECA, FERREIRA; AHID, 2009).

A sanidade desses animais é importante para promover uma produção animal adequada, baseada na capacidade zootécnica dos animais, bem como garantir a segurança alimentar dos produtos resultantes da atividade (AGUIAR, 2007).

2.3 DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS

Os carrapatos são artrópodes pertencentes à classe Arachnida, subordem Ixodida e estão divididos em três famílias: Ixodidae (“carrapatos duros”, devido à presença de escudo dorsal), Argasidae (“carrapatos moles”, pois não possuem escudo dorsal) e Nuttalliellidae (com características intermediárias entre as duas primeiras e restrita ao continente Africano) (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

Desde que foi comprovada a capacidade destes de transmitirem doenças ao homem, diversas pesquisas foram realizadas visando conhecer seu papel como vetores de diferentes patógenos (PACHECO, 2008). O reconhecimento desses artrópodes como transmissores de doenças vem desde o século XIX. Em 1886, Theobald Smith descreveu a “Texas Cattle Fever”, atualmente conhecida como babesiose bovina (BABES, 1888; SMITH; KILBOURNE, 1893). Os carrapatos constituem o segundo grupo de importância como vetores de doenças infecciosas para humanos, sendo os principais vetores para animais (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

As doenças transmitidas por carrapatos são um problema crescente em todo o mundo, representando uma séria ameaça para saúde da população humana e animal (AL-ADHAMI et al., 2011). Dentre as doenças que possuem os carrapatos como vetores biológicos destacam-se a Febre Maculosa, Febre Q, Doença de Lyme, Erliquiose, Babesiose e Anaplasmose (PIESMAN; EISEN, 2008).

A patogenia de doenças bacterianas transmitidas por carrapatos difere consideravelmente com relação às células alvo, genomas bacterianos, estrutura da parede celular, inter-relações bactéria-hospedeiro, incluindo as respostas imunológicas estimuladas durante a infecção, mecanismos patogênicos e lesões patológicas (OGATA et al., 2001).

2.4 *Rickettsia* spp.

2.4.1 Histórico

O gênero *Rickettsia* é formado por diferentes espécies de bactérias, dentre elas os agentes etiológicos de doenças exantemáticas agudas transmitidas, em sua maioria, por carrapatos e mundialmente conhecidas de febre maculosa (PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2005).

O primeiro relato de febre maculosa foi descrito por Edward Maxey em 1899, em uma região montanhosa dos Estados Unidos (EUA), sendo conhecida como febre maculosa das montanhas rochosas (*Rocky Mountain Spotted Fever – RMSF*) (HARDEN, 1990). Anos mais tarde, Howard Ricketts isolou o agente etiológico, a bactéria *Rickettsia rickettsii* (RICKETTS, 1909), sendo assim denominada em homenagem ao pesquisador. Ricketts também relatou a importância do carrapato na transmissão da doença. Curiosamente, durante pesquisas realizadas no México o pesquisador foi infectado pela espécie *R. prowazekii*, o que acabou culminando com sua morte (HARDEN, 1990).

A doença foi relatada pela primeira vez no Brasil em 1929 por José Toledo Piza (PIZA; MEYER; GOMES, 1932), sendo descrita inicialmente em humanos, e atualmente é considerada reemergente no país, devido ao aumento do número de casos nos últimos anos e de notificações aos órgãos públicos (GRECA; LANGONI; SOUZA, 2008; LABRUNA et al., 2011; BRASIL, 2014a).

2.4.2 Taxonomia

O gênero *Rickettsia* pertencente ao filo Proteobactérias, a classe Alphaproteobactérias, a ordem Rickettsiales e a família Rickettsiaceae (RENVOISÉ; MEDIANNIKOV; RAOULT, 2009). Ao longo dos anos as riquetsias têm sofrido várias reorganizações taxonômicas. De acordo com a última revisão feita à taxonomia do grupo a ordem Rickettsiales contempla a família Anaplasmataceae e a família Rickettsiaceae, e esta última inclui os gêneros *Rickettsia* e *Orientia* (DUMLER et al., 2001).

2.4.3 Etiologia

As riquetsias são bactérias Gram negativas, intracelulares obrigatórias, com pleomorfismo cocobacilar e apresentam divisão binária nas células endoteliais de seus hospedeiros (RENVOISÉ; MEDIANNIKOV; RAOULT, 2009). Elas são consideradas um grupo diferenciado de bactérias que possuem como característica comum entre si o fato de serem transmitidas por artrópodes hematófagos (PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2009).

As espécies pertencentes ao gênero *Rickettsia* diferem bastante em relação ao vetor, distribuição geográfica e virulência (AZAD; BEARD, 1998). Este é composto por quatro grupos principais: o Grupo do Tifo (GT), que inclui as espécies *Rickettsia prowazekii* (agente etiológico do tifo epidêmico) e a *Rickettsia typhi* (agente etiológico do tifo endêmico ou tifo murino), que possuem como vetores piolhos e pulgas, respectivamente (EREMEEVA; DASCH, 2000); o Grupo da Febre Maculosa (GFM), constituído por mais de 30 espécies transmitidas por carrapatos. O Grupo de Transição (GTr), que inclui *R. akari* e *R. felis*, transmitidas por ácaros e pulgas, respectivamente; e um Grupo Ancestral (GA), que inclui as espécies *R. bellii*, *R. canadensis* e *R. monteiroi*, com particularidades genéticas e antigênicas diferentes, bem como patogenicidade desconhecida em humanos (SEKEYOVA; ROUX; RAOULT, 2001).

2.4.4 Epidemiologia

As enfermidades causadas por riquetsias estão amplamente distribuídas pelo mundo (AZARD; BEARD, 1998; GRECA; LANGONI; SOUZA, 2008; LABRUNA et al., 2011).

As riquetsias do GFM são transmitidas, em sua maioria, por uma variedade de espécies de carrapatos, cada um com as exigências ecológicas específicas (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Na natureza, a manutenção do ciclo das riquetsias é garantida pela capacidade dos carrapatos atuarem como vetores, reservatórios e/ou amplificadores (PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2005). A infecção nos carrapatos ocorre para outras gerações por meio da transmissão transovariana,

e de um estágio para outro pela transmissão transestadial. A grande maioria desses carrapatos pertence à família Ixodidae, em especial ao gênero *Amblyomma*, o qual possui aproximadamente 130 espécies descritas, sendo 29 encontradas no Brasil (MARTINS et al., 2010).

No Brasil, vários trabalhos relataram a infecção por riquetsias em diferentes espécies de carrapatos, como *A. auricularium* (SARAIVA et al., 2013), *A. parvum* (NIERI-BASTOS et al., 2014), *A. dubitatum* (PACHECO et al., 2009; ALMEIDA et al., 2011); *A. nodosum* (OGRZEWALSKA et al., 2009; ALMEIDA et al., 2012), *A. coelebs* (LABRUNA et al., 2004a), *A. longirostre* (OGRZEWALSKA et al., 2008), *A. triste* (NIERI-BASTOS et al., 2013), *A. ovale* (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013), *A. incisum* (PACHECO et al., 2011), *Rhipicephalus sanguineus* (MORAES-FILHO et al., 2009), *Haemaphysalis juxtakochi* (LABRUNA et al., 2007) e *Ixodes loricatus* (HORTA et al., 2006).

Entre as diferentes espécies do GFM, a *Rickettsia rickettsii* é considerada a mais patogênica para humanos e animais (PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2009). Sua distribuição é restrita às Américas, com relatos no Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina (LABRUNA et al., 2011).

No Brasil, a enfermidade causada pela *R. rickettsii* é conhecida como Febre Maculosa Brasileira (FMB) (OGRZEWALSKA et al., 2012; KRAWCZAK et al., 2014). A FMB é uma importante zoonose, sendo considerada a mais letal das riquetsioses do mundo (GALVÃO et al., 2005; LABRUNA et al., 2009).

A FMB é uma doença de notificação compulsória desde 2001 e vem sendo frequentemente relatada na região sudeste, sendo considerada endêmica em algumas áreas (BRASIL, 2014a). No estado de São Paulo foram confirmados 323 casos entre os anos de 2008 e 2012. Entretanto, de acordo com os dados do Ministério da Saúde, a doença já foi notificada em outras regiões do país (BRASIL, 2014b). O Quadro 1 demonstra os estados brasileiros onde casos de febre maculosa foram notificados e confirmados entre os anos de 2008 a 2012.

QUADRO 1 - Casos de febre maculosa confirmados no Brasil entre os anos de 2008 a 2012 (Ministério da Saúde - Adaptado SINAN, 2014).

Estados	2008	2009	2010	2011	2012	Total
Bahia	0	0	0	0	1	1
Ceará	0	0	1	0	0	1
Distrito Federal	0	0	0	1	0	1
Espírito Santo	3	1	6	9	3	22
Goiás	0	0	0	0	2	2
Mato Grosso	0	0	1	0	0	1
Mato Grosso do Sul	0	2	2	0	0	4
Minas Gerais	9	12	12	18	10	61
Paraná	2	1	3	2	3	11
Rio de Janeiro	7	9	4	17	4	41
Rio Grande do Sul	0	0	0	1	0	1
Rondônia	1	0	0	0	0	1
Santa Catarina	23	34	25	24	40	146
São Paulo	43	64	50	78	88	323
Tocantins	0	1	0	3	1	5
Total	88	124	105	153	153	622

No Brasil, a febre maculosa causada por *R. rickettsii* é transmitida principalmente pelo carrapato *Amblyomma cajennense*, popularmente conhecido como “carrapato-estrela” (SOARES et al., 2011; KRAWCZAC et al., 2014). No estado de São Paulo o *A. aureolatum*, conhecido popularmente como “carrapato amarelo do cão”, foi apontado na transmissão da doença em humanos (PINTER et al., 2008; DEL FIOLE et al., 2011). Este carrapato, na fase adulta, costuma parasitar carnívoros domésticos e silvestres, bem como, em seus estágios imaturos, aves e roedores selvagens (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

Estudos demonstraram que o *A. aureolatum* é altamente suscetível à infecção por *R. rickettsii* e é altamente eficiente na manutenção da infecção por meio da transmissão transtadial e transmissão transovariana, com taxas de infecção

chegando a 100% em condições laboratoriais (PINTER; LABRUNA, 2006; LABRUNA et al., 2008). No entanto, devido a *R. rickettsii* apresentar certo efeito deletério para o estágio adulto de *A. aureolatum*, a transmissão horizontal através da participação de hospedeiros vertebrados parece ser crucial na manutenção da *R. rickettsii* em populações de *A. aureolatum*, entretanto, hospedeiros amplificadores competentes para este carrapato ainda são desconhecidos (LABRUNA et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2012).

Alguns animais silvestres, como roedores e marsupiais, são considerados hospedeiros amplificadores de riquetsias na natureza (LABRUNA et al., 2011). Estudos realizados em pequenos roedores demonstraram que eles são suscetíveis à infecção por *Rickettsia* spp. e desenvolvem riquetsemia em níveis altos, infectando seus ectoparasitas durante o repasto sanguíneo (REHACEK; URVOLGY, 1978).

De acordo com Labruna et al. (2009), uma espécie de hospedeiro vertebrado para ser amplificadora de *R. rickettsii* deve apresentar cinco características importantes: ser abundante numa área endêmica de *R. rickettsii*; ser um hospedeiro primário para o carrapato vetor; ser suscetível para a infecção por *R. rickettsii*; se infectado, precisa desenvolver uma riquetsemia suficiente para infectar os carrapatos que se alimentam sobre ele; e ser uma espécie prolífica, a fim de introduzir continuamente animais não imunes na população hospedeira.

Os equinos e caninos são considerados animais sentinelas na epidemiologia da FM ocasionada por *R. rickettsii* (SANGIONI et al., 2011), entretanto o papel de muitos animais como reservatórios ainda não está bem definido. Atualmente, as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e os gambás (*Didelphis aurita*) são considerados hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para carrapatos *Amblyomma* spp., sendo também apontados como fonte de infecção para várias espécies de carrapatos da fauna brasileira (SOUZA et al., 2009; HORTA et al., 2009).

No Brasil, outras espécies de riquetsias consideradas não patogênicas ou de patogenicidade desconhecida foram descritas infectando carrapatos: *R. rhipicephali*, *R. amblyommii*, *R. bellii* e *R. monteroi*, porém sem associação à infecção humana (LABRUNA et al., 2011). Destas, apenas as espécies *R. bellii* e *R. monteroi* não estão geneticamente e sorologicamente relacionadas às espécies pertencentes ao

grupo das febres maculosas (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005). Recentemente, foi realizado o primeiro relato no Brasil de *Candidatus R. andeanae*, encontrada infectando carrapatos *Amblyomma parvum* (NIERI-BASTOS et al., 2014).

Além da *R. rickettsii*, outras espécies de riquetsias têm sido incriminadas na ocorrência de quadros de febre maculosa, ainda que as manifestações clínicas sejam mais brandas. Entre elas destacam-se *R. felis* (RAOULT et al., 2001; HORTA et al., 2006) e *R. parkeri*, esta apontada como agente etiológico da febre maculosa em humanos em áreas de Mata Atlântica (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011). No Brasil, a *R. parkeri* foi relatada pela primeira vez em 2007, isolada do carrapato *Amblyomma triste*, colhido em área rural do Estado de São Paulo (SILVEIRA et al., 2007). A FM causada por *R. parkeri* se caracteriza por quadros clínicos menos severos quando comparados as demais riquetsioses e sem registro de letalidade, o que dificulta o diagnóstico clínico em locais onde nunca fora relatada (PADDOCK et al., 2004).

2.4.5 Sintomatologia clínica

A *R. rickettsii* chega à circulação sanguínea pela secreção salivar do carrapato infectado e penetra nas células endoteliais do hospedeiro vertebrado. Após a transmissão, o período médio de incubação da febre maculosa é de 2-14 dias e as manifestações clínicas iniciais são inespecíficas, como febre alta, mialgia, dor abdominal, calafrios e cefaleia, que podem evoluir com o aparecimento de erupções cutâneas (máculas), vasculite, necrose vascular, hemorragias e coagulação intravascular disseminada (CID) (GREENE, 2006). Segundo dados do Ministério da Saúde, a letalidade no Brasil dos casos clínicos não tratados ou tratados tardiamente pode chegar a 80% (BRASIL, 2014a).

Embora pouco se conheça sobre os sinais clínicos da infecção por *Rickettsia* spp. em animais, estes apresentam sintomatologia semelhante aos humanos (PIRANDA et al., 2008; LABRUNA et al., 2009). No Brasil, a doença clínica foi relatada em cães a partir da confirmação de FMB em dois animais procedentes do município de Itu, no Estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2009). Os cães são suscetíveis a *R. rickettsii*, podendo apresentar febre, anorexia, depressão, letargia,

petéquias, equimoses cutâneas, conjuntivite, epistaxe e alterações neurológicas (GREENE, 2006; LABRUNA et al., 2009).

2.4.6 Diagnóstico

O diagnóstico da febre maculosa é baseado na observação dos sinais clínicos e por meio da confirmação laboratorial pelos métodos diretos e indiretos (HORTA et al., 2007; KIDD et al., 2008). É essencial associar os resultados dos exames laboratoriais com os dados epidemiológicos da região, época do ano, procedência do caso clínico e histórico de exposição a carrapatos.

2.4.6.1 Diagnóstico indireto

O diagnóstico indireto se dá frequentemente pelo emprego de técnicas sorológicas. Dentre as técnicas utilizadas, a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é considerada como padrão ouro para detecção de riquetsias do GFM (BERMUDÉZ et al., 2012). Apesar da alta sensibilidade do teste, não há distinção das espécies dentre os isolados, devido à possibilidade de reações cruzadas entre as espécies de riquetsias. Outros testes incluem microimunofluorescência; Weil-Felix; Microaglutinação; Hemaglutinação Indireta; Aglutinação em Látex; Fixação do Complemento; Ensaio Imunoenzimático (ELISA); testes de neutralização de toxinas riquetsiais com anti-soros preparados em cobaias; teste de proteção usando vacinas em cobaias; e Western Blotting, uma ferramenta diagnóstica importante para estudos soroepidemiológicos e confirmação de resultados a partir de testes sorológicos convencionais (FREITAS, 2007).

2.4.6.2 Diagnóstico direto

O diagnóstico direto tem como objetivo detectar o agente etiológico através de técnicas que permitam a sua visualização ou a detecção de fragmentos de DNA. O emprego de técnicas moleculares tem contribuído para o conhecimento de novas espécies de riquetsias do GFM. A Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) é uma

ferramenta da biologia molecular que tem facilitado no diagnóstico da febre maculosa, porém mais utilizada em nível de pesquisa. Além disso, técnicas de imunohistoquímica (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005) e de isolamento do agente têm sido realizadas (LABRUNA, 2006; LABRUNA et al., 2007). No caso dos carrapatos, ainda pode ser realizado o teste de hemolinfa para confirmação da infecção, o qual se baseia na coloração de Gimenez, normalmente empregado para triagem de vetores infectados (CHAPMAN et al., 2006).

2.5 *Coxiella burnetii*

2.5.1 Histórico

A bactéria *Coxiella burnetii* foi descoberta em 1937, na Austrália, por Edward Holbrook Derrick (STOKER; MARMION, 1955). Na ocasião, o pesquisador foi convidado a investigar o surgimento de uma doença febril que acometia trabalhadores do matadouro público de Cannon Hill, em Brisbane (DERRICK, 1937).

Com base em algumas características morfológicas, bioquímicas, comportamentais e ecológicas foi isolada e inicialmente identificada como do gênero *Rickettsia*. Na Austrália foi isolada de sangue e urina de pacientes por Burnet e Freeman (1937), sendo chamada de *R. burnetii*. Um ano mais tarde, a bactéria foi isolada de carrapatos por Davis e Cox (1938) em Montana, EUA, sendo então denominada de *R. diaporica*.

A similaridade com as riquetsias é inerente, entre outras características, ao modo de infecção na célula hospedeira, morfologia e participação dos carrapatos no seu ciclo evolutivo (PARKER; BARRALET; BELL, 2006). Mais tarde, a partir de avanços de técnicas moleculares, voltadas para o conhecimento do perfil genômico da bactéria, foi reclassificada no gênero *Coxiella*, com a denominação de *Coxiella burnetii* em homenagem a Cox e Burnet, pesquisadores responsáveis pelo seu isolamento (PHILIP, 1948). O sequenciamento do genoma completo da *C. burnetii* (cepa Nine Mile) foi realizado em 2003, permitindo a classificação taxonômica atual da bactéria (SESHADRI et al., 2003).

C. burnetii causa uma doença febril conhecida como Febre Q (deriva do Inglês “query”- interrogação, dúvida), assim chamada devido à causa da febre nos pacientes permanecer durante algum tempo desconhecida e sem associação com outras doenças conhecidas na época. No Brasil, a primeira descrição da Febre Q foi em 1953, no estado de São Paulo, e embora existam estudos soropidemiológicos que evidenciem a circulação da *C. burnetii* no país, relatos da doença são raros, a maioria dos casos identificados foi apenas confirmada com base em testes sorológicos. Somente em 2010 foi relatada a primeira detecção molecular de *C. burnetii* em humanos no Brasil (LEMOS et al., 2011).

2.5.2 Taxonomia

O gênero *Coxiella* pertence à ordem Legionellales, família Coxiellaceae (SESHADRI et al., 2003), fazendo parte do grupo das Gama Proteobactérias (WEISBURG et al., 1989; STEIN; RAOULT, 1992). Sua classificação baseia-se na composição dos lipopolissacarídeos da membrana celular, nas vias metabólicas e nas características genéticas, especialmente na composição da sequência do gene 16S do RNA. Difere do gênero *Rickettsia*, pois apresenta capacidade de sobreviver fora das células hospedeiras, formando esporos resistentes. O gênero *Coxiella* é formado por uma única espécie descrita, a *Coxiella burnetii*, devido à homologia filogenética do gênero a partir de análises genéticas de diferentes cepas pertencentes a origens geográficas diferentes (PARKER; BARRALET; BELL, 2006; CUTLER; BOUZID; CUTLER, 2007).

2.5.3 Etiologia

Coxiella burnetii é uma bactéria intracelular obrigatória que se desenvolve em diferentes tipos celulares, incluindo monócitos e macrófagos de seus hospedeiros (LA SCOLA, 2002). Gram negativa, não capsulada, imóvel e bastante pleomórfica, apresenta-se como cocobacilos, medindo entre 0,4 a 1 µm de comprimento e 0,2 a 0,4 µm de largura (PRESCOTT; HARLEY; KLEIN, 2004; GÜRTLER et al., 2014). Possui como característica relevante a formação de

esporos, o que permite sua resistência durante longos períodos no ambiente, além disso, possui uma alta capacidade de resistir a agentes físico-químicos, como calor, dessecação e ação de alguns produtos. No entanto, pode ser inativada com a utilização de éter, clorofórmio, raios gama, sendo também destruída a temperaturas de 130°C. (PARREIRA, 2008). É também suscetível a alguns desinfetantes, como hipoclorito de sódio, fenol, etanol, glutaraldeído e formaldeído (SANTOS; BACELLAR; FRANÇA, 2007). Apresenta alta capacidade infecciosa, podendo um único microorganismo desencadear a doença em animais e humanos (MAURIN; RAOULT, 1999; PORTER et al., 2010). Devido a sua alta patogenicidade é considerada uma perigosa arma biológica, possuindo grande importância em todo mundo (MADARIAGA et al., 2003).

2.5.4 Epidemiologia

C. burnetii causa uma importante zoonose conhecida como Febre Q, relatada em quase todo mundo, com exceção da Nova Zelândia (AGERHOLM, 2013). Estudos epidemiológicos, bem como o aumento no número de casos relatados em vários países demonstram que Febre Q é considerada um problema crescente de saúde pública no mundo (MEDIANNIKOV et al., 2010; HILBERT et al., 2012; ESMAEILI et al., 2013; VANDERBURG et al., 2014).

No Brasil a doença é considerada emergente e apesar de sua grande importância, seja econômica ou como zoonose, é ainda pouco diagnosticada. Segundo Siciliano et al. (2008), apesar de existirem dados soroepidemiológicos sobre a ocorrência da Febre Q, os relatos sobre a infecção por *C. burnetii* são raros e muitas vezes subnotificados, o que pode ser justificado pelo fato da doença não ser de notificação obrigatória no país. Estudos soroepidemiológicos sobre a enfermidade foram realizados principalmente na região sudeste, nos estados de Minas Gerais (COSTA; BRIGATTE; GRECO, 2006) e Rio de Janeiro (LAMAS et al., 2008).

Várias espécies animais constituem reservatórios naturais do agente, podendo incluir animais domésticos, silvestres e diferentes espécies de carrapatos. Estes artrópodes são os reservatórios naturais mais amplamente conhecidos. O

papel dos carrapatos é essencial para a manutenção do agente na natureza, sendo o vetor primário na transmissão da bactéria às espécies veterinárias (STOKER; MARMION, 1955; PARREIRA, 2008). A bactéria *C. burnetii* infecta naturalmente mais de 40 espécies de carrapatos, pertencentes a 12 gêneros diferentes (KAZAR, 2005). Os gêneros *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma* e *Dermacentor* são considerados de maior importância na transmissão vetorial para animais (PAROLA; RAOULT, 2001). A enfermidade nos animais é conhecida como Febre Q ou Coxielose, embora o termo Coxielose seja defendido como mais correto, sendo os animais ungulados (bovinos, caprinos e ovinos) os de maior importância na transmissão zoonótica da doença (ANGELAKIS; RAOULT, 2010; RADINOVIC et al., 2013).

Os animais infectados pela *C. burnetii* eliminam grande quantidade da bactéria através de secreções e excreções corporais, como fezes, urina, leite, placenta, fluidos vaginais e tecidos fetais (RUIZ-FONS et al., 2010).

A transmissão da infecção nos animais se dá através do ectoparasitismo por carrapatos (KAZAR, 2005) ou por difusão aérea do agente durante o aborto ou parto de animais infectados (PALMER et al., 1983). Em humanos, a principal forma de transmissão dá-se através da inalação de aerossóis, sendo os ruminantes domésticos incriminados como fontes de infecção mais comuns na infecção para o homem (MAURIN; RAOULT, 1999). Além disso, o leite e produtos lácteos não pasteurizados são considerados veículos de transmissão da doença, pois o processo de fervura comum não elimina os esporos, que resistem as altas temperaturas, mantendo-se viáveis (CERF; CONDRON, 2006). Entretanto a ingestão é provavelmente um fator de pequena importância na transmissão da *C. burnetii*, sendo essa possibilidade bastante controversa (MAURIN; RAOULT, 1999).

2.5.5 Sintomatologia clínica

A doença causada pela infecção com *C. burnetii* está associada com um amplo espectro clínico, que vai da soroconversão assintomática ou ligeiramente sintomática a doença fatal em humanos (ANGELAKIS; RAOULT, 2010). A maioria dos animais infectados geralmente não desenvolve sintomatologia clínica, sendo

considerados assintomáticos (MARRIE, 1990). Poucas são as manifestações patológicas associadas à infecção pela *C. burnetii* em animais, sendo descritas desordens reprodutivas, principalmente em caprinos e ovinos (PALMER et al., 1983; VAIDYA et al., 2010; AGERHOLM, 2013). Dentre os problemas reprodutivos mais relatados estão os abortos, que ocorrem principalmente no terço final da gestação. Além disso, podem ocorrer placentite, metrite, partos prematuros, nascimentos de animais fracos, natimortos e infertilidade materna, envolvendo também a presença da bactéria em órgãos como baço, fígado e pulmão (PALMER et al., 1983). Os ruminantes são muito suscetíveis a infecção, especialmente no período gestacional. Nestes casos, em geral, os abortos ocorrem na primeira gestação após a infecção, e possivelmente futuras gestações apresentarão desenvolvimento normal (PALMER et al., 1983).

Estudos têm demonstrado que abortos causados pela *C. burnetii* em ruminantes são mais comuns nas espécies caprina e ovina do que na espécie bovina. Caprinos infectados experimentalmente com a *C. burnetii* apresentaram 100% de abortamentos no final da gestação (SANCHÉZ et al., 2006). Embora possam ocorrer abortos nos bovinos em decorrência da infecção por *C. burnetii*, os sinais clínicos observados nesta espécie animal estão geralmente associados a quadros de placentite e metrite.

Outras alterações patológicas podem ser verificadas em ruminantes infectados. Sánchez et al. (2006) encontraram lesões na glândula mamária, no pulmão e fígado de caprinos infectados que abortaram, além disso, os trofoblastos da membrana corioalantóica da placenta foram as principais células alvo da *C. burnetii*, assim como foi demonstrado por Palmer et al. (1983).

A infecção pela *C. burnetii* em humanos, na maioria dos casos, é pouco evidente, semelhante a uma gripe, com recuperação espontânea, sendo considerada autolimitante (PALMER et al., 1983). Porém o quadro pode evoluir e gerar complicações na fase aguda da doença, como pneumonia, hepatite, meningoencefalite ou miocardite (PALMER et al., 1983). Na fase crônica afeta principalmente o sistema cardiovascular (ACHA; SZYFRES, 2003). Observa-se como sintoma mais comum a endocardite, que se não tratada pode levar ao óbito (SICILIANO et al., 2008). Pacientes gestantes com complicações cardiovasculares

ou imunodeprimidos constituem grupo de risco para a doença. O diagnóstico torna-se difícil, devido às variações no quadro clínico, sendo uma das razões para subnotificação da doença (SICILIANO et al., 2008).

2.5.6 Diagnóstico

2.5.6.1 Diagnóstico Indireto

O diagnóstico indireto baseia-se na investigação sorológica. Os testes sorológicos mais empregados são Fixação de Complemento (FC), Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e o Ensaio Imunoenzimático (ELISA), sendo a RIFI considerada padrão de referência (GÜRTLER et al., 2014).

2.5.6.2 Diagnóstico direto

O diagnóstico direto é realizado principalmente por meio de técnicas moleculares, como PCR (Reação em Cadeia pela Polimerase), em tecidos de abortos, sangue, leite e carrapatos. Esses testes baseados na PCR são feitos de maneira relativamente rápida e apresentam alta sensibilidade e especificidade, tornando possível a detecção do DNA da bactéria *C. burnetii* (STEIN; RAOULT, 1992).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

O presente trabalho objetivou realizar um levantamento da infecção por *Rickettsia* spp. e *Coxiella burnetii* em mamíferos silvestres e pequenos ruminantes na região do Parque Nacional da Serra das Confusões, Piauí.

3.2 ESPECÍFICOS

1. Realizar levantamento de mamíferos silvestres capturados no Parque Nacional da Serra das Confusões, Piauí;

2. Coletar e identificar carrapatos de mamíferos silvestres, caprinos, ovinos e de vida livre;

3. Determinar a ocorrência de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e anti-*Coxiella burnetii* em mamíferos silvestres, caprinos e ovinos pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI);

4. Confeccionar mapas georreferenciados sobre a ocorrência da infecção por *Rickettsia* spp. e *Coxiella burnetii* nos mamíferos silvestres, caprinos e ovinos;

5. Determinar a infecção por *Rickettsia* spp. e *Coxiella burnetii* em sangue de mamíferos silvestres; e em carrapatos de mamíferos silvestres, caprinos, ovinos e de vida livre por meio da Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÁREA DE ESTUDO

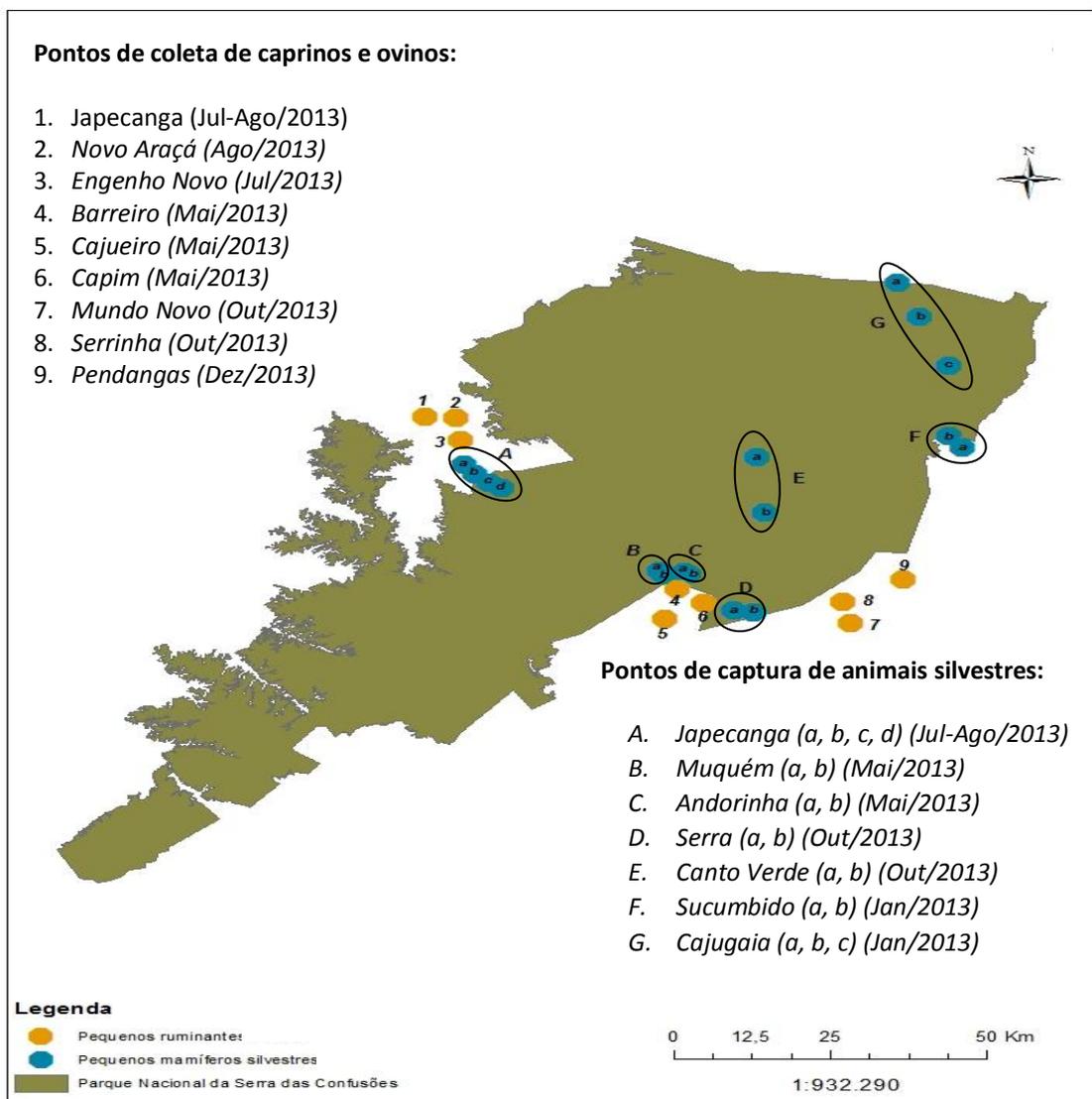
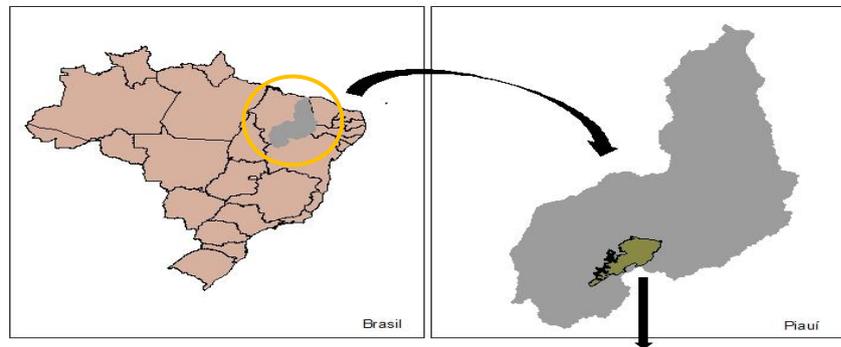
O Parque Nacional da Serra das Confusões (PNSC) está localizado no sudeste do Estado do Piauí (9°27' 9°31' Sul; 43°05' 43° 56' Oeste), sendo uma das maiores e mais recentes unidades de conservação de proteção integral do bioma Caatinga (Decreto s/nº 02 de outubro de 1998), abrangendo uma área total de 823.435 ha (Figura 1). Sua área territorial abrange 11 municípios do estado: Caracol, Jurema do Piauí, Tamboril do Piauí, Canto do Buriti, Alvorada do Gurgueia, Cristino Castro, Santa Luz, Guaribas, Bom Jesus, Redenção do Gurgueia e Curimatá. A paisagem do Parque é formada principalmente por planaltos, chapadas de altitude e depressões. O clima da região é semiárido, caracterizado por períodos chuvosos que ocorrem entre os meses de outubro e abril, e por temperatura média anual de 28°C (ICMBio, 2014).

Os locais para captura de animais silvestres foram escolhidos de forma a abranger ambientes distintos do PNSC, como áreas de caatinga arbórea, caatinga arbustiva, rochas e cavernas, compreendendo sete áreas ambientais: Japecanga, Muquém, Andorinha, Serra, Canto Verde, Sucumbido e Cajugaia (Figura 2). Dessa forma, foram estabelecidos transectos a fim de facilitar e monitorar a pesquisa de campo.

Para estudo em pequenos ruminantes, propriedades rurais adjacentes ao PNSC foram identificadas a partir da presença de rebanhos caprinos e ovinos (Figura 3). Foram obtidas amostras biológicas de caprinos e ovinos provenientes de nove povoados situados no entorno do parque, sendo estes: Japecanga, Novo Araçá, Engenho Novo, Barreiro, Cajueiro, Capim, Mundo Novo, Serrinha e Pendangas.

Os locais de captura de animais silvestres (áreas localizadas dentro do PNSC), bem como as propriedades rurais para pesquisa de pequenos ruminantes (áreas adjacentes ao PNSC) foram georreferenciados com o auxílio de um aparelho de GPS, sendo realizado o mapeamento dos pontos por meio do programa ArcGIS.

FIGURA 1 - Localização do Parque Nacional da Serra das Confusões, Piauí.
(Fonte: autor)



*Os números de 1 a 9 estão representando as localidades rurais no entorno do PNSC onde foram coletadas amostras biológicas de caprinos e ovinos. As letras de A a G representam as sete áreas ambientais dentro do PNSC onde foram capturados os pequenos mamíferos silvestres. Os círculos delimitam as áreas ambientais do parque onde houve mais de um ponto de captura.

FIGURA 2 - Áreas ambientais do PNSC selecionadas para captura de mamíferos silvestres. A - Japécanga, B - Muquén, C - Andorinha, D - Serra, E - Canto Verde, F - Sucumbido e G - Cajugaia. PNSC/Piauí, 2013. (Fonte: autor)

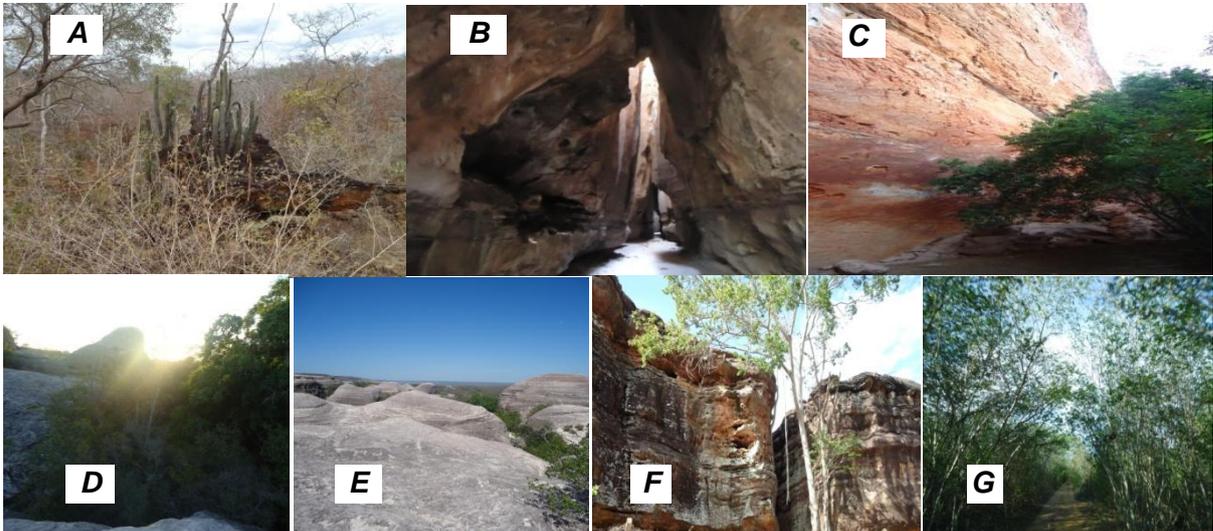
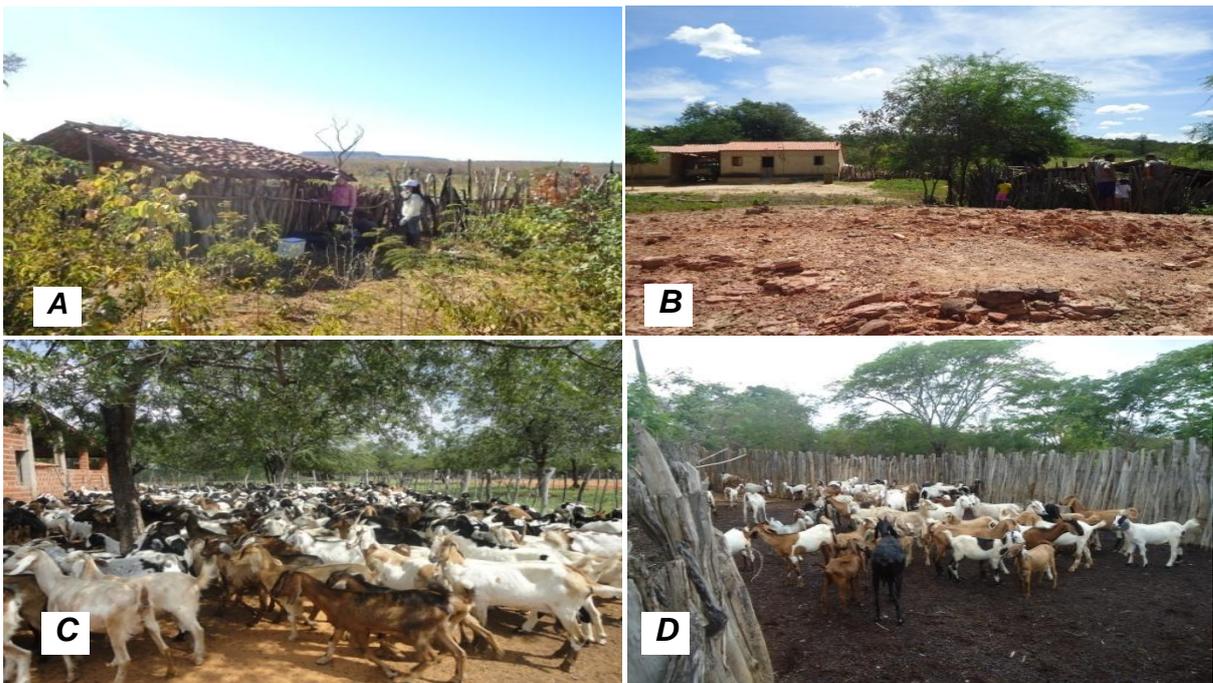


FIGURA 3 - Propriedades rurais no entorno do PNSC e presença de rebanhos caprinos e ovinos, Piauí 2013. A - Propriedade rural em Engenho Novo, B - Propriedade rural em Novo Araçá, C - Rebanho de caprinos e ovinos de uma propriedade rural em Canto Verde, D - Rebanho caprino e ovino em uma propriedade rural em Japécanga. (Fonte: autor)



4.2 CAPTURA DE ANIMAIS SILVESTRES

Durante o ano de 2013, foram realizadas quatro visitas ao PNSC, uma em cada estação do ano, nos períodos de 18 a 23 de janeiro (visita 1), 21 a 26 de maio (visita 2), 28 de julho a 2 de agosto (visita 3) e 21 a 25 de outubro (visita 4), sendo cada área estudada visitada apenas em um único período durante a pesquisa.

A captura e manipulação de mamíferos silvestres no PNSC foi autorizada pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), por meio do protocolo ICMBio/SISBio, nº 36585-1.

Para captura de roedores e marsupiais foram utilizadas um total de 70 armadilhas de contenção viva tipo “Sherman”, nas dimensões 30x8x9 cm e 43x12,5 x14,5 cm, e “Tomahawk”, na dimensão 45x16x16 cm, durante quatro noites consecutivas em cada área. As armadilhas foram distribuídas de forma intercalada por transectos estabelecidos aleatoriamente, obedecendo à distância de aproximadamente 10 m uma da outra, montadas um dia antecedente a pesquisa de campo e vistoriadas na manhã seguinte. As mesmas foram iscadas com uma mistura preparada de farinha de milho, amendoim, sardinha enlatada e banana, com pedaços de abacaxi servindo como base, ideal para captura de roedores e marsupiais (GRAIPEL et al., 2006). De acordo com a metodologia descrita por Santana (2006), o esforço de captura foi calculado com base na fórmula: $EC = NA \times ND$, em que EC = esforço de captura; NA = número de armadilhas utilizadas; ND = número de dias de captura. O sucesso de captura foi obtido a partir da fórmula $SC = NC/EC \times 100$, onde SC = sucesso de captura; NC = número de capturas; EC = esforço de captura (SANTANA, 2006).

A identificação dos animais capturados foi realizada de acordo com Gardner (2007), Bonvicino; Oliveira; D’Andrea (2008) e Reis et al. (2011).

4.3 COLHEITA DE AMOSTRAS DE SANGUE

4.3.1 Mamíferos silvestres

A manipulação dos mamíferos silvestres após sua captura foi realizada atendendo os princípios de biossegurança. Os animais foram previamente anestesiados para minimizar o estresse dos mesmos e evitar acidentes durante os procedimentos. O anestésico utilizado foi o cloridrato de quetamina (Dopalen®, Vetanarcol®), na dosagem de 10 mg/Kg de peso corpóreo. Após completa recuperação anestésica, os animais foram marcados e soltos no exato local da captura. A marcação dos roedores e marsupiais foi realizada mediante tricotomia dorsal dos pelos, a fim de evitar a manipulação de animais recapturados. Os animais foram fotografados e todas as informações referentes à data de captura, localização geográfica, espécie, sexo, peso, quantidade de anestésico utilizada e descrição morfológica, foram devidamente anotadas em fichas avaliativas para possíveis análises durante o estudo.

As amostras de sangue dos mamíferos silvestres foram obtidas por venopunção intracardíaca ou intracaudal, conforme a viabilidade do acesso venoso, através de seringas descartáveis de 3 mL e agulhas hipodérmicas 20x5,5 mm. As amostras foram colocadas em tubos sem anticoagulante e armazenadas em isopor com gelo até serem centrifugadas. Para obtenção do soro, as amostras foram submetidas à centrifugação (3.600 rpm/10 minutos), armazenadas em microtubos de 1,5 mL, identificadas e estocadas a -20°C. Além disso, uma pequena quantidade de sangue colhido, aproximadamente 0,5 mL por animal, era disposta em microtubos de 1,5 mL contendo etanol absoluto, para posterior extração de DNA.

4.3.2 Pequenos ruminantes

A colheita de sangue de pequenos ruminantes foi realizada nos períodos de 21 a 26 de maio; 28 de julho a 2 de agosto; 21 a 25 de outubro; 7 e 8 de dezembro, sendo selecionadas 36 propriedades rurais pertencentes a nove povoados localizados no entorno do parque, conforme descrito na área de estudo, e realizada a partir da autorização dos proprietários. As propriedades rurais visitadas neste estudo apresentavam sistema de criação extensivo ou semiextensivo, sendo a produção basicamente de subsistência ou como fonte de renda oriunda da agricultura familiar.

As amostras de sangue dos caprinos e ovinos foram obtidas pela venopunção da veia jugular, através de agulhas para coleta a vácuo 25x8 mm, colocadas em tubos sem anticoagulante e armazenadas em isopor com gelo até a centrifugação. Para obtenção do soro as amostras foram centrifugadas (3.600 rpm/10 minutos), armazenadas em microtubos de 1,5 mL, identificadas e estocadas a -20°C.

4.4 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS

Os mamíferos silvestres, caprinos e ovinos foram inspecionados para pesquisa de carrapatos em fase parasitária. Os espécimes de carrapatos foram colhidos manualmente e acondicionados em microtubos de 1,5 mL contendo álcool absoluto. As fêmeas ingurgitadas e carrapatos em estágios imaturos (larvas e ninfas) foram acondicionados em frascos plásticos secos, vedados com tampa contendo pequenos orifícios, a fim de permitir a aeração dos artrópodes. Estes foram mantidos em estufa artesanal até serem transportados para o Laboratório de Parasitologia e Doenças Parasitárias da Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), onde foram transferidos para estufa B.O.D. por 72 horas à 25°C, para promover as ecdises (ARAGÃO; FONSECA, 1961).

Carrapatos de vida livre (VL) foram capturados por meio de busca ativa ou pelo método de arraste de flanela para busca de larvas e ninfas no ambiente. Eventualmente, durante a pesquisa, carrapatos encontrados parasitando a equipe de campo foram coletados e acondicionados de maneira análoga à citada anteriormente.

Os carrapatos foram identificados taxonomicamente utilizando-se chave dicotômica e pictórica descrita por Aragão e Fonseca (1961) e Martins et al. (2010).

4.5 REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Os soros obtidos de mamíferos silvestres e pequenos ruminantes foram submetidos à Reação de Imunofluorescência Indireta (GALVÃO, 1996). As lâminas

contendo antígenos específicos de *Rickettsia rickettsii* (cepa Taiacu) e *Coxiella burnettii* foram produzidas no laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo - FMVZ/USP. A técnica foi realizada de acordo com protocolo descrito por Horta et al. (2004) para detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. e de acordo Reeves et al. (2006) para detecção de anticorpos anti-*C. burnettii*. Assim, alíquotas de soro foram diluídas em PBS (solução fosfato tamponada) e depositadas sobre lâminas contendo os antígenos de *R. rickettsii* e *C. burnettii*.

As lâminas foram incubadas em estufa a 37° por 30 minutos e posteriormente lavadas com solução de PBS e triton, ficando em repouso até a completa secagem. A cada lâmina foi adicionado, em diferentes diluições para cada espécie avaliada, conjugado específico [roedores: anti-IgG rattus e anti-IgG guinea pig (Sigma, St Louis, Mo, USA); marsupiais: anti-IgG *Didelphis* spp. (CCZ, São Paulo/SP); ovinos: anti-IgG sheep; caprinos: anti-IgG goat] marcado com isotiocianato de fluoresceína (FITC).

Em seguida, as lâminas foram novamente incubadas (37°C/30 min), lavadas, coradas com azul de Evans e colocadas para secar em câmara escura (WALKER, 1992). A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de imunofluorescência, sendo considerados positivos os soros com títulos ≥ 64 . Os soros positivos foram submetidos às diluições seriadas, até se chegar ao último título verificado. Para cada lâmina utilizou-se controles padrões, positivos e negativos, de acordo com cada espécie animal.

4.6 EXTRAÇÃO DE DNA

4.6.1 Sangue

A extração de DNA de coágulos sanguíneos foi realizada a partir de amostras de 75 animais silvestres capturados no PNSC, utilizando-se kit comercial Wizard® Genomic DNA Purification (Promega, Madison, WI, USA) para um volume final de 50 μ L.

4.6.2 Carrapatos

Os carrapatos foram separados individualmente para extração de DNA, sendo colocados em microtubos de 1,5 mL. Em seguida, foram triturados com auxílio de agulha estéril 40x12 mm, adicionado 150 µL de TE pH 8,0 (10 mM de TRIS HCl; 1 mM EDTA) e macerados com ponteira queimada. Posteriormente, os microtubos foram levados ao vórtex, procedendo-se a adição de 450 µL de isotiocianato de guanidina, homogeneização e adição de 100 µL de clorofórmio.

As amostras foram centrifugadas (1.200 rpm durante 5 minutos), sendo que aproximadamente 400 µL do sobrenadante foi recuperado e transferido para um novo microtubo estéril de 1,5 mL, onde foi adicionado 600 µL de isopropanol, ficando armazenadas em freezer (-20°C) por no mínimo 2 horas. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas (1200 rpm a 4°C por 15 minutos) e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi ressuspensão em 800 µL de etanol 70% e uma nova centrifugação foi realizada (1.200 rpm a 4°C por 15 minutos), sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado exposto a temperatura ambiente durante 1 hora para secagem ou mantido em termobloco a 56°C por 15 minutos. Em seguida, foi realizada a adição final de 60 µL de TE e as amostras foram armazenadas em freezer (-20°C) até realização da PCR. A cada 10 amostras extraídas foi utilizado um controle de extração (água destilada com ausência de DNA).

4.7 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

As amostras de DNA extraído de sangue e de carrapatos foram testadas pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para pesquisa de DNA de *Rickettsia* spp. e *C. burnetii* utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para análise de DNA dos diferentes agentes (Quadro 2).

4.7.1 *Rickettsia* spp.

O par de *primers* gênero específico para *Rickettsia* spp. do gene *gltA* (gene citrato cintase) foi utilizado para amplificação do fragmento de DNA que codifica a

enzima citrato sintase, presente em todas as espécies de riquetsias. As amostras positivas foram submetidas a uma segunda reação utilizando-se oligonucleotídeos que amplificam o fragmento de DNA que codifica a proteína externa de superfície de 190 kDa (*ompA*), restrito as riquetsias do GFM. Para cada reação foi utilizado como controle positivo *Rickettsia parkeri* (cepa NOD) e como controle negativo água milli Q sem DNA.

4.7.2 *Coxiella burnetii*

Para pesquisa de *C. burnetii*, as amostras de DNA foram submetidas à PCR, utilizando-se *primers* que amplificam o fragmento de DNA que codifica a biossíntese da proteína capsular polissacarídica (gene *CAP*), comum à espécie *C. burnetii*. Foi utilizado como controle positivo extrato genômico de *C. burnetii* e como controle negativo água mili Q isenta de nucleases.

QUADRO 2 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações para identificação genotípica de *Rickettsia* spp. e *Coxiella burnetii*.

Par de "primers" e gene alvo	Especificidade	Sequência de oligonucleotídeos (5'-3')	Produto amplificado (pb*)	Ref.
<i>gltA</i>	Gênero <i>Rickettsia</i>			
CS-78 CS-323		F- GCAAGTATCGGTCAGGATGTAAT R- GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401	<i>Labruna et al., 2004a</i>
<i>OmpA</i>	Grupo da Febre Maculosa			
A1-190.70p A3-190.701		F- ATGGCGAATATTTCTCCAAAA R- GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	631	<i>Eremeeva et al., 1993</i>
<i>CAP</i>	Gênero <i>Coxiella</i>			
CAP844 CAP844		F- ATTTAGTGGGTTTCGCGCAT R- CATCAGCATACGTTTCGGGAA	601	<i>Reeves et al., 2006</i>

*pb (pares de bases)

O preparo dos reagentes da solução a ser utilizada na reação de amplificação de DNA de *Rickettsia* spp. e *C. burnetii* foi realizado conforme adaptações descritas na literatura (REEVES et al., 2006; ALMEIDA et al., 2013) (Quadro 3).

QUADRO 3 - Concentração dos reagentes utilizados na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) segundo os genes avaliados.

Reagentes	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>CAP</i>
Taq PCR Kit Master Mix Kit	-----	-----	12,5 µL
Tampão Buffer 10X	2,5 µL	2,5 µL	-----
Nucleotídeos trifosfatados (dNTP 1,25 mM)	4,0 µL	4,0 µL	-----
MgCl ₂ (50 mM)	0,75µL	0,75µL	-----
Primer 1- 10 (pmoles/µL)	1,25µL	1,25µL	1,25µL
Primer 2- 10 (pmoles/µL)	1,25µL	1,25µL	1,25µL
Taq (5000 U/mL)	0,25 µL	0,25 µL	-----
H ₂ O MiliQ q.s.p 50 µL	12,5 µL	12,5 µL	7,5 µL
Amostra de DNA	2,5 µL	2,5 µL	2,5 µL
Volume final	25 µL	25 µL	25 µL

A reação de amplificação foi realizada diferentemente para cada tipo de *primer*, conforme adaptação da técnica descrita na literatura (LABRUNA et al., 2004a; REEVES et al.; 2006) e está esquematizada no Quadro 4.

QUADRO 4 - Condições de amplificação das diferentes reações conforme os genes avaliados.

Etapas	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>CAP</i>
Desnaturação inicial	95°C/5 min	95°C/5 min	95°C/5 min
Número de ciclos	40	35	40
Desnaturação	95°C/30 seg	95°C/40 seg	95°C/ 1min
Anelamento	58°C/30 seg	58°C/30 seg	55°C/1min
Extensão	72°C/40 seg	72°C/45 seg	72°C/40 seg
Extensão final	72°C/7 min	72°C/10 min	72°C/10 min

4.7.3 Análises dos produtos amplificados

Para confirmação de DNA, 10 µl do produto amplificado acrescido de 2 µl de azul de bromofenol foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2%, em cuba horizontal com tampão de corrida TBE 0,5 x (0,045 M Tris-borato e 0,001 M EDTA, pH 8,0), sob voltagem de 100 V, durante aproximadamente 1 hora. Em seguida, foi corado com brometo de etídio (0,5 µl/mL por 30 minutos). A visualização das bandas foi realizada através de transluminador ultravioleta.

4.8 PURIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA

Sendo confirmada positividade da amostra pela PCR, o DNA amplificado foi purificado utilizando-se ExoSAP-IT (USB® Corporation), conforme instruções do fabricante (3 µl de ExoSAP e 7,5 µl de DNA amplificado), e submetidas ao sequenciamento de DNA utilizando-se o kit “Big Dye 3.1”, de acordo com as

especificações do fabricante [4 µl de DNA purificado - concentração máxima de 100 ng; 1 µl de água Mili Q; 0,75 µl de “Big Dye”; 1 µl de oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso específicos (5 pmoles/µl); e 3,5 µl de “save money”], em sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem Foster, CA), seguindo as recomendações do fabricante.

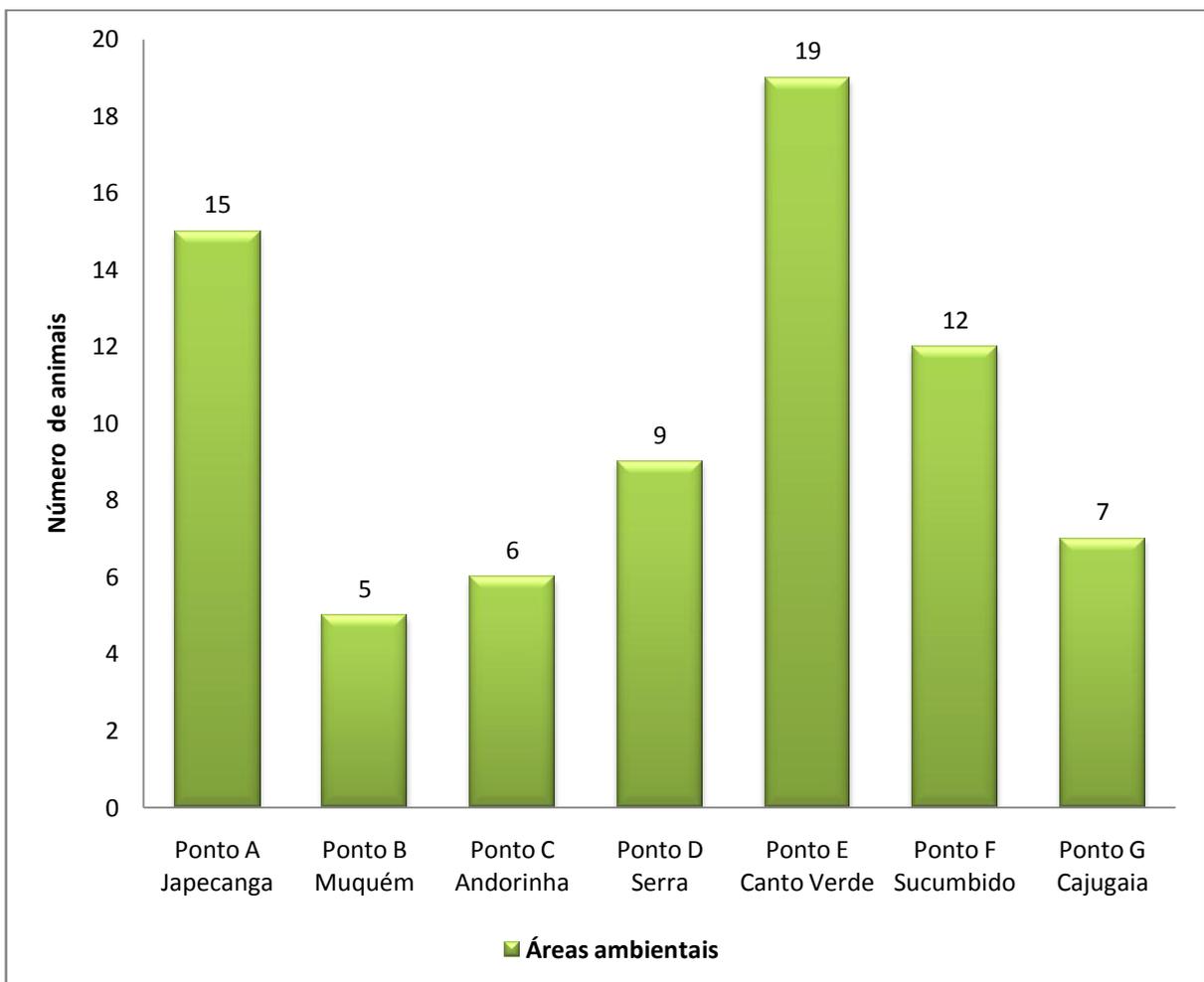
As sequências obtidas foram editadas em computador pelo programa de Software SeqMan (Lasergene, DNASTAR, Madison, Wis.) e submetidas a análise de similaridade por meio do programa Basic Local Alignment Search Tool (*Blast two sequences analysis*) para verificar a homologia com sequências correspondentes disponíveis no GenBank e desta forma obter a identificação genética dos produtos de PCR testados (ALTSCHUL et al., 1990).

5 RESULTADOS

5.1 MAMÍFEROS SILVESTRES CAPTURADOS

O esforço total de captura foi de 1.198 armadilhas/noite, sendo capturados 73 pequenos mamíferos silvestres, com sucesso de captura de 6,1%. Eventualmente, dois animais foram capturados por busca ativa, a qual consistiu na captura e contenção manual dos mesmos. As áreas com maior número de capturas foram Canto Verde, Japecanga e Sucumbido, respectivamente (Figura 4) e representaram 63% do total de capturas.

FIGURA 4 - Número de animais silvestres capturados nas áreas ambientais do PNSC, Piauí, 2013.



Foram capturados 75 indivíduos pertencentes a 4 ordens, 8 gêneros e 8 espécies de mamíferos silvestres (Tabela 1). Os dois animais capturados por busca ativa pertenciam a superordem Xenarthra: *Tolypeutes tricinctus*, chamado vulgarmente de Tatu bola (ordem Cingulata), e *Tamandua tetradactyla*, conhecido como Tamanduá mirim (ordem Pilosa) (Figura 5). Dos 73 animais capturados por meio de armadilhas, 63 (86,3%) eram roedores e 10 (13,7%) eram marsupiais. Dentre os roedores foram identificadas as espécies: *Thrichomys apereoides* (Punaré), *Galea spixii* (Preá), *Kerodon rupestris* (Mocó) e *Rhipidomys macrurus* (Figura 6). Os marsupiais identificados representaram as espécies: *Monodelphis domestica* (Cuíca do rabo curto) e *Gracilinanus agilis* (Cuíca graciosa) (Figura 7).

TABELA 1 - Ocorrência de mamíferos silvestres no Parque Nacional da Serra das Confusões, Piauí, 2013.

Ordem	Espécies	Nº de exemplares/total	Ocorrência (%)
Rodentia (n=63)	<i>Thrichomys apereoides</i>	51/63	80,9%
	<i>Rhipidomys macrurus</i>	6/63	9,5%
	<i>Galea spixii</i>	3/63	4,7%
	<i>Kerodon rupestris</i>	3/63	4,7%
	Total	63/73	86,3%
Marsupialia (n=10)	<i>Monodelphis domestica</i>	9/10	90,0%
	<i>Gracilinanus agilis</i>	1/10	10,0%
	Total	10/73	13,7%
Cingulata* (n=1)	<i>Tolypeutes tricinctus</i>	1/1	100%
	Total	1/1	100%
Pilosa* (n=1)	<i>Tamandua tetradactyla</i>	1/1	100%
	Total	1/1	100%

*Busca ativa (Superordem Xenarthra)

FIGURA 5 - Animais capturados por busca ativa. A - *Tolypeutes tricinctus* (Tatu bola); B - *Tamandua tetradactyla* (Tamanduá mirim). PNSC/PI, 2013. (Fonte: autor)

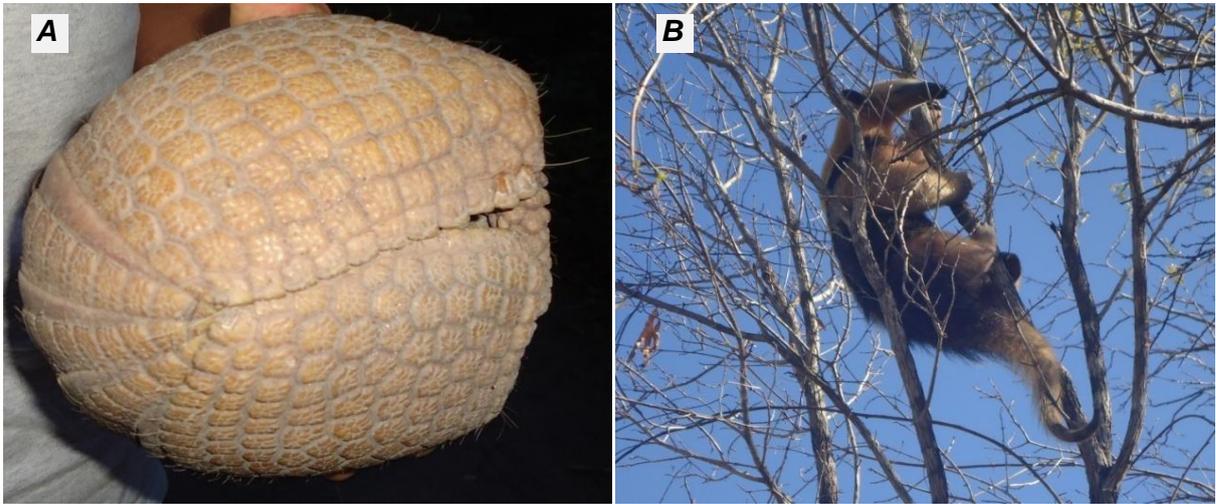


FIGURA 6 - Roedores capturados. A - *Thrichomys apereoides* (Punaré); B - *Galea spixii* (Preá); C - *Kerodon rupestris* (Mocó); D - *Rhipidomys macrurus*. PNSC/PI, 2013. (Fonte: autor)

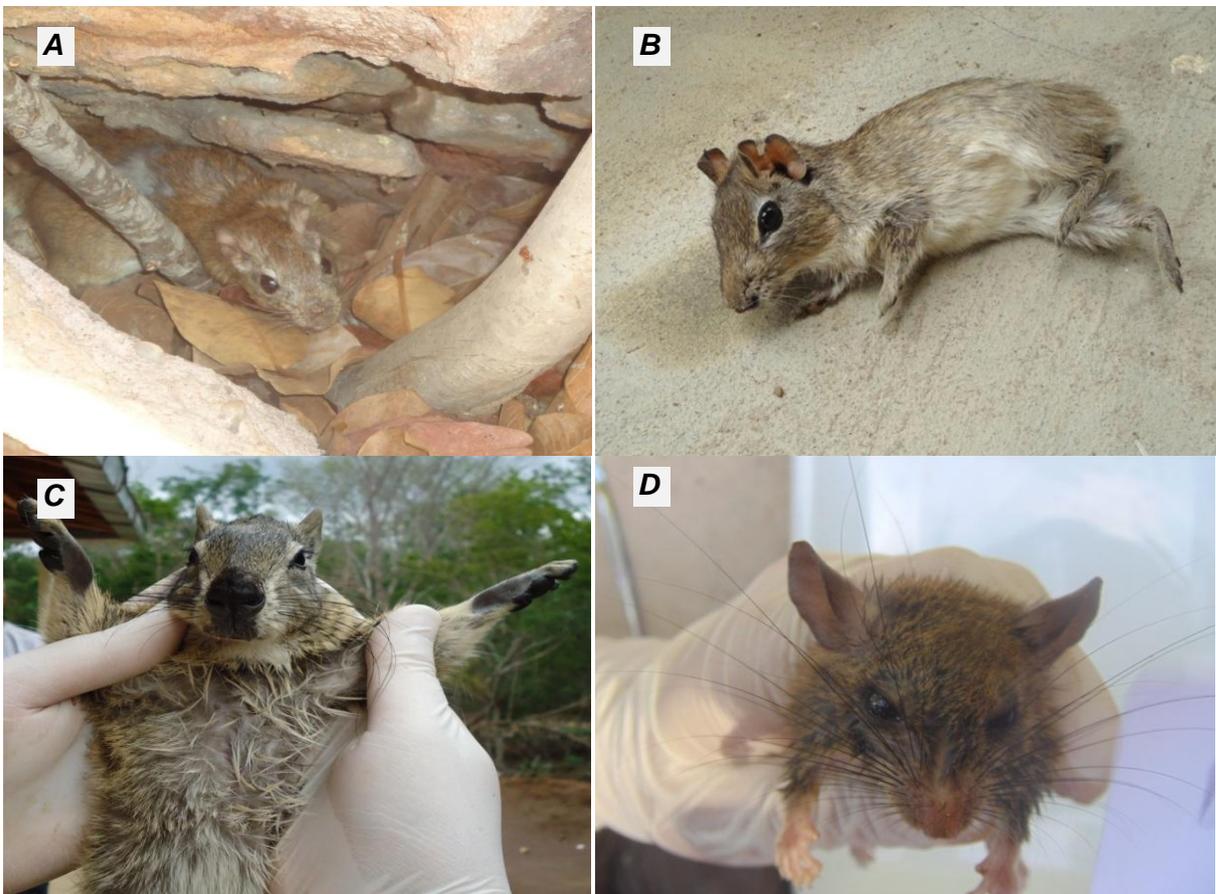
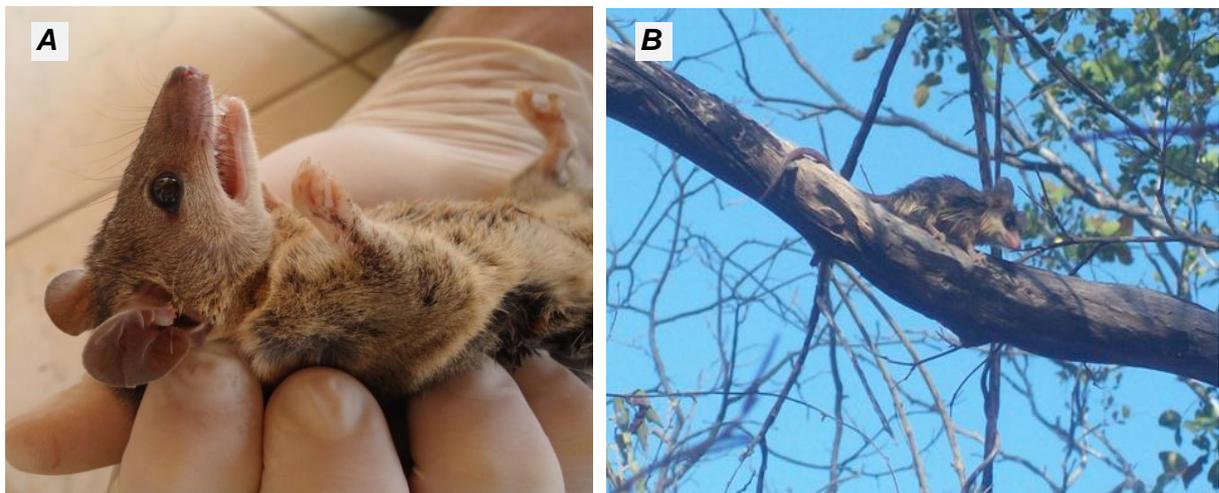


FIGURA 7 - Marsupiais capturados. A - *Monodelphis domestica* (Cuíca do rabo curto); B - *Gracilinanus agilis* (Cuíca graciosa). PNSC/PI, 2013. (Fonte: autor)



5.2 AMOSTRAGEM DE PEQUENOS RUMINANTES

O estudo avaliou amostras biológicas de 202 caprinos e 153 ovinos provenientes de diferentes localidades nas adjacências do PNSC (Tabela 2).

TABELA 2 - Número de pequenos ruminantes amostrados em localidades adjacentes ao PNSC, Piauí, 2013.

Localidades	Caprinos	Ovinos
Japecanga	10	30
Novo Araçá	23	7
Engenho Novo	8	7
Barreiro	11	0
Cajueiro	24	8
Capim	38	0
Mundo Novo	9	59
Serrinha	16	0
Pendangas	63	42
TOTAL	202	153

A relação encontrada entre machos e fêmeas nas espécies caprina e ovina foi de 32/170 e 23/130, respectivamente. Com relação à faixa etária dos animais, 55,4% (112/200) dos caprinos e 50,3% (77/153) dos ovinos, encontrava-se com idades entre 1 a 3 anos (Tabela 3). Todos os animais avaliados, de ambas as espécies, não possuíam padrão racial definido.

TABELA 3 - Faixa etária e ocorrência de caprinos e ovinos amostrados no PNSC, Piauí, 2013.

Faixa etária	Ocorrência nos caprinos (%)	Ocorrência nos ovinos (%)
< 1 ano	23,7% (48/200*)	19,6% (30/153)
1 a 3 anos	55,4% (112/200*)	50,3% (77/153)
3 a 5 anos	14,3% (29/200*)	24,8% (38/153)
> 5 anos	5,4% (11/200*)	5,2% (8/153)

*Não foram obtidas informações sobre a faixa etária de 2 caprinos

5.3 OCORRÊNCIA E IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS

Foram coletados 297 carrapatos parasitando diferentes espécies de mamíferos silvestres, pequenos ruminantes e humanos, bem como carrapatos de vida livre, sendo obtidos: 54 larvas, 120 ninfas e 123 carrapatos adultos. Foram identificadas 4 espécies de carrapatos ixodídeos: *Amblyomma auricularium* (70), *Amblyomma parvum* (18), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (56) e *Rhipicephalus sanguineus* (15), bem como 12 espécimes do gênero *Amblyomma* em estágio larval. Também foram identificados 126 carrapatos argasídeos pertencentes ao gênero *Ornithodoros*.

Dos 97 carrapatos capturados em vida livre, 79 foram identificados como *Ornithodoros* sp. (encontrados em abrigos de mocó e morcegos), 15 como *R. sanguineus* (encontrados próximos aos centros de apoio do ICMBio, onde foi

averiguado o trânsito de cães domésticos) e 3 como *A. parvum* (encontrados sobre as roupas de humanos).

Durante a pesquisa de campo foram coletados 14 carrapatos parasitando humanos, dos quais 12 foram identificados como *A. parvum* e 2 como *Ornithodoros* sp.

Com relação aos pequenos ruminantes, a taxa de parasitismo verificada em ovinos foi de 7,8% (12/153), sendo todos os carrapatos identificados como *Rhipicephalus (B) microplus*, os quais se apresentavam em diferentes estágios parasitários, sendo 2 larvas, 20 ninfas, 32 fêmeas e 2 machos. Não foi observado parasitismo por carrapatos em caprinos.

Os resultados apresentados acima encontram-se inseridos na Tabela 4.

TABELA 4 - Espécies de carrapatos identificadas em hospedeiros silvestres, domésticos, humanos e vida livre na região do PNSC, Piauí, 2013.

Espécie de carrapato	Hospedeiro	Estágio			TOTAL
		L	N	A	
<i>Amblyomma</i> sp.	<i>Thrichomys apereoides</i>	12	0	0	12
<i>A. auricularium</i>	<i>Tolypeutes tricinctus</i>	0	0	42 (13F/29M)	42
	<i>Galea spixii</i>	0	3	0	3
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	0	14	1 (1M)	15
	<i>Thrichomys apereoides</i>	1	9	0	10
<i>A. parvum</i>	<i>Thrichomys apereoides</i>	0	3	0	3
	<i>Homo sapiens</i>	0	0	12 (8F/4M)	12
	Vida livre	0	0	3 (1F/2M)	3
<i>Ornithodoros</i> sp.	<i>Kerodon rupestris</i>	16	1	0	17
	<i>Thrichomys apereoides</i>	23	4	1 (1F)	28
	<i>Homo sapiens</i>	0	2	0	2
	Vida livre	0	64	15 (7F/8M)	79
<i>R. (Boophilus) microplus</i>	<i>Ovis Aires</i>	2	20	34 (32F/2M)	56
<i>R. sanguineus</i>	Vida livre	0	0	15 (11F/4M)	15
TOTAL		54	120	123 (73F/50M)	297

* L = larva, N = ninfa, A = adulto, F = fêmea, M = macho

A taxa de parasitismo por carrapatos encontrada em mamíferos silvestres foi de 37,3% (28/75), sendo coletados 130 carrapatos em estágios imaturos e adultos. Nestes animais foram identificados os carrapatos *A. auricularium*, *A. parvum*, *Amblyomma* sp. e *Ornithodoros* sp.. O ectoparasitismo por *A. auricularium* foi observado nas espécies *T. tricinctus*, *T. tetradactyla* e roedores *T. apereoides*. O carrapato *A. parvum* foi verificado apenas em estágios imaturos parasitando a espécie *T. apereoides*. Foi identificada a presença de carrapatos do gênero *Ornithodoros* em *T. apereoides* e *K. rupestris*, estando a maioria em fase de larva e ninfa. Os carrapatos adultos corresponderam a 44 exemplares, os quais representaram principalmente a espécie *A. auricularium*. Não foi verificado parasitismo em *R. macrurus*, bem como nas espécies de marsupiais (Tabela 5).

TABELA 5 - Presença de carrapatos em fase parasitária em mamíferos silvestres capturados no PNSC, Piauí, 2013.

Espécie Animal	Carrapato	Estágio			TOTAL
		Larva	Ninfa	Adulto	
<i>Tolypeutes tricinctus</i> (1/1)	<i>A. auricularium</i>	0	0	29M/13F	42
<i>T. apereoides</i> (21/51)	<i>Amblyomma</i> sp.	12	0	0	12
	<i>A. auricularium</i>	1	9	0	10
	<i>A. parvum</i>	0	3	0	3
	<i>Ornithodoros</i> sp.	23	4	1F	28
<i>Galea spixii</i> (2/3)	<i>A. auricularium</i>	0	3	0	3
<i>Kerodon rupestris</i> (3/3)	<i>Ornithodoros</i> sp.	16	1	0	17
<i>Rhipidomys macrurus</i> (0/6)	-	-	-	-	-
<i>M. domestica</i> (0/9)	-	-	-	-	-
<i>Gracilinanus agilis</i> (0/1)	-	-	-	-	-
<i>T. tetradactyla</i> (1/1)	<i>A. auricularium</i>	0	14	1M	15
TOTAL		52	34	44	130

*(n/p): n = número de animais com carrapato; p = número de animais capturados

5.4 REAÇÃO DE IMUNOFUORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI)

Das 73 amostras de pequenos mamíferos silvestres, 8,2% (6/73) foram sororeagentes para *R. rickettsii*, com títulos de 64 e 128 (Tabela 7). A presença de anticorpos anti-*R. rickettsii* foi observada nas espécies de roedores: *T. apereoides* (7,8%, 4/51), *G. spixii* (33,3%, 1/3) e *R. macrurus* (16,6%, 1/6). Não foi detectada soropositividade para *R. rickettsii* nas amostras de caprinos e ovinos. As 73 amostras de pequenos mamíferos silvestres e de 202 caprinos foram soronegativas para *C. burnetii*. Foi detectada a presença de anticorpos anti-*C. burnetii* na espécie ovina. Das 153 amostras sorológicas de ovinos, três foram soropositivas, apresentando percentual de soropositividade de 2% (3/153) e com títulos variando de 64 a 4.096 (Tabela 8). Os resultados acima estão demonstrados na Tabela 6.

TABELA 6 - Percentual de soropositividade de mamíferos silvestres e pequenos ruminantes frente à *Rickettsia rickettsii* e *Coxiella burnetii* pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), PNSC, Piauí, 2013.

Hospedeiro	n	<i>R. rickettsii</i> , No. (%)	<i>C. burnetii</i> , No. (%)
Pequenos mamíferos			
<i>Thrichomys apereoides</i>	51	4 (7,8)	0
<i>Rhipidomys macrurus</i>	6	1 (16,6)	0
<i>Galea spixii</i>	3	1 (33,3)	0
<i>Kerodon rupestris</i>	3	0	0
<i>Monodelphis domestica</i>	9	0	0
<i>Gracilinanus agilis</i>	1	0	0
Pequenos ruminantes			
<i>Ovis aires</i>	153		3 (2)
<i>Capra hircus</i>	202		0

TABELA 7 - Títulos finais de reatividade apresentados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos brutos de *Rickettsia rickettsii* em soros de mamíferos silvestres no PNSC, Piauí, 2013.

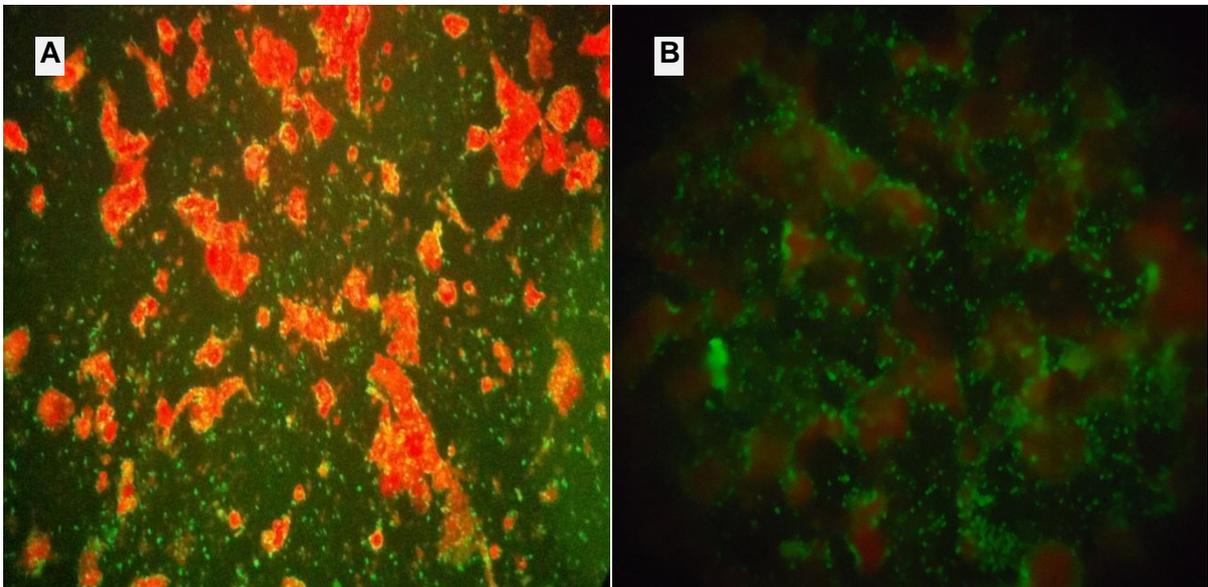
ID	Espécie	Área ambiental	Títulos <i>Rickettsia rickettsii</i>
SC2	<i>G. spixii</i>	Cajugaia	128
SC3	<i>T. apereoides</i>	Cajugaia	128
SC20	<i>T. apereoides</i>	Sucumbido	128
SC27	<i>R. macrurus</i>	Andorinha	128
SC29	<i>T. apereoides</i>	Andorinha	64
SC64	<i>T. apereoides</i>	Canto Verde	64

TABELA 8 - Títulos finais de reatividade apresentados pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos de *Coxiella burnetii* em soros de ovinos em localidades rurais no entorno do PNSC, Piauí, 2013.

Ovinos	Localidade	Títulos <i>Coxiella burnetii</i>
OVI51	Japecanga	64
OVI52	Japecanga	128
OVI53	Mundo Novo	4.096

Na figura 8 encontra-se o registro fotográfico de lâminas positivas para *R. rickettsii* e *C. burnetii* pela RIFI. As bactérias encontram-se marcadas com isotiocianato de fluoresceína (FITC), podendo ser observadas formas cocobacilares de ambas as bactérias, visualizadas pela fluorescência emitida. A dimensão da bactéria *C. burnetii* é ligeiramente menor quando comparada com as espécies de *Rickettsia* spp., porém muito semelhantes morfológicamente.

FIGURA 8 - Amostras positivas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A - Soro de roedor silvestre reagente ao antígeno de *R. rickettsii*; B - Soro de ovino reagente ao antígeno de *C. burnetii*.

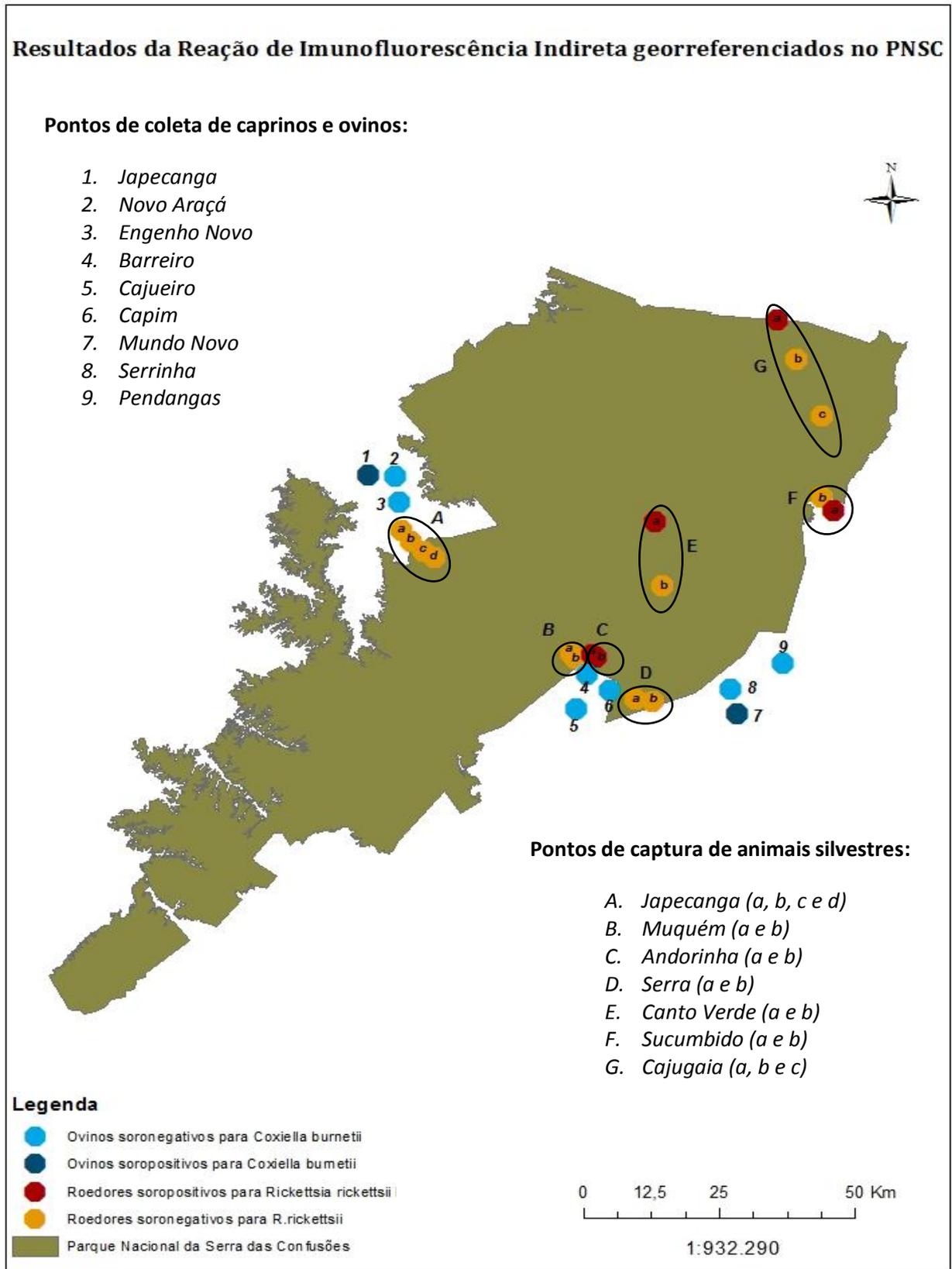


* Diluição 1/64. 400x

5.5 GEORREFERENCIAMENTO DA INFECÇÃO POR *R. rickettsii* E *C. burnetii*

As áreas ambientais e as localidades no entorno do PNSC, onde foi constatado pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) amostras positivas para *R. rickettsii* e *C. burnetii*, foram georreferenciadas e estão demonstradas na figura 9.

FIGURA 9 - Localização das áreas ambientais positivas para *R. rickettsii* e das localidades rurais positivas para *C. burnetii*. PNSC, Piauí, 2013.



5.6 REAÇÃO EM CADEIA PELA POLIMERASE (PCR)

5.6.1 Sangue

Todas as 75 amostras de sangue de mamíferos silvestres testadas pela Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) apresentaram resultados negativos para os genes *gltA* (*Rickettsia* spp.) e *CAP* (*Coxiella burnetii*).

5.6.2 Carrapatos

Para detecção de DNA de *Rickettsia* spp. e *C. burnetii*, amostras de 101 carrapatos oriundos de mamíferos silvestres, pequenos ruminantes, humanos e de vida livre (VL), foram submetidas à PCR, onde foram avaliadas para os genes *gltA*, *ompA* e *CAP* (Tabela 13).

Gene *gltA*

Os resultados obtidos demonstraram que 27,7% (28/101) dos carrapatos foram positivos para o gene citrato cintase (*gltA*). Foi verificada positividade para o referido gene em: *A. auricularium* (19), *R. sanguineus* (1), *Ornithodoros* sp. (7) e *A. parvum* (1). Todos os 25 carrapatos *R. (B.) microplus* coletados em ovinos apresentaram resultados negativos.

Gene *ompA*

Os carrapatos positivos para o gene *gltA* foram submetidos a uma nova PCR para análise do gene *ompA*. Os resultados demonstraram que dos 28 carrapatos positivos para o gene *gltA*, 14 (50%) foram positivos para o gene *ompA*, sendo observada positividade apenas em carrapatos da espécie *A. auricularium*.

Gene *CAP*

Com exceção de um carrapato de VL positivo na PCR para o gene *CAP* da bactéria *C. burnetii*, todos os outros foram negativos na PCR para este gene.

TABELA 9 - Número e percentual total de carrapatos positivos na Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para os genes pesquisados.

Hospedeiro	Nº de carrapatos testados	Espécie	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>CAP</i>
<i>Tolypeutes tricinctus</i>	27	<i>A. auricularium</i>	13	9	0
<i>Tamandua tetradactyla</i>	10	<i>A. auricularium</i>	4	4	0
<i>Trichomys apereoides</i>	6	<i>A. auricularium</i>	2	1	0
	2	<i>A. parvum</i>	0	0	0
	12	<i>Ornithodoros</i> sp.	5	0	0
<i>Kerodon rupestris</i>	3	<i>Ornithodoros</i> sp.	0	0	0
<i>Ovis aires</i>	25	<i>R. (B) microplus</i>	0	0	0
<i>Homo sapiens</i>	7	<i>A. parvum</i>	1	0	0
	1	<i>Ornithodoros</i> sp.	1	0	0
VL	5	<i>R. sanguineus</i>	1	0	1
	3	<i>Ornithodoros</i> sp.	1	0	0
Total	101		28/101 (27,7%)	14/28 (50,0%)	1/101 (0,99%)

5.7 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Das 43 amostras positivas na PCR (28 para o gene *gltA*, 14 para o gene *ompA* e 1 para o gene *CAP*) todas foram submetidas à análise de sequenciamento. Foram encontrados resultados satisfatórios em 19 amostras sequenciadas. Destas, 10 amostras oriundas de carrapatos *A. auricularium* apresentaram similaridades variando entre 99,6-100% com *R. amblyommii* (CP003334.1) e 1 amostra revelou 98,7% de similaridade com *R. bellii* (CP000087.1). Uma amostra de *A. parvum* apresentou similaridade de 100% com *Candidatus R. andeanae* (GU169051.1). Das amostras de *Ornithodoros* sp., 4 apresentaram similaridades variando entre 98,4-98,9% com *Rickettsia parkeri* (CP003341.1), 2 amostras apresentaram respectivamente similaridades de 99,5 e 99,1% com *R. amblyommii* (CP003334.1/DQ517290.1) e 1 amostra foi 97,2% homóloga a *Rickettsia bellii*

(CP000087.1). A sequência do fragmento de DNA proveniente do carrapato positivo (*Rhipicephalus sanguineus*) para *C. burnetii* pela PCR não gerou resultado satisfatório, não apresentado resultados de similaridade pelo Blast. Os resultados acima estão demonstrados na tabela 10.

TABELA 10 - Sequenciamento de produtos de PCR positivas de acordo com o vetor e animal de origem.

Amostras	Carrapato	Estágio	ID	Espécie animal	Gene	Similaridade	Espécie Provável
R10	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC62	<i>T. tetradactyla</i>	<i>ompA</i>	(527/528-99,8%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R11	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC62	<i>T. tetradactyla</i>	<i>ompA</i>	(526/528-99,6%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R12	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC62	<i>T. tetradactyla</i>	<i>ompA</i>	(525/526-99,8%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R13	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC62	<i>T. tetradactyla</i>	<i>ompA</i>	(527/528-99,8%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R14	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC17	<i>T. apereoides</i>	<i>ompA</i>	(524/526-99,6%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R28	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC62	<i>T. tetradactyla</i>	<i>gltA</i>	(399/399-100%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R29	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC62	<i>T. tetradactyla</i>	<i>gltA</i>	(397/397-100%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R30	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC62	<i>T. tetradactyla</i>	<i>gltA</i>	(397/397-100%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R31	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC62	<i>T. tetradactyla</i>	<i>gltA</i>	(341/341-100%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R32	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC17	<i>T. apereoides</i>	<i>gltA</i>	(399/399-100%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R33	<i>A. auricularium</i>	ninfa	SC32	<i>T. apereoides</i>	<i>gltA</i>	(386/391-98,7%)	<i>R. bellii</i> (CP000087.1)
R34	<i>A. parvum</i>	macho	H13	Humano	<i>gltA</i>	(148/148-100%)	<i>R. andeanae</i> (GU169051.1)
R36	<i>Ornithodoros</i> sp.	ninfa	SC32	<i>T. apereoides</i>	<i>gltA</i>	(395/400-98,5%)	<i>R. parkeri</i> (CP003341.1)
R37	<i>Ornithodoros</i> sp.	larva	SC39	<i>T. apereoides</i>	<i>gltA</i>	(393/398-98,4%)	<i>R. parkeri</i> (CP003341.1)
R38	<i>Ornithodoros</i> sp.	ninfa	SC50	<i>T. apereoides</i>	<i>gltA</i>	(236/237-99,5%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)
R39	<i>Ornithodoros</i> sp.	macho	SC53	<i>T. apereoides</i>	<i>gltA</i>	(393/400-98,7%)	<i>R. parkeri</i> (CP003341.1)
R40	<i>Ornithodoros</i> sp.	ninfa	SC69	<i>T. apereoides</i>	<i>gltA</i>	(382/393-97,2%)	<i>R. bellii</i> (CP000087.1)
R42	<i>Ornithodoros</i> sp.	ninfa	H5	Humano	<i>gltA</i>	(395/399-98,9%)	<i>R. parkeri</i> (CP003341.1)
R43	<i>Ornithodoros</i> sp.	ninfa	VL7	Vida livre	<i>gltA</i>	(238/240-99,1%)	<i>R. amblyommii</i> (CP003334.1)

O grau de identidade das amostras avaliadas com as espécies de riquetsias relatadas no Brasil foi calculado e encontra-se inserido na tabela 11.

TABELA 11 - Grau de identidade calculado para cada sequência de nucleotídeos entre as sequências avaliadas e as sequências de *Rickettsia* spp. disponíveis no GenBank, 2014.

Gene	Amostra	<i>R.</i> <i>rickettsii</i>	<i>R.</i> <i>amblyommii</i>	<i>R.</i> <i>rhipicephali</i>	<i>R.</i> <i>parkeri</i>	<i>R.</i> <i>andeanae</i>	<i>R.</i> <i>bellii</i>	<i>R parkeri</i> <i>cepa- M.</i> <i>Atlântica</i>
<i>ompA</i>	R10	-	99,8%	-	-	-	-	-
	R11	-	99,6%	-	-	-	-	-
	R12	-	99,8%	-	-	-	-	-
	R13	-	99,8%	-	-	-	-	-
	R14	-	99,6%	-	-	-	-	-
<i>gltA</i>	R28	97,7%	100%	97,4%	97,9%	97,7%	-	-
	R29	97,7%	100%	-	97,9%	97,7%	-	-
	R30	97,7%	100%	-	97,9%	97,7%	-	-
	R31	-	100%	-	97,9%	97,9%	-	-
	R32	97,9%	100%	97,4%	97,9%	97,7%	-	-
	R33	-	-	-	88,5%	-	98,7%	-
	R34	-	99,3%	-	99,3%	100%	-	99,3%
	R36	98,2%	-	98%	98,5%	98,2%	-	-
	R37	98,2%	-	97,9%	98,4%	98,2%	-	-
	R38	96,6%	99,5%	-	-	96,2%	-	-
	R39	98,4%	-	-	98,7%	98,5%	-	-
	R40	-	-	-	88,5%	-	97,2%	-
	R42	98,4%	-	98,2%	98,7%	98,4%	-	-
R43	-	99,1%	-	98,7%	98,7%	-	98,7%	

6 DISCUSSÃO

A escolha do PNSC como local de estudo consistiu em estudar uma área do bioma Caatinga pouco explorada e na qual não existem registros da ocorrência de Febre Maculosa e Febre Q, enfermidades causadas respectivamente pelas bactérias do gênero *Rickettsia* spp. e pela *C. burnetii*. Ainda que não haja casos de Febre Maculosa e Febre Q notificados no estado do Piauí, casos de febre maculosa foram confirmados na região nordeste do Brasil, nos estados da Bahia e Ceará (BRASIL, 2014b). Esses estudos são fundamentais para ampliar as pesquisas sobre essas doenças em diferentes regiões geográficas do país, dado a importância das mesmas para medicina veterinária e humana. Na epidemiologia dessas doenças os animais silvestres apresentam relevante papel, pois muitas vezes são os responsáveis pela manutenção de agentes patogênicos na natureza. De acordo com Milagres et al. (2013), os pequenos mamíferos silvestres constituem um grupo ecológico importante, tanto do ponto de vista da abundância e diversidade de espécies, quanto por apresentarem alta capacidade de adaptação aos diferentes ecossistemas, sendo considerados importantes reservatórios de patógenos que podem infectar o homem e os animais domésticos.

O estudo da fauna de animais silvestres em ambientes preservados tem possibilitado a elucidação de componentes indispensáveis em diferentes cadeias epidemiológicas de enfermidades com potencial zoonótico, sendo de grande relevância o conhecimento das espécies animais que habitam esses ecossistemas.

Dantas-Torres et al. (2012), estudando a exposição de pequenos mamíferos silvestres aos carrapatos e riquétsias em fragmentos florestais de Mata Atlântica, no estado de Pernambuco, obtiveram um esforço de captura de 25.231 armadilhas, embora o sucesso de captura obtido (1,7%) tenha sido inferior ao encontrado no presente estudo.

Foram capturados animais em todos os pontos de coleta dentro do PNSC. O maior número de espécimes capturados ocorreu em Canto Verde e o menor número em Muquém. O menor número de capturas em determinada época pode estar relacionado, dentre outros fatores, a uma menor atratividade dos animais pelas iscas no período de maior disponibilidade de alimentos (VIEIRA, 1997). Além disso,

características ambientais relacionadas ao habitat são importantes na distribuição de pequenos mamíferos (GENTILE; FERNANDEZ, 1999). O sucesso de captura total muitas vezes está relacionado a uma maior ou menor disponibilidade de recursos nas áreas de mata do bioma Caatinga.

A pesquisa possibilitou conhecer, em parte, a fauna de pequenos mamíferos silvestres (roedores e marsupiais), bem como a oportunidade de avaliar dois animais capturados por busca ativa. A maioria dos roedores capturados foi identificada como da espécie *Thrichomys apereoides* (80,9%). Dentre os marsupiais a espécie *Monodelphis domestica* foi a mais representativa (90%).

A ocorrência desses animais nas áreas do parque é um indicativo da qualidade ambiental e da diversidade faunística de pequenos mamíferos silvestres dessa área. A análise de material biológico dessas espécies consistiu em uma importante ferramenta para o conhecimento da ocorrência da infecção pelas bactérias *Rickettsia* spp. e *C. burnetii* na região do PNSC.

Os pequenos ruminantes avaliados no presente estudo encontravam-se em propriedades rurais no entorno do PNSC. Essa população animal formada por rebanhos caprinos e ovinos é criada em regime extensivo ou semi-extensivo, tendo acesso direto às áreas de Caatinga, limitantes à divisão do parque, mantendo contato com outros animais e estando expostos a ectoparasitas e patógenos existentes no meio silvestre. Segundo Szabó et al. (2001), animais domésticos que entram em áreas de mata ou compartilham o mesmo ambiente com a fauna silvestre podem apresentar infestações mistas por diferentes espécies de carrapatos. Desta forma, o encontro de nichos ecológicos distintos pode favorecer a difusão de parasitas e patógenos entre populações de animais domésticos, silvestres e o homem (PEREZ et al., 2008).

Os carrapatos são responsáveis pela transmissão de patógenos para animais e humanos, além disso, são importantes reservatórios de *Rickettsia* spp. e *C. burnetii* na natureza. Segundo Labruna et al. (2009), essa capacidade deve-se ao fato de que em todos os estágios evolutivos esses artrópodes podem permanecer infectados por longos períodos à espera de um hospedeiro suscetível.

No presente estudo foram coletados 297 carrapatos provenientes de diferentes hospedeiros, bem como encontrados em vida livre. A taxa de parasitismo

encontrada em mamíferos silvestres correspondeu a 37,3% (28/75), sendo que estes animais estavam infestados pelos carrapatos *Amblyomma auricularium*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma* sp. e *Ornithodoros* sp.. Dantas-Torres et al. (2012) encontraram ocorrência de parasitismo em 88,4% (382/432) dos pequenos mamíferos silvestres capturados em áreas de Mata Atlântica no estado de Pernambuco, os quais estavam parasitados pelas espécies *Amblyomma fuscum*, *Ixodes loricatus*, *Amblyomma dubitatum* e *Haemaphysalis leporispalustris*. Essas espécies de carrapatos não foram encontradas nas áreas do PNSC, entretanto observou-se a presença do gênero *Amblyomma*, o que demonstra a adaptação dos carrapatos deste gênero a ambientes naturais diferentes.

Os carrapatos da família Ixodidae são os principais transmissores de patógenos para os animais vertebrados, eles possuem elevadas taxas reprodutivas, podendo ser transportados a grandes distâncias pelos seus hospedeiros (RAOULT et al., 2005). Sendo assim, animais silvestres participam na disseminação e adaptação dos carrapatos a diferentes nichos ambientais (PEREZ et al., 2008).

Embora muitos estudos não enfatizem a importância ambiental na relação existente entre espécies de carrapatos, na sua adaptação e manutenção em microhabitats distintos, sabe-se que na grande maioria das vezes o ambiente tem um papel crucial na sobrevivência e manutenção desses ectoparasitas (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Em algumas áreas o estabelecimento de uma determinada espécie de carrapato muitas vezes está condicionado às características microclimáticas, que propiciem condições adequadas de temperatura, umidade, cobertura vegetal e presença de hospedeiro para o seu desenvolvimento (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). O ciclo de vida dos vetores, assim como dos seus reservatórios e hospedeiros está fortemente relacionado à dinâmica ambiental dos ecossistemas onde estes habitam (BARCELLOS et al., 2009).

O bioma Caatinga contém uma grande diversidade de fauna e flora e encontra-se inserido exclusivamente em território brasileiro. No entanto, o conhecimento sobre a fauna de carrapatos deste bioma é escasso e poucas são as informações sobre o parasitismo por esses artrópodes, especialmente em animais silvestres. O conhecimento sobre carrapatos em ambientes selvagens é muito útil

quando se analisa a ecologia, distribuição, relações com os hospedeiros e conseqüentemente a transmissão de patógenos (HORTA et al., 2011).

A maior parte dos mamíferos silvestres capturados no presente estudo encontrava-se parasitada por *A. auricularium*. A infestação por *A. auricularium* foi constatada em tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*), tatu-bola (*Tolypeutes tricinctus*), punaré (*Thrichomys apereoides*) e preá (*Galea spixii*). Fonseca et al. (2013) encontraram *A. auricularium* em tatu-galinha (*Dasypus novemcinctus*) no estado do Ceará. Horta et al. (2011) relataram no estado de Pernambuco a infestação de *A. auricularium* em tatu amarelo (*Euphractus sexcinctus*), preá (*Galea spixii*), punaré (*Thrichomys apereoides*), cuíca do rabo curto (*Monodelphis domestica*) e porco de nariz listrado (*Conepatus semistriatus*).

No Brasil, *A. parvum* foi encontrado principalmente associado ao parasitismo em animais silvestres. Martins et al. (2004) observaram a presença deste carrapato em tamanduá bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*). Cançado et al. (2008) observaram parasitismo por *A. parvum* em pequenos roedores do gênero *Thrichomys*. Em áreas de Caatinga, no estado de Pernambuco, Horta et al. (2011) encontraram ninfas de *A. parvum* em *Galea spixii* e *Thrichomys apereoides*. Os achados destes estudos corroboram com os dados encontrados no presente trabalho, em que foi verificado *A. parvum* parasitando *T. apereoides*.

Com relação aos pequenos ruminantes, não foi observado parasitismo por carrapatos na espécie caprina, entretanto os ovinos encontravam-se parasitados. A taxa de parasitismo verificada nos ovinos correspondeu a 7,8%, estando estes infestados pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ("carrapato do boi"). *R. (B) microplus* é o principal carrapato que afeta o rebanho bovino brasileiro, a presença desta espécie em ovinos pode ser explicada pelo parasitismo acidental, oriundo do convívio deste hospedeiro com bovinos em áreas rurais (SZABÓ, et al., 2001). Os ovinos encontrados no presente estudo, parasitados pelo *R. (B) microplus*, mantinham contato ou compartilhavam seu "habitat" com bovinos, hospedeiros primários desta espécie de carrapato. O ectoparasitismo por carrapatos em animais de produção está associado a perdas econômicas, relacionadas à manifestação de doenças, bem como ao efeito direto da infestação desses vetores,

resultantes de lesões cutâneas e espoliação sanguínea (FONSECA; FERREIRA; AHID, 2009).

A taxa de parasitismo verificada nos ovinos foi superior a encontrada por Suassuna-Bezerra et al. (2010), onde avaliando a presença de ectoparasitas em caprinos e ovinos no município de Mossoró, RN, verificaram a infestação dos animais por duas espécies de carrapatos: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *A. parvum*, com ocorrência em caprinos de 1,01% de ambas as espécies, e em ovinos de 0,86% de *Rhipicephalus (B) microplus* e de 0,43% de *A. parvum*, demonstrando assim a coexistência de dois gêneros de carrapatos em um mesmo hospedeiro. Poucos são os relatos de parasitismo por *A. parvum* em animais domésticos. Szabó et al. (2007) observaram esta espécie de carrapato parasitando búfalos, cães e equinos em áreas de Cerrado. Cançado et al. (2008) também registraram a ocorrência de *A. parvum* em cães e bovinos em áreas do Pantanal Sul Matogrossense.

Embora não tenha sido identificada no presente estudo a infestação de pequenos ruminantes por *A. parvum*, a proximidade dos locais de criação de caprinos e ovinos com as áreas do parque, bem como o fato destes animais adentrarem na mata, podem levar a uma possível infestação dos rebanhos por essa espécie de carrapato, principalmente em seus estágios imaturos (larvas e ninfas), os quais apresentam baixa especificidade parasitária. É importante ressaltar que o *A. parvum* pode parasitar uma variedade de hospedeiros vertebrados e que a susceptibilidade do hospedeiro é uma característica relevante, mas responde apenas uma parte da complexa epidemiologia das doenças zoonóticas. De acordo com Olegário et al. (2011), a ocorrência e a distribuição do *A. parvum* se deve muito mais a fatores relacionados ao ambiente do que aos ligados ao próprio hospedeiro.

A febre maculosa é uma importante zoonose causada por bactérias do gênero *Rickettsia* e transmitidas por artrópodes hematófagos, principalmente pelos carrapatos (LABRUNA et al., 2011). A maior parte dos trabalhos realizados no Brasil sobre Febre Maculosa e das relações existentes entre espécies de *Rickettsia*, carrapato vetor e hospedeiros concentram-se principalmente na região sudeste, onde várias notificações da doença foram realizadas, principalmente no estado de São Paulo, considerada região endêmica da febre maculosa no país (MORAES-

FILHO et al., 2009; BRASIL, 2014b). Pesquisas de bactérias do gênero *Rickettsia* são necessárias para compreender quais espécies estão presentes em uma região, mostrar a sua distribuição e delimitar o risco potencial para a saúde animal e humana.

Dados sobre a sorologia dos potenciais hospedeiros fornecem elementos fundamentais para interpretação do ciclo epidemiológico da febre maculosa. No entanto, é difícil estimar a real prevalência da infecção por *R. rickettsii* por meio de provas sorológicas, devido à possibilidade de reações cruzadas com outras espécies de riquetsias do GFM, havendo necessidade de outras técnicas mais específicas (DANTAS-TORRES, 2008).

No presente estudo amostras de soros de pequenos mamíferos silvestres e pequenos ruminantes foram analisadas com a finalidade de detectar a ocorrência de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* pela RIFI.

A pesquisa revelou a presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em 8,2% (6/73) dos pequenos mamíferos silvestres, sendo a espécie *T. apereoides* a que apresentou maior frequência de animais soropositivos. Dantas-Torres et al. (2012) encontraram prevalência de *Rickettsia* spp. em 68,8% dos pequenos mamíferos silvestres encontrados em áreas de Mata Atlântica, Pernambuco. Milagres et al. (2013) verificaram soropositividade para *R. rickettsii* em 28,2% (11/39) dos roedores silvestres capturados em Santa Cruz do Escalvado e em 23% (9/39) dos roedores capturados em Pingo D'água, Minas Gerais. De acordo com Piranda et al. (2008), a presença de animais sororeagentes indica a circulação de riquetsias do GFM, em uma determinada área, pelo menos nos últimos 6-12 meses. Deste modo, resultados sorológicos positivos não indicam necessariamente uma infecção recente, mas confirmam a circulação do agente. Os resultados obtidos indicaram a exposição de pequenos roedores silvestres às bactérias do GFM, sugerindo à participação desses animais na manutenção do ciclo epidemiológico de riquetsias nessa área do Brasil. A presença de anticorpos em pequenos roedores, como *Thrichomys apereoides*, *Galea spixii* e *Kerodon rupestris* indica condições favoráveis para o desenvolvimento e reprodução riquetsial nesses animais.

Pequenos mamíferos silvestres têm sido implicados nos ciclos de transmissão de muitos agentes patogênicos transmitidos por carrapatos (DANTAS-

TORRES et al., 2012). Esses animais possuem dispersão limitada e curto período de vida e, portanto, podem servir como bons indicadores da circulação de riquetsias em uma área ambiental natural (MILAGRES et al., 2013). Na epidemiologia da FMB, os animais silvestres podem atuar como hospedeiros amplificadores da *R. rickettsii*, mantendo a bactéria em níveis altos em sua corrente sanguínea por determinado período, o que garante que novos carrapatos não infectados se infectem, amplificando a infecção na população de carrapatos (BURGDORFER, 1988).

Não foi constatada soropositividade para *R. rickettsii* pela RIFI nas amostras de caprinos e ovinos testadas. Sabendo-se que as diferentes espécies de riquetsias podem ser transmitidas e causar doenças em um gama variedade de hospedeiros vertebrados, bem como tendo em vista a proximidade dos caprinos e ovinos às áreas de mata conservada, em que existe a circulação do agente etiológico, sugere-se que esses animais podem ser suscetíveis à infecção por *Rickettsia* spp., embora isto não tenha sido comprovado. A não reatividade verificada nessas espécies pode ser justificada pela ausência de parasitismo por espécies de carrapatos vetores. De fato, apenas a espécie *R. (B) microplus* foi observada parasitando ovinos, sendo essa não incriminada na transmissão de riquetsias até o momento.

Até o momento não existem relatos na literatura brasileira sobre a participação desses hospedeiros no ciclo epidemiológico da febre maculosa, entretanto, as espécies caprina e ovina são suscetíveis à infecção por carrapatos do gênero *Amblyomma*, considerados importantes vetores da doença. Este foi o primeiro estudo realizado no Brasil considerando a possível participação das espécies caprina e ovina na epidemiologia da febre maculosa. É relevante ressaltar que devido à importância desses animais para o semiárido brasileiro, principalmente pelo estreito convívio com o homem e outros animais domésticos, faz-se necessário que novos estudos sejam realizados a fim de verificar a possível infecção nesses animais. Estudos realizados em outros países demonstraram a participação de caprinos e ovinos na manutenção e transmissão de espécies de riquetsias. Ortuño et al. (2012) analisaram amostras de soros de pequenos ruminantes no norte da Espanha e verificaram por meio da RIFI a soroprevalência de *R. slovaca* em 15,7% dos ovinos e 20,8% dos caprinos estudados.

Dentre os animais domésticos, os cães e equinos são considerados importantes hospedeiros sentinelas da FMB. Foi demonstrado que os cães são suscetíveis à infecção por *R. rickettsii* e desenvolvem uma eficiente resposta imunológica (LABRUNA et al., 2009). Estudos sorológicos no Brasil, por meio da RIFI, utilizando antígenos de *R. rickettsii* detectaram presença de anticorpos em cães com prevalências variando de 2 a 68% (FREITAS, 2007; SAITO et al., 2008; PINTER et al., 2008; PACHECO et al., 2011; TOLEDO et al., 2011).

Os resultados sorológicos da RIFI para detecção de *C. burnetii* foram negativos para amostras de pequenos mamíferos silvestres, embora os pequenos roedores silvestres sejam considerados reservatórios da bactéria na natureza (VANDERBURG et al., 2014). Foi observada ocorrência de infecção por *C. burnetii* em 2% (3/153) das amostras de soro dos ovinos avaliados, demonstrando a circulação desta bactéria nos rebanhos ovinos da região. Segundo Vanderburg et al. (2014), estudos soroepidemiológicos realizados no continente africano relatam prevalência para bovinos em torno de 13% e em pequenos ruminantes variando de 11-33%, destacando a importância dos fatores de risco na epidemiologia da doença. Hilbert et al. (2012) encontraram prevalência de *C. burnetii* em 28% dos ovinos em um estudo realizado na Alemanha. Estudando ovelhas de três regiões da província de Mazandaran, Norte do Irã, Esmaeli et al. (2013) verificaram soroprevalência de 23,7%. Ruiz-Fons et al. (2010), estudando uma área endêmica no Norte da Espanha observaram prevalência de anticorpos anti-*C. burnetii* em 74% e 45% dos rebanhos ovinos e caprinos, respectivamente.

Mesmo não sendo verificada a presença de anticorpos anti-*C. burnetii* em caprinos, não se descarta a possível infecção nestes animais, como parte do ciclo doméstico da *C. burnetii*. O diagnóstico sorológico para detecção de *C. burnetii* em animais muitas vezes torna-se difícil. Segundo Dorko et al. (2009), alguns animais eliminam a *C. burnetii* antes do desenvolvimento de anticorpos e alguns animais nunca soroconvertem, fato que representa maior risco de exposição à infecção e nem sempre indica ausência da mesma nas espécies avaliadas. Segundo Pacheco et al. (2013), poucos são os relatos da infecção por *C. burnetii* em carrapatos no continente americano, embora já se conheça o papel fundamental dos carrapatos na transmissão do agente para animais e a susceptibilidade de mais de 40 espécies de

carrapatos à infecção pela bactéria. Como se sabe os ruminantes (caprinos, ovinos e bovinos) são considerados os principais reservatórios no ambiente doméstico e, portanto, a importância de verificar a possível infecção nesses animais (VANDERBURG et al., 2014).

A partir do georreferenciamento dos pontos de captura e coleta de animais silvestres e domésticos pode-se verificar a distribuição de ambos agentes nas áreas do PNSC e no seu entorno. Verificou-se que o estudo abrangeu uma área extensa do PNSC e que as áreas onde havia a ocorrência de animais soropositivos para *R. rickettsii* e *C. burnetii* apresentavam distribuição principalmente na região central e norte do mesmo.

A avaliação molecular de DNA riquetsial, tanto em sangue dos vertebrados quanto em artrópodes vetores, baseou-se na amplificação de um fragmento específico do gene citrato sintase (*gltA*), conservado em todas as espécies do gênero *Rickettsia* spp., e da amplificação de fragmentos do gene *ompA*, que codifica proteínas externas de membrana de 190 kDa, pertencentes ao da GFM (LABRUNA et al., 2004a).

As 75 amostras de sangue dos animais silvestres avaliadas foram negativas para gene *gltA*. Isso implica no fato de que a PCR de sangue, muito embora o animal possa estar infectado, pode gerar resultados negativos quando não houver presença de bactérias suficientes na circulação sanguínea, significando uma baixa riquetsemia, não detectável na PCR (HORTA et al., 2007).

Os carrapatos avaliados na PCR apresentaram positividade de 27,7% (28/101) para o gene *gltA*, sendo 50% (14/28) positivos para o gene *ompA* do grupo da febre maculosa, o que confirma a presença de bactérias do gênero *Rickettsia* infectando carrapatos nas áreas do parque.

Foi verificada positividade de um carrapato *R. sanguineus* de vida livre para o gene *CAP*. Provavelmente esse carrapato encontrava-se infectado por uma espécie de *Coxiella* simbiote, corroborando com o trabalho de Almeida et al. (2013) que verificaram a presença de *Coxiella* simbiote em *Ornithodoros rostratus*.

Pela análise do padrão de identidade verificado a partir do sequenciamento de DNA, pode-se constatar a circulação de quatro espécies de riquetsias no parque:

R. amblyommii, *Candidatus R. andeanae* e duas novas espécies próximas a *R. parkeri* e *R. bellii*.

A confirmação da presença de *R. amblyommii* por meio do sequenciamento sugere a possível distribuição dessa espécie de riquetsia na região sul do Piauí, especialmente nas áreas de conservação natural do parque, o que indica que são os primeiros indícios da circulação dessa bactéria, e que a mesma esteja provavelmente sendo mantida em ciclo silvestre. Saraiva et al. (2013) demonstraram pela primeira vez a infecção por *R. amblyommi* em *A. auricularium* no estado de Pernambuco, sendo este o primeiro relato da infecção por riquetsias na região nordeste do Brasil. É importante ressaltar que apesar de não existirem relatos na literatura brasileira sobre a patogenicidade de *R. amblyommii* para seres humanos, sabe-se que esta espécie foi incriminada como possível agente causador da doença febril em humanos na Carolina do Norte - Estados Unidos, tendo o *A. americanum* como seu provável vetor (APPERSON et al., 2008).

Uma nova espécie de riquetsia próxima de *R. bellii* foi verificada no presente trabalho. A *R. bellii* não pertence ao grupo da febre maculosa, entretanto vem sendo relatada no Brasil infectando várias espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*. Segundo Labruna et al. (2004a), a potencial de exposição dos humanos às riquetsias patogênicas conhecidas na América do Sul pode ser minimizado pela alta taxa de infecção com *R. bellii*, desta forma, a presença de *R. bellii* numa dada população de carrapatos pode minimizar ou interferir na transmissão de uma espécie mais patogênica.

O presente estudo revelou a infecção riquetsial (*R. amblyommii* e prováveis espécies de riquetsias próximas de *R. bellii* e *R. parkeri*) em *Ornithodoros* sp. Contudo, as espécies foram determinadas somente pela análise do gene *gltA*, o que não permite uma identificação mais precisa da cepa envolvida, principalmente as amostras identificadas como *R. parkeri*. Novas análises devem ser realizadas para a determinação da cepa pela avaliação de outros genes, sendo imprescindível uma melhor caracterização molecular e análises filogenéticas. Poucos são os relatos de infecção por riquetsias em argasídeos. A maioria das espécies de riquetsias é transmitida por carrapatos ixodídeos, sendo considerados os principais vetores e reservatórios da bactéria (BARROS-BASTETI; ARZUA; BECHARA, 2006). No

entanto, alguns estudos têm associado a presença de riquetsias a carrapatos moles (REEVES et al., 2006; et al., 2010; MILHANO et al., 2014). Associado aos poucos relatos na literatura, estudos sobre o papel de carrapatos argasídeos na transmissão de riquetsias são escassos. Recentemente, foi verificada a presença de nova espécie *R. lusitaniae* em *Ornithodoros erraticus* coletados de suínos no sul de Portugal (MILHANO et al., 2014). Novos estudos são necessários a fim de conhecer o papel desses agentes e a real possibilidade de transmissão de riquetsias por vetores argasídeos.

A presença de um carrapato *A. parvum* infectado por *Candidatus R. andeanae* no presente estudo indica a possível infecção de carrapatos *A. parvum* por essas espécies de riquetsias na região. *Candidatus R. andeanae* foi recentemente encontrada no Brasil infectando carrapatos *A. parvum* em um estudo realizado por Nieri-Bastos et al. (2014), corroborando com os nossos dados. O carrapato *A. parvum* é uma importante espécie encontrada parasitando humanos na América do Sul e como não se conhece a patogenicidade da *R. andeanae* para seres humanos, mais estudos devem ser realizados a fim de conhecer a interação entre a bactéria e o vetor.

7 CONCLUSÃO

Por meio do presente trabalho realizado no Parque Nacional da Serra das Confusões e no seu entorno, no estado do Piauí, foi possível:

- a) Verificar a ocorrência de roedores (*T. apereoides*; *G. spixii*; *K. rupestris* e *R. macrurus*), marsupiais (*M. domestica* e *G. agilis*) e mamíferos da superordem Xenarthra (*T. tricinctus* e *T. tetradctyla*).
- b) Constatar pela primeira vez na região o parasitismo de *A. auricularium* em *T. tricinctus*, *T. tetradactyla* e *T. apereoides*; *A. parvum* em *T. apereoides* e *Homo sapiens*; *Ornithodoros* sp. em *T. apereoides* e *Homo sapiens*; e *R. (B) microplus* em *Ovis aires*;
- c) Constatar a presença de *R. sanguineus* e *Ornithodoros* sp. no ambiente;
- d) Confirmar a circulação de *Rickettsia* spp. em roedores (*G. spixii*, *T. apereoides* e *Rhipidomys* sp.) no interior do PNSC, verificada pela determinação de anticorpos específicos pela RIFI;
- e) Confirmar a circulação de *C. burnetii* em ovinos do entorno do PNSC, verificada pela determinação de anticorpos específicos pela RIFI;
- f) Confirmar a ausência de circulação de *Rickettsia* spp. em marsupiais, caprinos e ovinos; e de *C. burnetii* em roedores, marsupiais e caprinos; verificada pela ausência de anticorpos específicos nesses hospedeiros;
- g) Confirmar, por meio da PCR e sequenciamento de DNA, a presença de quatro espécies diferentes de *Rickettsia* spp. na região: *R. amblyommii* e *R. bellii* em *A. auricularium* e *Ornithodoros* sp.; *Candidatus R. andeane* em *A. parvum*; *R. parkeri* em *Ornithodoros* sp.;

- h) Observar, por meio da PCR, a presença de DNA de *Coxiella* sp. em carrapato *Rhipicephalus sanguineus* de vida livre;

8 REFERÊNCIAS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Publicación Científica y Técnica, 3ª ed., n. 580, **Organización Panamericana de la Salud**, 2003.

AGERHOLM, J. S. *Coxiella burnetii* associated reproductive disorders in domestic animals-a critical review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 55, n. 13, 2013.

AGUIAR, D. M. A sanidade animal e as zoonoses em sistemas de agricultura familiar: um breve comentário. **Pesquisa e Tecnologia**, v. 4, n. 2, 2007.

AL-ADHAMI, B.; SCANDRETT, W. B.; LOVANOV, V.; GAJADHAR, A. A. Serological cross reactivity between *Anaplasma marginale* and *Ehrlichia* species in naturally and experimentally infected cattle. **Journal Of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 23, 2011.

ALENCAR, S.P; MOTA, R. A.; COELHO, M. C. O. C.; NASCIMENTO, S. A.; ABREU, S. R. O. CASTRO, R. S. Perfil sanitário dos rebanhos caprinos e ovinos no sertão de Pernambuco. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p.131-140, 2010.

ALMEIDA, A. P.; CUNHA, L. M.; BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; DOMINGUES, L. N.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, p. 209-212, 2011.

ALMEIDA, A. P.; MARCILI, A; LEITE, L. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; DOMINGUES, L. N.; MARTINS, J. R; LABRUNA, M. B. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, p. 203-206, 2012.

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

ALMEIDA, R. F. C.; CUNHA, R. C.; MATIAS, J.; ANDREOTTI, R.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V. 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, 2012.

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

ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. Q. fever. **Veterinary Microbiology**, v.140, p. 297-309, 2010.

APPERSON, C. S.; ENGBER, B.; NICHOLSON, W. L.; MEAD, D. G.; ENGEL, J.; YABSLEY, M. J.; DAIL, K.; JOHNSON, J.; WATSON, D. W. Tick-Borne Diseases in North Carolina: Is "*Rickettsia amblyommii*" a Possible Cause of Rickettsiosis Reported as Rocky Mountain Spotted Fever. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 5, p. 597-606, 2008.

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

ARAÚJO, G. G. L. Alternativas alimentares para caprinos e ovinos no semi-árido In: PecNordeste- 2003, **Anais...**n. 4, 18 p., 2003.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial Pathogens and Their Arthropod Vectors. **Emerging Infectious Disease**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.

BABES, V. Sur l'hémoglobulinurie bacterienne du boef. **Academy of Sciences**, v. 107, p. 692-694, 1888.

BARBOSA, A. D.; MARTINS, N. R. S.; MAGALHÃES, D. F. Zoonoses e saúde pública: Riscos da proximidade humana com a fauna silvestre. **Ciência Veterinária dos Trópicos**, v.14, n.1/2/3, p. 1-9, 2011.

BARCELLOS, C.; MONTEIROII, A. M. V; CORVALÁN, C.; GURGEL, H. C.; CARVALHO, M. S.; ARTAXO, P.; HACON, S.; RANGONI, V. Mudanças climáticas e ambientais e as doenças infecciosas: cenários e incertezas para o Brasil. **Epidemiologia Serviço e Saúde**, v. 13, n. 3, p. 285-304, 2009.

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/ICTTD-3/ Butantan, 223 p., 2006.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Disponível em: www.bvsms.saude.gov.br. Acesso em 04 de novembro de 2014a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN)**. Febre Maculosa - Casos Confirmados notificados Sinan Net. Disponível em:http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/fmaculosa/bases/febre_maculosabrnet.def. Acesso em 23 de julho de 2014b.

BERMUDÉZ, S.; MIRANDA, R.; ZALDÍVAR, Y.; GONZÁLEZ, P.; BERGUIDO, G.; TREJOS, D.; PASCALE, J. M.; LABRUNA, M. Detección de *Rickettsia* spp. en ectoparásitos de animales domésticos y silvestres de la Reserva Natural Privada Cerro Chucantí y comunidades aledañas, Panamá, 2007-2010. **Biomédica**, v. 32, p.189-196, 2012.

BONVICINO, C. R. J. A. OLIVEIRA, P. S. D'ANDREA. **Guia dos Roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS. Série de Manual Técnicos, v. 11, 120 p., 2008.

BORGES, C. H. P. Manejo sanitário de caprinos. In: Conferência Sul e Americana de Medicina Veterinária. **Anais...**Rio de Janeiro. Anclivepa, p. 54-63, 2000.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. In DH Walker, **Biology of Rickettsial Diseases**, v. 1, CRC Inc, Boca Raton, p. 33-50, 1988.

BURNET, F. M., FREEMAN, M. Experimental studies on the virus of 'Q' fever. **Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 299-305, 1937.

CANÇADO, P. H.; PIRANDA, E. M.; MOURÃO, G. M.; FACCINI, J. L. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO₂ tick trap. **Parasitology Research**, v. 103, p. 1-7, 2008.

CARVALHO, J. A.; TEIXEIRA, S. R. F.; CARVALHO, M. P.; VIEIRA, V.; ALVES, F. A. Doenças Emergentes: uma Análise Sobre a Relação do Homem com o seu Ambiente [Emerging Illnesses: an analysis about the relation humans have with Environment]. **Revista Práxis**, n. 1, 2009.

CERF, O.; CONDRON, R. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle. **Epidemiology and Infection**, v. 134, p. 946-951, 2006.

CHAPMAN, A. S.; BAKKEN, J. S.; FOLK, S. M.; PADDOCK, C. D.; BLOCH, K. C.; KRUSELL, A.; SEXTON, D. J.; BUCKINGHAM, S. C.; MARSHALL, G. S.; STORCH, G. A.; DASCH, G. A.; MCQUISTON, J. H.; SWERDLOW, D. L.; DUMLER, J. S.; NICHOLSON, W. L.; WALKER, D. H.; EREMEEVA, M. E.; OHL, C. A. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis - United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. **MMWR Recommendations and Reports**, v. 55, p. 1-27, 2006.

COSTA, P. S. G.; BRIGATTE, M. E.; GRECO, D. B. Questing one Brazilian Query: Reporting 16 cases of Q Fever from Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 48, n. 1, p. 5-9, 2006.

CUTLER, S. J; BOUZID, M.; CUTLER, R. R. Q Fever. **The Journal of Infection**, v. 54, n. 4, p. 313-318, 2007.

DANTAS-TORRES, F. Canine vector-borne diseases in Brazil. **Parasites & Vectors**, Impresso, v. 1, n. 25, p. 1-17, 2008.

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

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Emerging infectious diseases of wildlife - threats to biodiversity and human health. **Science**, v. 287, n. 5452, p. 443-449, 2000.

DAVIS, G.; COX, H. R. A filterpassing infectious agent isolated from ticks: isolation from *Dermatocentor andersoni*, reaction in animals, and filtration experiments. **Public Health Rep**, v. 53, p. 2259-2267, 1938.

DEL FIOLE, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; FILHO, S. B. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 27, n. 6, p. 461-466, 2011.

DERRICK, E. H. 'Q' fever, a new fever entity: clinical features, diagnosis and laboratory investigation. **Medical Journal of Australia**, v. 2, p. 281-299, 1937.

DORKO, E.; RIMÁROVÁ, K.; PILIPÈINEC, E.; TRÁVNIÈEK, M. Prevalence of *Coxiella burnetii* in wild ruminants in cavecany zoo, Kosice, Eastern Slovakia. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 16, n. 2, p. 321-324, 2009.

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

EMBRAPA - **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**. Disponível em:<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br>. Acesso em 04 de novembro de 2014.

ESMAELI, S.; MOSTAFAVI, E.; SHAHDORDIZADEH, M.; MAHMOUDI, H. A seroepidemiological survey of Q fever among sheep in Mazandaran province, northern Iran. **Annals of Agricultural and Environmental Medicine**, v. 20, n. 4, p. 708-710, 2013.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. Rickettsiae. In: LEDERBERG, J. **Encyclopedia of microbiology**, New York: Academic Press, v. 4, p. 140-180, 2000.

FONSECA, Z. A. A. S.; FERREIRA, C. G. T.; AHID, S. M. M. Ectoparasitas de Ruminantes na Região Semi-árida do Rio Grande do Norte, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 3, n. 4, p.141-145, 2009.

FONSECA, Z. A. A. S.; PEREIRA, J. S.; MARTINS, T. F.; COELHO, W. A. C.; ANDRE, W. P. P.; BESSA, E. N.; AHID, S. M. M. Ocorrência de *Amblyomma auricularium* (CONIL, 1878) em tatus-galinha de vida livre (*Dasypus novemcinctus*) (Xenartra: Dasypodidae) no estado do Ceará, Brasil. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 7, n. 3, p. 233-236, 2013.

FREITAS, M. O. **Detecção de Rickettsias do Grupo Febre Maculosa em cães e eqüinos em São José dos Pinhais, PR**. 79 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

GALVÃO, M. A. M. **Febre Maculosa em Minas Gerais: Um Estudo sobre a Distribuição da Doença no Estado e seu Comportamento em Área de Foco Peri-urbano**. Tese de Doutorado, Belo Horizonte: Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, 1996.

GALVÃO, M. A. M.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M. M.; CALIC, S. B.; SOUSA, R.; BACELLAR, F. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Revista Saúde Pública**, v. 35, n. 5, p. 850-856, 2005.

GARDNER, A. L. **Mammals of South Amric Marsupials, Xenarthrans, Shrews and Bats**. The University of Chicago Press, v. 1, p. 690, 2007.

GENTILE, R.; FERNANDEZ, F. A. S. Influence of habitat structure on a streamside small mammal community in a Brazilian rural area. **Mammalia**, v. 63, n. 1, p. 29-40, 1999.

GRAIPEL, M. E.; CHEREM, J. J.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A.; GLOCK, L. Dinâmica populacional de marsupiais e roedores no Parque Municipal da Lagoa do Peri, Ilha de Santa Catarina, Sul do Brasil. **Mastozoología Neotropical**, v. 13, n. 1, p. 31-49, 2006.

GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L. C. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 14, n. 1, p. 3-18, 2008.

GREENE, C. E. **Infectious diseases of the dog and cat**. 3 ed. St. Louis, Missouri: Saundus Elsevier, p. 1387, 2006.

GÜRTLER, D. L.; BAUERFEIND, U.; BLÜMEL, J.; BURGUER, R.; DROSTEN, C.; GRÖNER, A.; HEIDEN, M.; HILDEBRANDT, M.; JANSEN, B.; OFFERGELD, R.; PAULI, G.; SEITZ, R.; SCHLENKRICH, U.; SCHOTTSTEDT, V.; STROBEL, J.; WILLKOMMEN, H. *Coxiella burnetii* - Pathogenic Agent of Q (Query) Fever. **Transfusion Medicine Hemotherapy**, v. 41, p. 60-72, 2014.

HARDEN, V. A. **Rocky mountain spotted fever: History of a Twentieth Century Disease**. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 1990.

HILBERT, A.; SCHMOOCK, G.; LENZKO, H.; MOOG, U.; DILLER, R.; FROHLICH.; HOFFMANN, L.; HORNER, S.; ELSCHNER, M.; TOMASO, H.; HENNING, K.; NEUBAUER, H.; SPRAGUE, L. D. Prevalence of *Coxiella burnetii* in clinically healthy German sheep flocks. **BMC Research Notes**, v. 4, p. 152, 2012.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to Spotted Fever group Rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian Spotted-Fever endemic área in the State of São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another Spotted Fever Group *Rickettsia*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

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

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

HORTA, M. C.; MOARES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWASKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p.109-117, 2009.

HORTA, M. C.; NASCIMENTO, G. F.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, L. C. P.; NICOLA, P. A. Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing free-living wild animals in the Caatinga biome in the State of Pernambuco, northeastern Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 16, p. 207-211, 2011.

ICMBio - **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. Disponível em: [http:// www.icmbio.gov.br](http://www.icmbio.gov.br). Acesso em 21 de janeiro de 2014.

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

KAZAR, J. *Coxiella burnetii* infection. **Academy of Science**, v. 1063, p. 105-114, 2005.

KIDD, L.; MAGGI, R.; DINIZ, P. P. V. P.; HEGARTY, B.; TUCKER, M.; BREITSCHWERDT, E. Evaluation of conventional and real-time PCR assays for detection and differentiation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dog blood. **Veterinary Microbiology**, v. 129, p. 294-303, 2008.

KRAWCZAK, F. S.; NIERI-BASTOS, F. A.; NUNES, F. P.; SOARES, J. F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 1-7, 2014.

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; McBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 42, p. 90-98, 2004b.

LABRUNA, M. B. Cultivo celular de Riquetsias no Brasil. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Rickettsioses. **Anais...** Ribeirão Preto, p.132-133, 2006.

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

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

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009.

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

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; KIRSTEN, A. H.; GUTERRES, A.; BARREIRA, J.; LEMOS, E. R. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal Infectious Diseases**, v.12, n.2, p.149-151, 2008.

LA SCOLA, B. L. Current Laboratory Diagnosis of Q Fever. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 257-262, 2002.

- LEMOS, E. R. S.; MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted fever in the group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 3, p. 273-275, 1996.
- LEMOS, E. R. S.; ROZENTAL, T.; MARES-GUIA, M. A. M.; ALMEIDA, D. N. P.; MOREIRA, N.; SILVA, R. G.; BARREIRA, J. D.; LAMAS, C. C.; FAVACHO, A. R.; DAMASCO, P. V. Q fever as a cause of fever of unknown origin and thrombocytosis: first molecular evidence of *Coxiella burnetii* in Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 1, p. 85-87, 2011.
- MADARIAGA, M. G.; REZAI, K.; TRENHOLME, G. M.; WEINSTEIN, R. A. Q fever: a biological weapon in your backyard. **Lancet Infectious Diseases**, v.3, n.11, p. 709-721, 2003.
- MARRIE, T. J. Q fever - A review. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 31, p. 555-563, 1990.
- MARTINS, J. R.; MEDRI, I. M.; OLIVEIRA, C. M.; GUGLIELMONE, A. A. Ocorrência de carrapatos em tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) e tamanduá mirim (*Tamandua tetradactyla*) na região do Pantanal Sul Mato-Grossense, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 293-295, 2004.
- MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, p. 75-99, 2010.
- MARVULO, M. F. V. Zoonoses. In: CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de animais selvagens - medicina veterinária**. São Paulo: Roca, p.1250-1256, 2006.
- MAURIN, M.; RAOULT, D. Q Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 518-553, 1999.
- MAXEY, E. E. Some observations on the so-called spotted fever of Idaho. **Med Sentinel**, v. 7, p.433-438, 1899.
- MEDIANNIKOV, O; FENOLLAR, F.; SOCOLOVSCHI, C., et al. *Coxiella burnetii* in humans and ticks in rural Senegal. **PLoS Negl Tropical Diseases**, v. 4, p. 654, 2010.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; MONTANDON, C. E.; FREITAS, R. N.; PACHECO, R.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A. M. Spotted Fever Group *Rickettsia* in Small Rodents from Areas of Low Endemicity for Brazilian Spotted Fever in the Eastern Region of Minas Gerais State, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 937-939, 2013.

MILHANO, V.; PALMA, M.; MARCILI, A.; NUNCIO, M. S.; CARVALHO, I. L.; SOUZA, R. *Rickettsia lusitaniae* sp. nov. isolated from the soft tick *Ornithodoros erradicus* (Acarina: Argasidae). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 37, p. 189-193, 2014.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 9, p. 73-78, 2009.

NIERI-BASTOS, F. A.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; DIAS, R. A.; LABRUNA, M. B. Comparative Evaluation of Infected and Noninfected *Amblyomma triste* Ticks with *Rickettsia parkeri*, the Agent of an Emerging Rickettsiosis in the New World. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-6, 2013.

NIERI-BASTOS, F. A.; LOPES, M. G.; CANÇADO, P. H. D.; ROSSA, G. A. R.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Candidatus *Rickettsia andeanae*, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 259-261, 2014.

OGATA, H.; AUDIC, S.; RENESTO-AUDIFFREN, P.; FOURNIER, P. E.; BARBE, V.; et al. Mechanisms of evolution in *Rickettsia conorii* and *R. prowazekii*. **Science**, v. 293, p. 2093-2098, 2001.

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

OGRZEWALSKA M.; PACHECO R. C.; UEZU A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, p. 413-425, 2009.

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

OLEGÁRIO, M. M.; GERARDI, M.; TSURUTA, S. A.; SZABÓ, M. P. J. Life cycle of the tick *Amblyomma parvum* Aragão 1908 (Acari Ixodidae) and suitability of domestic host under laboratory conditions. **Veterinary Parasitology**, v.179, p. 203-208, 2011.

ORTUÑO, A.; PONS, I.; QUESADA, M.; LARIO, S.; ANTON, A. G.; CASTELLA, J.; SEGURA, F. Evaluation of the Presence of *Rickettsia slovaca* Infection in Domestic Ruminants in Catalonia, Northeastern Spain. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.12, n.12, 2012.

PACHECO, R. C. Zoonoses transmitidas por carrapatos. In: XXXV Semana Capixaba do Médico Veterinário e III Encontro Regional de Saúde Pública. **Anais...** Guarapari-ES, 2008.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, 2009.

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

PACHECO, R.; ECHIDE, I. E.; ALVES, R. N.; BELETTI, M. E.; NAVA, S.; LABRUNA, M. B. *Coxiella burnetii* in ticks, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, p. 344-346, 2013.

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

PALMER, N. C.; KIERSTEAD, M.; KEY, D. W.; WILLIAMS, J. C.; PEACOCK, M. G.; VELLEND, H. Placentitis and Abortion in Goats and Sheep in Ontario Caused by *Coxiella burnetii*. **Canadian Veterinary Journal**, v. 24, n. 2, p. 60-61, 1983.

PARKER, N. R.; BARRALET, J. H.; BELL, A. M. Q fever. **Lancet**, v. 367, n. 9511, p. 679-688, 2006.

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

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

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 1, p. 40-50, 2009.

PARREIRA, P. A. V. **Estudo da prevalência de anticorpos anti - *Coxiella burnetii* numa amostra de doadores de sangue de uma região portuguesa**. 2008. 108f. Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas Emergentes) - Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina de Lisboa, Lisboa, 2008.

PATZ, J. A. P.; DASZAK, G. M.; TABOR, A. A.; AGUIRRE, M.; PEARL, M.; EPSTEIN, J.; WOLFE, N. D.; KILPATRICK, A. M.; FOUFOPOULOS, J.; MOLYNEUX, D.; BRADLEY, D. J. Unhealthy Landscapes: Policy recommendations pertaining to land use change and disease emergence. **Environmental Health Perspectives**, v. 112, p. 1092-1098, 2004.

PEREZ, C. A.; ALMEIDA, A. F. de; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V. H. B. de; BALESTRIN, D. do. C.; GUIMARÃES, M. S.; COSTA, J. C.; RAMOS, L. A.; ARRUDA-SANTOS, A. D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C. P.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks of genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) and their relationship with hosts in edemic area for spotted fever in the state of São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 210-217, 2008.

PHILIP, C. B. Observations on experimental of Q fever. **The Journal of Parasitology**, v. 34, n. 6, p. 457-464, 1948.

PIESMAN, J.; EISEN, L. Prevention of tick-borne diseases. **Annual Review of Entomology**, v. 53, p. 323-343, 2008.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy Science**, 2006.

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

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

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, L. S. Típo exantemático em São Paulo. **Sociedade Imprensa Paulista**, São Paulo, 1932.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. "Microbiologia", 5ª Edição, McGRAW- Hill. Interamericana, p. 528-529/987-989, 2004.

PORTER, S.R.; CZAPLICKI, G.; MAINIL, J.; HORII, Y.; MISAWA, N.; SAEGERMAN, C. "Q fever in Japan": Na update review, **Elsevier**, 2010.

RADINOVIC, M.; BOBOS, S.; DAVIDOV, I.; ERDELJAN, M.; PAJIC, M. Presence of *Coxiella burnetii* of blood serum and concentration of IgG in infected cows. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 6, p. 444-448, 2013.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; FENOLLAR, F.; GALVÃO, M. A. M.; LAMBALLERIE, X. A. Flea-Associated *Rickettsia* Pathogenic for Humans, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, 2001.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; EREMEEVA, M.; GRAVES, S.; KELLY, P. J.; OTEO, J. A.; SEKEYOVA, Z.; TAMURA, A.; TARASEVICH, I.; ZHANG, L. Naming of Rickettsiae and Rickettsial Diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1063 p. 1-12, 2005.

REEVES, W. K.; LOFITS, A. D.; SANDERS, F.; SPINKS, M. D.; WILLS, W.; DENISON, A. M.; DASCH, G. A. *Borrelia*, *Coxiella* and *Rickettsia* in *carlos capensis* (Acari: Argasidae) from a brow pelican (*Pelecanus accidentalis*) rookery in South Carolina, USA. **Experimental e Applied Acarology**, v. 39, p. 321-329, 2006.

REHACEK, J.; URVOLGY, J. Towards more standardized methods in ecological studies of Rickettsiae in relation to their vectors and vertebrate hosts. In: **VII International Congress of Infectious and Parasitic Diseases**, p. 1-8, 1978.

REIS, N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; LIMA, I. P. **Mamíferos do Brasil**. 2ª Edição, 2011.

RENVOISÉ, A., MEDIANNIKOV, O., RAOULT, D. Old and new tick-borne rickettsioses. **Inter Health**, v. 1, p. 17-2, 2009.

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

RUIZ-FONS, F.; ASTOBIZA, I.; BARANDIKA, J. F.; HURTADO, A.; ATXAERANDIO, R.; JUSTE, R. A.; GARCÍA-PÉREZ, A. L. Seroepidemiological study of Q fever in domestic ruminants in semi-extensive grazing systems. **BMC Veterinary Research**, v. 6, n. 3, p. 2-6, 2010.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A. R.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 9, n. 1, p. 102-108, 2008.

SANCHEZ, J.; SOURIAU, A.; BUENDIA, A. J.; ARRICAU-BOUVERY, N.; MARTINEZ, C. M.; SALINAS, J.; RODOLAKIS, A.; NAVARRO, J. A. Experimental *Coxiella burnetii* infection in pregnant goats: a histopathological and immunohistochemical study. **Journal of Comparative Pathology**, v. 135, p. 108-115, 2006.

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

SANTANA, I. C. C. **Análise Multivariada no Estudo de Padrões na Mastofauna do bioma Caatinga**. 2006. 98f. Dissertação (Mestrado em Biometria) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2006.

SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; FRANÇA, A. Febre Q: revisão de conceitos. **Medicina Interna**. v. 14, n. 2, p. 90-100, 2007.

SARAIVA, D. G.; NIERI-BASTOS, F. A.; HORTA, M. C.; SOARES, H. S.; NICOLA, P. A.; PEREIRA, L. C. M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia amblyommii* Infecting *Amblyomma auricularium* Ticks in Pernambuco, Northeastern Brazil: Isolation, Transovarial Transmission, and Transstadial Perpetuation. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. X, 2013.

SEKEYONA, Z.; ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 1353-1360, 2001.

SESHADRI, R.; PAULSEN, I. T.; EISEN, J. A.; READ, T. D.; NELSON, K. E.; NELSON, W. C.; WARD, N. L.; TETTELIN, H.; DAVIDSEN, T. M.; BEAMAN, M. J.; DEBOY, R. T.; DAUGHERTY, S. C.; BRINKAC, L. M.; MADUPU, R.; DODSON, R. J.; KHOURI, H. M.; LEE, K. H.; CARTY, H. A.; SCANLAN, D.; HEINZEN, R. A.; THOMPSON, H. A.; SAMUEL, J. E.; FRASER, C. M.; HEIDELBERG, J. F. Complete genome sequence of the Q fever pathogen *Coxiella burnetii*. **Proceedings of the National Academy of Science USA**, v. 100, n. 9, p. 5455-5560, 2003.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 2, p. 74-8, 2001.

SICILIANO, R. F.; RIBEIRO, H. B.; FURTADO, R. H. M.; CASTELLI, J. B.; SAMPAIO, R. O.; SANTOS, F. C. P.; COLOMBO, S.; GRINBERG, M.; STRABELLI, T. M. V. Endocardite por *Coxiella burnetii* (febre Q). Doença rara ou pouco diagnosticada? Relato de caso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 4, p. 409-412, 2008.

SILVA, J. C. R. Biodiversidade e Saúde. In: FRANKE, C. R.; ROCHA, P. L. B.; KLEIN, W.; GOMES, S. L. **Mata Atlântica e Biodiversidade**. Salvador: Edufba. p. 191-219, 2005.

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

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

SMITH, T.; KILBOURNE, F. L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. **Bur Anim Ind Bull**, v. 1, p. 301-324, 1893.

SOARES, J. F.; SOARES H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139-151, 2011.

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

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

STEIN, A.; RAOULT, D. Detection of *Coxiella burnetii* by DNA amplification using polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 9, p. 2462-2466, 1992.

STOKER, M. G.; MARMION, B. P. The spread of Q fever from animals to man; the natural history of a rickettsial disease. **Bull World Health Organ**, v. 13, n. 5, p. 781-806, 1955.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, M.; SANTOS, A. P.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with doestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 969, n. 25, p. 290-293, 2001.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C.; DUARTE, J. M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild marsh-deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast of Brazil: infestations prior and after habitat loss, **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 268-274, 2003.

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

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 27, p. 2-9, 2013.

SUASSUNA-BEZERRA, A. D. Ectoparasitos em caprinos e ovinos no município de Mossoró, Rio Grande do Norte. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 1, p. 110-116, 2010.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; BARBIERI, A. R. M.; HILTEL, A. C.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Infection by Spotted Fever Rickettsiae in People, Dogs, Horses and ticks in Londrina, Parana State, Brazil. **Zoonoses Public Health**, v. 58, p. 416- 423, 2011.

VAIDYA, V. M.; MALIK, S. V. S.; BHILEGAONKAR, K. N.; RATHORE, R. S.; KAUR, S.; BARBUDDHE, S. B. Prevalence of Q fever in domestic animals with reproductive disorders. **Comparative Immunology Microbiology Infectious Diseases**, v. 33, n. 4. p. 307-321, 2010.

VANDERBURG, S.; RUBACH, M. P.; HALLIDAY, J. E. B.; CLEVELAND, S.; REDDY, E. A.; CRUMP, J. A. Epidemiology of *Coxiella burnetii* Infection in Africa: A OneHealth Systematic Review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, e2787, 2014.

VIEIRA, M. V. Dynamics of a rodent assemblage in a cerrado of southeast Brazil. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 57, p. 99-107, 1997.

WALKER, D. H.; LIU, Q. H.; YU, X. L.; LI, H.; TAYLOR, C.; FENG, H. M. Antigenic diversity of *Rickettsia conorii*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 47, p. 78-86, 1992.

WEISBURG, W. G.; DOBSON, M. E.; SAMUEL, J. E.; DASCH, G. A.; MALLAVIA, L. P.; BACA, O.; MANDELCO, L.; SECHREST, J. E.; WEISS, E.; WOESE, C. R. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. **Journal Bacteriology**, v. 171, n. 8, p. 4202-4206, 1989.

WHO. World Health Organization. **Emerging Diseases**. Disponível em: [pics/emerging_diseases/en/"www.who.int/topics/emerging_diseases/en/](http://pics/emerging_diseases/en/). Acesso em 17 de novembro de 2014.