

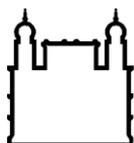
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

ECOEPIDEMIOLOGIA DE RIQUÉTSIAS EM ÁREA DE COMPLEXO  
FLORESTAL MATA ATLÂNTICA, DENTRO DO BIOMA CAATINGA,  
REGIÃO DO MACIÇO DE BATURITÉ, ESTADO DO CEARÁ

LEONARDO MOERBECK DA COSTA MOREIRA

Rio de Janeiro  
Junho de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade em Saúde**

*LEONARDO MOERBECK DA COSTA MOREIRA*

Ecoepidemiologia de Riquetsias em Área de Complexo Florestal de Mata Atlântica,  
Dentro do Bioma Caatinga, Região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo  
Cruz como parte dos requisitos para obtenção do  
título de Mestre em Biodiversidade e Saúde.

**Orientador (es):** Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta

**RIO DE JANEIRO**

Junho de 2015

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M838 Moreira, Leonardo Moerbeck da Costa

Ecoepidemiologia de riquetsias em área de complexo florestal Mata Atlântica, dentro do bioma caatinga, região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará / Leonardo Moerbeck da Costa Moreira. – Rio de Janeiro, 2015.

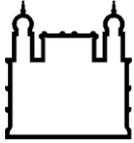
xv, 50 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2015.

Bibliografia: f. 34-41

1. Ecoepidemiologia. 2. Febre maculosa. 3. Carrapatos. 4. Pulgas. 5. Vetores. 6. Rickettsia. I. Título.

CDD 614.5263



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

***AUTOR: LEONARDO MOERBECK DA COSTA MOREIRA***

**ECOEPIDEMIOLOGIA DE RIQUÉTSIAS EM ÁREA DE COMPLEXO FLORESTAL  
DE MATA ATLÂNTICA, DENTRO DO BIOMA CAATINGA, REGIÃO DO MACIÇO  
DE BATURITÉ, ESTADO DO CEARÁ**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta**

**Aprovado em: 30/06/2015**

### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Marinete Amorim - Presidente (FIOCRUZ/RJ)**

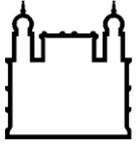
**Prof. Dr. Gino Chaves da Rocha (UnB/DF)**

**Prof. Dr. Adriano Pinter (SUCEN/SP)**

**Prof. Dr. Heloísa Helena de Oliveira Morelli Amaral (SES/RJ)**

**Prof. Dr. Nicolau Maués Serra-Freire (FIOCRUZ/RJ)**

Rio de Janeiro, 30 de Junho de 2015



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

***Ao meu maior exemplo de amor,  
paciência e perseverança: Maria  
Bárbara, obrigado por tudo!***

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, pela compreensão e apoio, por sempre acreditarem em mim e pelo amor incondicional que dedicaram durante esses 33 anos e “9 meses”.

À minha madrinha, tia, amiga e quase avó, que tem um coração gigante e que sempre me incentivou.

À toda família, pela paciência e confiança.

Ao meu orientador Gilberto Salles Gazêta, pela confiança depositada, pelo incentivo, paciência e honestidade, inclusive nos momentos mais difíceis.

Ao Dr. Nicolau Serra-Freire, pelo exemplo de caráter e inspiração de determinação tanto na vida pessoal quanto profissional.

À Dra. Marinete Amorim, por espalhar alegria e união nos lugares em que chega, principalmente, no LIRN.

À todos os colegas que fazem parte da família LIRN, e tornam esse ambiente agradável e alegre.

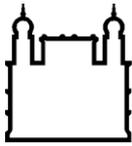
Aos integrantes da 4<sup>a</sup> Coordenadoria Regional de Saúde da Secretaria Estadual de Saúde do Ceará pelas coletas em campo.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro para realização deste projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Agradeço à todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento e conclusão deste trabalho.

*“Nunca se afaste de seus sonhos. Porque se eles forem, você continuará vivendo, mas terá deixado de existir.”*  
– *Charlie Chaplin.*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

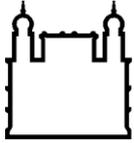
### ECOEPIDEMIOLOGIA DE RIQUÉTSIAS EM ÁREA DE COMPLEXO FLORESTAL DE MATA ATLÂNTICA, DENTRO DO BIOMA CAATINGA, REGIÃO DO MACIÇO DE BATURITÉ, ESTADO DO CEARÁ

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Leonardo Moerbeck da Costa Moreira

A Febre Maculosa (FM) é uma zoonose re-emergente transmitida por artrópodes com distribuição mundial, que apresentam conexão de morbi-mortalidade àquelas espécies de riquetsias encontradas em uma determinada área. O presente estudo teve o objetivo de analisar a circulação de bactérias do gênero *Rickettsia* na região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, região Nordeste do Brasil, buscando apoiar as ações de saúde na região. A área de estudo se caracteriza pela presença de fragmentos florestais e uma complexa formação vegetal fazendo parte do Complexo Mata Atlântica, no interior do Bioma Caatinga. Reações em cadeia da polimerase foram realizadas para a detecção de fragmentos de DNA dos genes *gltA* e *ompA* de bactérias do gênero *Rickettsia*. Aferiu-se a Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI). A partir de ações de vigilância de ambiente e investigações de casos para FM, 1727 espécimes de potenciais vetores de riquetsias foram coletados a partir de 12 espécies de hospedeiros vertebrados que totalizaram 260 indivíduos. 887 espécimes de potenciais vetores foram submetidos à PCR, dos quais 35 foram positivos ao menos para um dos genes analisados. Treze amostras positivas para ambos os genes foram sequenciadas. A análise filogenética, verificou a presença de quatro espécies de riquetsias, sendo três pertencentes ao Grupo Febre Maculosa (GFM): *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, que apresenta elevada relação filogenética com *R. parkeri*, *R. peacockii* e *R. philipii*. Essa riquetsia do GFM foi verificada infectando *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus sanguineus*, com FMVI de 11.65% e 3.17%, respectivamente. Esses artrópodes infectados estavam parasitando cães provenientes dos municípios de Aratuba e Mulungu, o primeiro município com casos confirmados, e o segundo ainda sem casos confirmados de FM. *Candidatus Rickettsia andeanae* infectando *Amblyomma parvum*, parasitando animais silvestres no município de Redenção, ainda sem casos confirmados de FM. *Rickettsia felis*, infectando *Ctenocephalides felis*, e apresentando FMVI de 20.93%; além de *Rickettsia bellii* infectando *A. nodosum* e *A. ovale* encontrados em tamanduá no município de Baturité e em cão no município de Guaramiranga, respectivamente. Ambos os municípios positivos para casos de FM. O presente estudo concluiu que *A. ovale* atua como vetor primário de *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, além de ter papel fundamental na manutenção do ciclo epidêmico na região. *C. felis* foi incriminada como potencial vetor capaz de manter o ciclo de *R. felis* na região estudada. Cães atuam como principal hospedeiro vertebrado no ciclo epidêmico de *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest e no ciclo enzoótico de *R. felis* na região estudada. O presente estudo registra pela primeira vez a ocorrência de *Amblyomma aureolatum*, bem como, demonstra pela primeira vez a presença de *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest em *A. ovale* e *R. sanguineus*; *Candidatus Rickettsia andeanae* em *A. parvum* e *R. bellii* em *A. nodosum* e *A. ovale* em área endêmica de FM no Estado do Ceará.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### ECO-EPIDEMIOLOGY OF RICKETTSIAE IN AN ATLANTIC RAINFOREST AREA, WITHIN THE SEMI-ARID BIOME, MACIÇO DE BATURITÉ REGION, CEARÁ STATE

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSIDADE E SAÚDE

**Leonardo Moerbeck da Costa Moreira**

Spotted Fever (SF) are reemerging arthropod-borne zoonosis with worldwide distribution, featuring morbidity and mortality rates connected to those *Rickettsiae* species found in a specific area. The present study aims to analyse *Rickettsiae* circulation in the Maciço de Baturité Region, Ceará State, Northeastern Brazil, seeking support health actions in the region. The study field features forest fragments and a complex plant formation, resembling itself to the Atlantic rainforest complex, within the semi-arid Brazilian biome (Caatinga). Polymerase chain reaction was performed to detect *gltA* and *ompA* DNA rickettsial gene fragments. Minimum Infected Vectors Frequency (MIVF) was performed. From government actions of environmental monitoring and investigations of SF human cases, 1727 *Rickettsiae* potential vectors specimens were collected from 12 different vertebrate hosts, which add up to 260 subjects. It was performed PCR to 887 *Rickettsiae* potential vectors specimens, in which 35 were positive, at least for one of the analyzed genes. Thirteen positive samples for both rickettsial genes were sequenced. The phylogenetic analysis performed verified that there were four different rickettsial species, in which three belonged to Spotted Fever Group (SFG): *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, which is highly related to *R. parkeri*, *R. peacockii* and *R. philipii*. This SFG *Rickettsiae* was infecting *Amblyomma ovale* and *Rhipicephalus sanguineus* tick species, which showed MIVF of 11.65% and 3.17%, respectively. These positive arthropods were parasiting dogs from the municipality of Aratuba and Mulungu, where the first municipality features confirmed human cases, and the latter has no confirmed SF human cases yet. *Candidatus Rickettsia andeanae* was found infecting *Amblyomma parvum* ticks, which was found parasiting wild animals in the municipality of Redenção, still with absence of SF human cases. *Rickettsia felis* was found infecting *Ctenocephalides felis*, and showing MIVF of 20.93%; besides, *Rickettsia bellii* was found infecting *Amblyomma nodosum* and *Amblyomma ovale* parasiting anteater in Baturité municipality and dogs in Guaramiranga municipality, respectively. Both municipalities have already registered SF human cases. The present study concludes that *A. ovale* plays a role as a primary vector of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, and also it has a fundamental role of maintenance the epidemic cycle in the studied region. *C. felis* was characterized as the potential vector of keeping *R. felis* cycle within the studied region. Dogs make a role as the main vertebrate host within the epidemic cycle of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest and within the enzootic cycle of *R. felis* in the studied area. The present study records *Amblyomma aureolatum*, as well as, *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest infecting *A. ovale* and *R. sanguineus*; *Candidatus Rickettsia andeanae* infecting *A. nodosum*; *R. bellii* infecting *A. ovale* and *A. nodosum*; by the first time within endemic SF area in the Ceará State, northeastern Brazil.

## ÍNDICE

|  |             |
|--|-------------|
| <b>RESUMO</b>  | <b>VIII</b> |
| <b>ABSTRACT</b>  | <b>IX</b>   |
| <b>1 INTRODUÇÃO</b>  | <b>1</b>    |
| <b>2 OBJETIVOS</b>   | <b>6</b>    |
| 2.1 Objetivo Geral .....   | 6           |
| 2.2 Objetivos Específicos .....  | 6           |
| <b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>  | <b>7</b>    |
| 3.1 Área de Estudo .....   | 7           |
| 3.2 Coleta de Ectoparasitos .....  | 10          |
| 3.3 Amostragem de Hospedeiros Vertebrados .....  | 13          |
| 3.4 Triagem e Identificação dos Ectoparasitos .....  | 13          |
| 3.5 Pesquisa de Bioagente .....  | 14          |
| 3.5.1 Extração de DNA genômico .....   | 14          |
| 3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....   | 15          |
| 3.5.3 Purificação, Clonagem e Sequenciamento .....   | 16          |
| 3.5.4 Análise das Sequências .....   | 17          |
| 3.5.5 Análise Filogenética .....   | 17          |
| 3.5.6 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI) .....   | 17          |
| <b>4 RESULTADOS</b>  | <b>18</b>   |
| 4.1 Hospedeiros Vertebrados Obtidos na Área de Estudo .....  | 18          |
| 4.2 Distribuição de Artrópodes Coletados e Identificados .....   | 19          |
| 4.3 Análise das Sequências .....   | 23          |
| 4.4 Frequência Mínima de Vetores Infectados .....  | 27          |
| 4.5 Artrópodes Infectados por Riquetsias .....   | 28          |
| <b>5 DISCUSSÃO</b>   | <b>29</b>   |
| <b>6 CONCLUSÕES</b>  | <b>33</b>   |
| <b>Sobre a circulação de riquetsias em potenciais vetores na região do</b><br><b>Maciço de Baturité pode ser afirmado: .....</b> | <b>33</b>   |
| <b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>  | <b>34</b>   |
| <b>8 ANEXOS</b>  | <b>42</b>   |

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa do Brasil, Estado do Ceará, destacando os municípios formadores da Região do Maciço de Baturité. 8

Figura 2 – Fotos da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará onde foram realizadas as coletas de potenciais vetores de riquetsias, no período de Abril de 2011 a Março de 2013 exemplificando os diferentes ambientes da região - A: ambiente rural; B: ambiente de fragmento florestal com complexa formação vegetal de Mata Atlântica; C: ambiente peri-domiciliar. 9

Figura 3 – Caracterização climática do Estado do Ceará, destacando a região do Maciço de Baturité. Azul escuro: Clima Tropical Subquente Subúmido; Azul claro: Clima Tropical Quente Úmido; Verde: Clima Tropical Quente Subúmido; Amarelo: Clima Tropical Quente Semi-Árido Brando; Laranja: Clima Tropical Quente Semi-Árido. 10

Figura 4 – A: Foto de *R. sanguineus* parasitando roedor capturado durante vigilância de ambiente e investigação de casos de FM, na região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. B: Escara de inoculação no sítio de fixação de potencial vetor de riquetsias em humano morador da região do Maciço de Baturité. 12

Figura 5 – Árvore filogenética do fragmento "CS4" do gene riquetsial *gltA* através do método *Neighbor-joining* com distâncias evolutivas estabelecidas por Kimura dois-parâmetros a partir de potenciais vetores de riquetsias infectados provenientes da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. 24

Figura 6 – Árvore filogenética concatenada dos fragmentos "CS2" e "CS4" do gene riquetsial *gltA* através do método *Neighbor-joining* com distâncias evolutivas estabelecidas por Kimura dois-parâmetros a partir de potenciais vetores de riquetsias infectados provenientes na região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. 25

**Figura 7 – Árvore filogenética à partir de fragmento do gene riquetsial *ompA* através do método *Neighbor-joining* com distâncias evolutivas estabelecidas por Kimura dois-parâmetros a partir de potenciais vetores de riquetsias infectados provenientes da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.**

**26**

## LISTA DE TABELAS

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1 – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento dos fragmentos dos genes riquetsiais.....  | 16 |
| Tabela 2 – Frequência absoluta (n) e relativa (%) de hospedeiros vertebrados com potenciais vetores riquetsias (carrapato, pulga, piolho e ácaro) coletados em diferentes municípios da região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. .... | 18 |
| Tabela 3 – Frequência absoluta (n) e relativa (%) de potenciais vetores de riquetsias (carrapatos, pulgas, piolhos, ácaros) coletados em diferentes municípios da região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. ....                       | 19 |
| Tabela 4 – Frequência absoluta (n) e relativa (%) de potenciais vetores de riquetsias coletados sobre hospedeiros vertebrados e no ambiente na região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. ....  | 20 |
| Tabela 5 – Frequência absoluta (n) e relativa (%) das espécies de potenciais vetores de riquetsias coletados na região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.....  | 21 |
| Tabela 6 - Frequência absoluta das espécies de potenciais vetores submetidos à PCR e frequência absoluta de positivos à presença de fragmentos de DNA de <i>Rickettsia</i> coletados na região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. .... | 22 |
| Tabela 7 – Frequência mínima de vetores infectados por riquetsias (%) para cada espécie de potenciais vetores analisados por município da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. ....  | 27 |

|   |           |
|---|-----------|
| <b>Tabela 8 – Distribuição das amostras sequenciadas com as respectivas identidades dos gêneros <i>Rickettsia</i>, por biologia molecular para fragmentos dos genes <i>gltA</i> e <i>ompA</i>, na região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. ....</b> | <b>28</b> |
|---|-----------|

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

|                   |   |
|-------------------|---|
| RGFM              | Riquetsia do Grupo Febre Maculosa                           |
| °C                | graus Celsius   |
| m                 | metro   |
| CRES              | Coordenadoria Regional Estadual de Saúde                    |
| SES               | Secretaria Estadual de Saúde                                |
| CE                | Ceará   |
| mL                | mililitro   |
| P.A.              | para análise  |
| LACEN             | Laboratório Central de Saúde Pública                        |
| LIRN              | Laboratório Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses |
| IOC               | Instituto Oswaldo Cruz                                      |
| FIOCRUZ           | Fundação Oswaldo Cruz                                       |
| DNA               | ácido desoxirribonucléico                                   |
| PCR               | reação em cadeia da polimerase                              |
| DNAg              | ácido desoxirriborribonucléico genômico                     |
| Min               | minutos   |
| µL                | microlitro  |
| NaCl              | cloreto de sódio  |
| M                 | molar   |
| DNase             | desoxirribonuclease   |
| RNase             | ribonuclease  |
| EDTA              | ácido etilenodiamino tetra-acético                          |
| mM                | milimolar   |
| pH                | potencial hidrogênionico                                    |
| Tris HCl          | trisaminimetano   |
| SDS               | dodecil sulfato de sódio                                    |
| mg/mL             | miligrama por mililitro                                     |
| rpm               | rotações por minuto   |
| GL                | Gay Lussac  |
| ng                | nanograma   |
| MgCl <sub>2</sub> | cloreto de magnésio   |
| dNTP              | desoxirribonucleotídeos fosfatados                          |
| pb                | par de bases  |

# 1 INTRODUÇÃO

Riquetsioses são moléstias re-emergentes causadas por bactérias Gram negativas, pleomórficas, intracelulares obrigatórias, pertencentes a classe das Alphaproteobactérias da ordem Rickettsiales transmitidas por artrópodes com distribuição mundial (Parola et al 2013). A Febre Maculosa (FM) é uma zoonose com conexão de morbi-mortalidade às espécies de riquetsias existentes em determinada área, compartilhando de elementos epidemiológicos (Rudakov et al 2003).

A ordem Rickettsiales é composta por duas famílias: Anaplasmataceae, constituída por espécies dos gêneros: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*; e Rickettsiaceae, de importância na saúde pública, constituída por espécies dos gêneros *Orientia* e *Rickettsia* (Dumler et al 2011).

Apesar de divergências quanto a caracterização fenotípica e genotípica, tradicionalmente, o gênero *Rickettsia* é formado por três grupos: Grupo Tifo (GT) constituído por *R. prowazekii* transmitida por artrópodes da ordem Phthiraptera (piolhos) e *R. typhi* por artrópodes da ordem Siphonaptera (pulgas); Grupo Ancestral formado por *R. bellii* e *R. canadensis*, ambas de patogenicidade desconhecida à humanos; e Grupo Febre Maculosa (GFM) composto por mais de 20 espécies do gênero *Rickettsia*, como por exemplo: *Candidatus R. amblyommii*; *Candidatus R. andeanae*; *R. aeschlimannii*; *R. africae*; *R. australis*; *R. conorii* subs. *cáspia*; *R. conorii* subs. *conorii*; *R. conorii* subs. *indica*; *R. conorii* subs. *israelenses*; *R. heilongjiangensis*; *R. helvética*; *R. honei*; *R. japonica*; *R. massilae*; *R. monacensis*; *R. parkeri*; *R. philipii*; *R. raoultii*; *R. rickettsii*; *R. sibirica* subs. *mongolitimona*; *R. sibirica* subs. *sibirica*; *R. slovacae*; *R. sp. strain Atlantic rainforest* ou Bahia e *R. tamurae* todas vetoradas por ixodídeos (carrapatos duros), à exceção *R. akari* e *R. felis*, transmitidas por ácaros e pulgas, respectivamente (Blair et al 2004, Gillespie et al 2008, Parola et al 2013).

Dentre as riquetsias causadoras de FM destaca-se *R. rickettsii*, isolada pela primeira vez nos E.U.A. em 1909. Esta espécie apresenta maior virulência a humanos e é o agente etiológico da “Rocky Mountain Spotted Fever” (Febre Maculosa das Montanhas Rochosas - FMMR) nos E.U.A. (Parola, Paddock e Raoult 2005), conhecida no Brasil como Febre Maculosa Brasileira (FMB), ou “Fiebre Manchada” na Argentina, Costa Rica, México, Panamá e Colômbia, também chamada neste último país de “Fiebre de Tobia” (Dias e Martins 1938, Hidalgo et al

2007, Parola et al 2013).

A FMB é uma moléstia reconhecida no Brasil desde o final dos anos 1920 (Dias e Martins 1938). Segundo Monteiro e Fonseca (1932), carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense sensu lato* foram capazes de transmitir o agente etiológico, *R. rickettsii*, para animais de laboratório, e através da forma transovariana para sua prole. Recentemente, Pinter e Labruna (2006) demonstraram a capacidade de ninfas de *Amblyomma aureolatum* transmitirem o agente etiológico da FMB em cobaias, aumentando assim o número de vetores de *R. rickettsii*.

Os sinais e sintomas mais comuns em pacientes diagnosticados com FMB são: febre alta, geralmente acompanhada de cefaleia, náusea, vômito, anorexia e mialgia. Manifestações severas podem incluir pneumonia, edema pulmonar, gangrena, falência renal aguda e síndromes encefálicas agudas, como: confusão mental, convulsão e coma (Lemos 2001). Os sinais e quadro sintomatológico da FM no Brasil varia de acordo com as regiões envolvidas nos casos humanos, na região Sudeste a maioria quase absoluta dos casos evolui ao óbito associados à *R. rickettsii*, ao passo que na região Sul e Nordeste os casos não evoluem ao óbito além dos pacientes apresentarem, com maior frequência, erupção cutânea generalizada, linfonodos infartados, lesões de mucosa e escaras de inoculação no sítio de fixação do vetor, sendo esses casos associados à *R. parkeri* ou *Rickettsia* sp. strain *Atlantic forest* (Labruna 2009, Silva et al 2011, Spolidorio et al 2010).

Diferentes espécies de carrapatos são identificadas como vetores de riquetsias em diferentes regiões do globo terrestre. Nos EUA, os principais carrapatos vetores são *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis*, *Amblyomma cajennense sensu lato* e *Rhipicephalus sanguineus* (Parola, Labruna e Raoult 2009) ademais, *R. rickettsii* já foi encontrada infectando naturalmente carrapatos de outras espécies como: *A. americanum* nos EUA (Breitschwerdt et al 2011), *A. imitator* no México (Oliveira et al 2010), *A. nitens* no Panamá (Bermudez et al 2009) e *Haemaphysalis leporispalutris* na Costa Rica (Hun et al 2008). No Brasil, as espécies *A. cajennense sensu lato* e *A. aureolatum* são vetores comprovados de *R. rickettsii*, em áreas endêmicas de FMB (Pinter e Labruna 2006). *A. cajennense sensu lato* é a principal espécie de carrapato vetor na América do Sul (Labruna et al 2011).

Até o início do século XXI apenas três espécies de riquetsias eram reconhecidas como circulantes na América do Sul, por intermédio de evidências clínicas e sorológicas, ainda assim, somente uma dessas espécies pertencia ao GFM - *R. rickettsii* (Labruna 2009).

À partir de 2007, com o advento de técnicas moleculares outras espécies de riquetsias do Grupo Febre Maculosa (RGFM), passaram a ser identificadas no Brasil infectando ixodídeos e também relacionadas em casos humanos, como é o caso da espécie *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest relacionada a dois casos clínicos de FM (Silva et al 2011, Spolidorio et al 2010), e que já foi encontrada em carrapatos das espécies *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* e *Rhipicephalus sanguineus*, todos em região de Mata Atlântica (Barbieri et al 2014, Medeiros et al 2011). *Rickettsia parkeri* identificada infectando carrapatos da espécie *Amblyomma triste* (Silveira et al 2007); *Rickettsia felis* infectando pulgas do gênero *Ctenocephalides* nas cinco regiões geopolíticas do país (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) (Horta et al 2014).

Outras espécies que apresentam potencial de patogenicidade desconhecido também já foram detectadas no Brasil: *Rickettsia rhipicephali* infectando *Haemaphysalis juxtakochii* e cães, que apresentaram evidências sorológicas quanto ao prévio contato com este agente (Labruna et al 2005, Labruna et al 2007); *Rickettsia monteiroi* infectando *Amblyomma incisum* na região sudeste (Pacheco et al 2011); *Candidatus Rickettsia amblyommii* infectando *A. longirostre* (Labruna et al 2011). *Rickettsia bellii* infectando pelo menos 11 espécies de ixodídeos: *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. sculpturatum*, *A. humerale*, *A. rotundatum*, *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. nodosum*, *Ixodes loricatus* e *Haemaphysalis justakochi*. (Labruna et al 2011); e mais recentemente, *Candidatus Rickettsia andeanae* infectando *A. parvum* nos Estados do Mato Grosso do Sul e do Piauí (Nieri-Bastos et al 2014). Espécies de RGFM registradas apenas em vetores são referenciadas como de patogenicidade desconhecida, contudo, quando diagnosticadas em casos humanos e associadas ao quadro sintomatológico semelhante ao de FM, passam a integrar o GFM, como por exemplo, *R. parkeri* (Paddock et al 2004, Romer et al 2011).

Atualmente, sabe-se que no ciclo enzoótico de RGFM, artrópodes podem atuar como vetores, bem como reservatórios (Parola e Raout 2001), além de serem diagnosticadas em diferentes espécies de carrapatos, a partir do fragmento de genes de DNA dessas bactérias (Parola et al 2013).

Sabidamente, vetores e hospedeiros de riquetsias variam no tempo e espaço. *R. rickettsii* tem sido descrita como o agente etiológico da FMB transmitida pelo carrapato *A. cajennense sensu lato* desde a década de 1920 (Dias e Martins, 1938). Já com o advento da biologia molecular, pôde-se constatar a ocorrência de *R.*

*rickettsii* em *A. aureolatum* (Pinter e Labruna, 2006), *A. cajennense sensu lato* (Guedes et al. 2005), *C. felis*, *R. sanguineus* (Gehrke et al. 2009) e *A. dubitatum* (Moura-Martinião et al. 2014). Assim, diferentes espécies de carrapatos, e também pulgas passaram a ser consideradas importantes na transmissão de RGFM no Brasil. A importância do cão (*Canis familiaris*) e de outros animais domésticos e silvestres nas RGFM foi pela primeira vez assinalada em 1933, em uma lista publicada em Minas Gerais por Octávio de Magalhães e Adyr Rocha (Lemos 1991).

No Brasil, casos de óbito de FM vinculados à *R. rickettsii* ocorrem em sua maioria quase absoluta na região sudeste, principalmente no Estado de São Paulo, frequentemente associados à *A. cajennense sensu lato* e *A. aureolatum* (Labruna 2009). Nos últimos anos, novos casos de FM em pacientes apresentando sintomatologia diferente da forma clássica, e posteriormente, identificando o agente etiológico como *Rickettsia* sp. strain Atlantic Forest, foram observados nos Estados de São Paulo - em área de reserva florestal de Mata Atlântica, e Bahia - parque nacional que possui uma variedade de ecossistemas – (Spolidorio et al 2010, Silva et al 2011). Investigações de potenciais vetores foram realizadas em diferentes áreas de Mata Atlântica no país incriminando *A. ovale* como o possível vetor dessa nova cepa de riquetsia. Ademais, formas adultas são frequentemente encontradas em cães localizados em áreas rurais e próximos a ambientes florestais (Szabo et al 2013).

Em 2010, o Estado do Ceará registrou seu primeiro caso confirmado de FM, mais precisamente na região do Maciço de Baturité, no município de Aratuba. Nos anos seguintes, de 2011 a 2014 houve a confirmação de mais oito casos nos municípios de Aratuba (um caso), Baturité (um caso), Fortaleza (um caso), Guaramiranga (quatro casos) e Pacoti (um caso), todos os municípios pertencentes à região do Maciço de Baturité, área de estudo do presente trabalho, à exceção do município de Fortaleza, capital do Estado do Ceará (SINAN/SVS/MS, 2015). Em que pese, algumas notificações ainda permanecem sem confirmação pela ausência de provas laboratoriais ou pela ausência de avaliação de risco de áreas com circulação de riquetsias.

A região do Maciço de Baturité possui características particulares de floresta de inclusão do complexo florestal de Mata Atlântica tropical dentro do bioma Caatinga, cujo os focos caracterizam-se como áreas de borda de fragmentos florestais com proximidade aos ambientes rural e peri-urbano. O comportamento dos animais domésticos, em particular os cães pertencentes às comunidades locais,

bem como os próprios humanos, que transitam livremente à mata, somados à presença de animais silvestres parasitados por diferentes artrópodes, associados às condições geo-climáticas específicas da área do presente estudo, propiciam um ambiente favorável a concentração de potenciais vetores de riquetsias, bem como o aparecimento de casos de Febre Maculosa.

Apesar de casos confirmados de FM, frente à presença de riquetsias patogênicas em diferentes regiões do país, a caracterização do ciclo enzoótico e epidêmico desses bioagentes ainda é incipiente, não sendo possível um direcionamento adequado das políticas de saúde pública.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar a circulação de bactérias do gênero *Rickettsia* na região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, buscando apoiar as ações de saúde na região.

### **2.2 Objetivos Específicos**

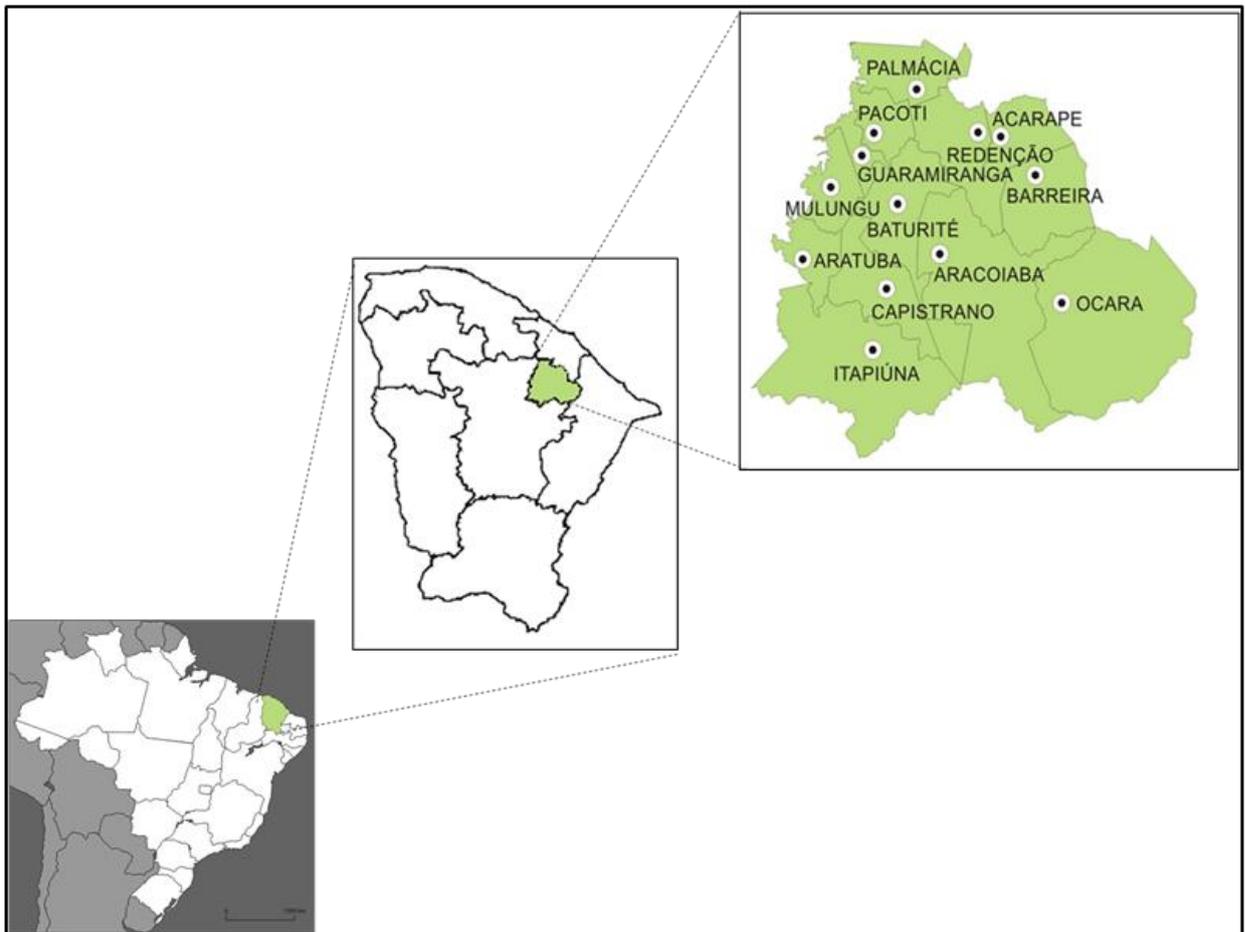
- Identificar a fauna de ectoparasitos potenciais vetores de riquetsias e de seus hospedeiros vertebrados.
- Identificar as riquetsias circulantes em potenciais vetores.
- Analisar parâmetros eco-epidemiológicos associados aos focos de febre maculosa.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Área de Estudo**

O estudo foi realizado em nove municípios da região do Maciço de Baturité (Aracoiaba, Aratuba, Baturité, Capistrano, Guaramiranga, Itapiuna, Mulungu, Pacoti e Redenção), Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

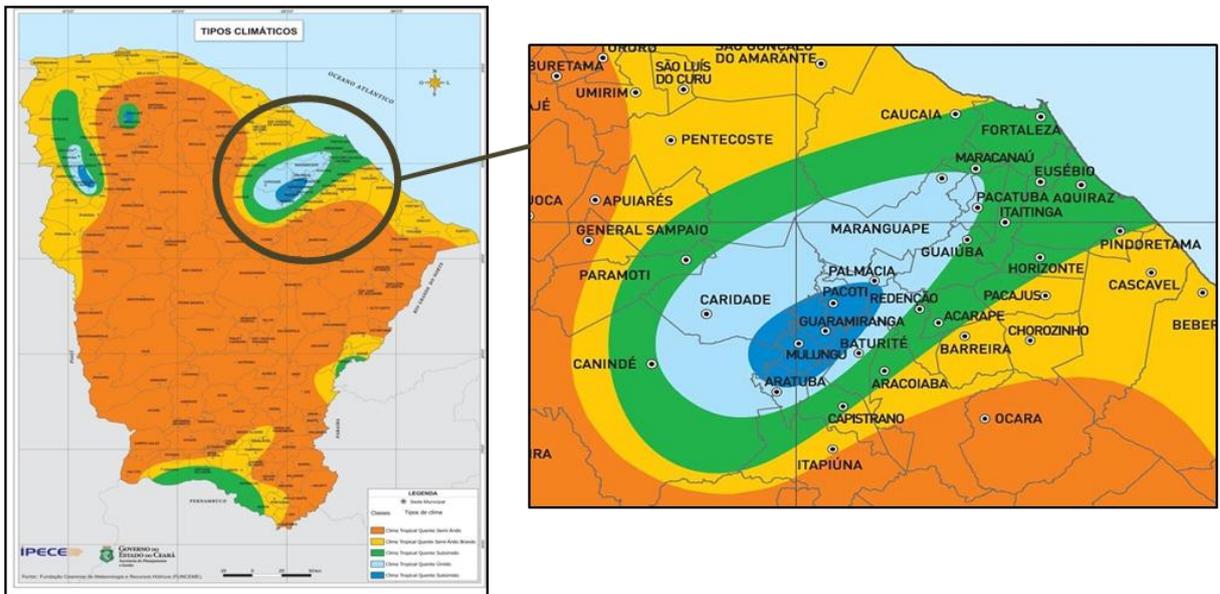
A região do Maciço de Baturité se caracteriza pela presença fragmentos florestais e uma complexa formação vegetal com características gerais de floresta tropical úmida, que atualmente fazem parte do Complexo florestal da Mata Atlântica, representando um ambiente de exceção no interior do bioma Caatinga (Figs. 1 e 2). A faixa de temperatura anual (19 a 22°C) é atenuada devido às partes mais elevadas do relevo, com até 600m. Tais características morfológicas e climáticas da região desempenham papel singular isolando fisicamente as espécies que ocorrem nesta região (Fig. 3) (Workshop Mata Atlântica do Nordeste, 1993).



**Figura 1** – Mapa do Brasil, Estado do Ceará, destacando os municípios formadores da Região do Maciço de Baturité.



**Figura 2** – Fotos da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará onde foram realizadas as coletas de potenciais vetores de riquetsias, no período de Abril de 2011 a Março de 2013 exemplificando os diferentes ambientes da região - **A**: ambiente rural; **B**: ambiente de fragmento florestal com complexa formação vegetal de Mata Atlântica; **C**: ambiente peri-domiciliar.



**Figura 3** – Caracterização climática do Estado do Ceará, destacando a região do Maciço de Baturité. **Azul escuro:** Clima Tropical Subtropical Subúmido; **Azul claro:** Clima Tropical Quente Úmido; **Verde:** Clima Tropical Quente Subúmido; **Amarelo:** Clima Tropical Quente Semi-Árido Brando; **Laranja:** Clima Tropical Quente Semi-Árido.

### 3.2 Coleta de Ectoparasitos

Todas as coletas de potenciais vetores de riquetsias ocorreram durante vigilância de ambiente e investigação de casos para Febre Maculosa pela 4ª Coordenadoria Regional de Saúde da Secretaria Estadual de Saúde do Ceará (4ª CRES/SES/CE).

Animais domésticos foram submetidos ao processo de escovação e catação ativa de ectoparasitos, bem como animais silvestres, que foram recolhidos, devidamente tratados e abrigados, pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres do Ibama no Estado do Ceará. Já os roedores capturados foram contidos mecanicamente, com o auxílio de pinças, e escovados para a retirada de ectoparasitos (Fig. 4A), seguindo a técnica utilizada pela equipe de campo do programa de controle e vigilância do foco de peste bubônica da Fundação Nacional de Saúde (Carvalho, 1999).

Vetores ápteros em humanos (*Homo sapiens* Linnaeus, 1758) foram obtidos através da entrega voluntária dos espécimes por pessoas parasitadas durante as ações de vigilância de ambiente e investigação de casos. Somente ectoparasitos coletados em sítios de fixação evidentes às equipes de campo foram considerados

como oriundos de humanos (Fig 4B). Todos os carrapatos foram removidos dos hospedeiros através de torção em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma, com a finalidade de preservar a integridade morfológica para a diagnose. Quanto a coleta em ambiente, utilizou-se a técnica de arrasto e busca ativa direta em áreas rurais e peri-urbanas próximas da borda de mata e em região peri-domiciliar ou em área apontada como provável local de infestação por ectoparasitos. Todos os ectoparasitos coletados foram depositados em microtubos de 1.5mL contendo isopropanol P.A., sendo identificados por fichas de encaminhamento de amostras pela equipe de vigilância de ambiente e investigação de casos de Febre Maculosa.



**Figura 4 – A:** Foto de *R. sanguineus* parasitando roedor capturado durante vigilância de ambiente e investigação de casos de FM, na região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013. **B:** Escara de inoculação no sítio de fixação de potencial vetor de riquetsias em humano morador da região do Maciço de Baturité.

### 3.3 Amostragem de Hospedeiros Vertebrados

As diferentes espécies de hospedeiros vertebrados obtidos para a coleta de potenciais vetores de riquetsias foram: cão (*Canis familiaris* Linnaeus, 1758); cavalo (*Equus caballus* Linnaeus, 1758); gato (*Felis catus* Linnaeus 1758); jumento (*Equus asinus* Linnaeus, 1758); cervídeo; tamanduá (Fam.: Myrmecophagidae), tatu (Fam.: Dasypodidae); guaxinim (Fam.: Procyonidae) e roedores (*Cerradomys* spp. Weksler Percequillo Voss, 2006) e (*Oligoryzomys* spp. Bangs, 1900).

Os animais domésticos – cão, cavalo, gato e jumento – foram obtidos durante investigação de áreas de foco de Febre Maculosa pela equipe de vigilância de ambiente e investigação de casos para Febre Maculosa da 4ª CRES/SES/CE.

Os animais silvestres como roedores, foram capturados com o auxílio de armadilhas tipo Sherman e Tomahawk, iscadas com banana e mandioca e identificados através de caracteres externos seguindo Emmons e Feer 1997 e revalidados por Bonvicino et al (2008). Já os demais animais silvestres como cervídeo, guaxinim, tamanduá e tatu foram capturados no entorno da mata que apresentava atividade antrópica dos municípios da região do Maciço de Baturité e foram classificados através de caracteres externos até o menor nível taxonômico possível pelo Centro de Triagem de Animais Silvestres do Ibama no Estado do Ceará.

### 3.4 Triagem e Identificação dos Ectoparasitos

Uma vez realizada a coleta em campo, todos os potenciais vetores de riquetsias foram encaminhados ao Laboratório Central do Estado do Ceará (LACEN/CE) e, posteriormente, encaminhados ao Laboratório Referência Nacional de Vetores das Riquetsioses (LIRN/IOC/FIOCRUZ), seguindo o fluxo estabelecido pela Rede Nacional de Vigilância de Ambiente da Febre Maculosa e outras Riquetsioses.

Os carrapatos foram taxonomicamente identificados seguindo Amorim e Serra-Freire (1999) para estágio larval; Martins et al (2010) para estágio de ninfa, Aragão e Fonseca (1961), Barros-Battesti et al (2006) para estágio adulto. Linardi e Guimarães (2000); Price et al (2003) e Krantz (2009) foram utilizados para classificação taxonômica de pulgas, piolhos e ácaros, respectivamente.

### 3.5 Pesquisa de Bioagente

Os espécimes foram dispostos em microtubos de 1.5mL, individualmente ou reunidos em grupos. Esses grupos foram formados por indivíduos da mesma espécie, estágio de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto) e sexo. Além disso, todos indivíduos que formaram um mesmo grupo, foram provenientes do mesmo hospedeiro vertebrado. Posteriormente, as amostras foram submetidas a extração de DNA genômico, PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), purificação do fragmento de DNA amplificado considerado positivo, clonagem e sequenciamento do mesmo.

#### 3.5.1 Extração de DNA genômico

O DNAg das amostras foi obtido através da técnica de extração enzimática previamente descrita por Aljanabi e Martinez, 1997.

Após a retirada de todo o conteúdo líquido (isopropanol P.A.) no microtubo, os potenciais vetores ali contidos foram imergidos em nitrogênio líquido por 20 segundos, e triturados com pistilos de vidro previamente esterilizados em autoclave a 121°C por 30min. Em seguida o material macerado foi submetido às seguintes etapas:

Ressuspensão em 400µL de solução “Buffer” A (NaCl a 0.4M; EDTA a 2mM pH 8.0 e Tris Hcl a 10mM pH 8.0);

Adição 40µL de solução SDS a 20% e 8µL de solução Proteinase K (Invitrogen®) a 0.4 mg/mL;

Homogeneização em vórtex por 30s;

Banho maria a 55°C – 56°C por duas horas;

Adição de 300µl de solução NaCl 6M;

Homogeneização em vórtex por 30s;

Centrifugação a 10.000 rpm por 30 min;

Transferência do sobrenadante (600µL) para um novo microtubo de 1.5mL DNase e RNase “free”;

Adição de 600µL de isopropanol P.A.;

Armazenamento das amostras em freezer -20°C por duas horas;

Centrifugação a 10.000 rpm por 10 min;

Descarte do sobrenadante e ressuspensão em 600µL com etanol 70°GL;

Centrifugação a 10.000 rpm por 10 min;

Descarte do sobrenadante

Ressuspensão em 25µL em água Mili-Q®;

Armazenamento em freezer -20°C.

Todas as amostras extraídas foram submetidas à PCR para ITS2 (espaçador transcrito interno) dos potenciais vetores buscando validar o protocolo de extração.

### **3.5.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

Todas as amostras foram processadas para detecção de fragmentos de DNA bactérias do gênero *Rickettsia* spp. utilizando oligonucleotídeos para amplificar fragmentos do gene citrato sintase (*glfA*), gênero-específicos, e do gene da proteína de membrana externa A (gene *ompA*), grupo febre maculosa (GFM) específico (Tab. 1). Nas reações de PCR foram utilizadas soluções de 100 a 150ng DNA (1µL); 19.4µL água MiliQ®; 2.5µL Buffer 10X sem MgCl<sub>2</sub>; 0.8µL de MgCl<sub>2</sub>; 0.2µL de solução dNTP a 2.5mM; 0.5µL de cada oligonucleotídeo a 10µM e 0.1µL de Taq DNA-polimerase Platinum® a 5U/µL, totalizando 25µL de produto final. Todas as reações realizadas apresentavam o ciclo de 94°C 3'30" [94°C 30", 48°C ou 55°C 30", 72°C 1'/Kb] 40 ciclos; 72°C 7'; 20°C ∞. As temperaturas de anelamento na PCR variavam de acordo com o gene pesquisado, ou seja, para amplificação da região CS2 e CS4 relativa ao gene *glfA* de *Rickettsia* spp. a temperatura de anelamento na reação foi de 48°C, já para as reações correspondentes ao gene *ompA*, a temperatura de anelamento foi de 55°C. Como controle positivo, utilizou DNAg de *R. rickettsii* (Pinter e Labruna, 2006) e como controle negativo água Mili-Q®. Após realização da PCR, todas as amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1%, coradas com brometo de etídeo e observada em luz ultravioleta no transiluminador DNR Mini Bis Pro Uniscience®, com a finalidade de visualizar o fragmento de DNA amplificado (Sambrook & Russel, 2001).

**Tabela 1** – Oligonucleotídeos utilizados para amplificação e sequenciamento dos fragmentos dos genes riquetsiais.

| Gene                     | Oligonucleotídeo | Sequência Nucleotídica (5'→3') | Produto do Fragmento (pb) |
|--------------------------|------------------|--------------------------------|---------------------------|
| <i>gltA</i> <sup>+</sup> | CS-78            | GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT        | 401                       |
|                          | CS-323           | GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGA    |                           |
| <i>gltA</i> <sup>+</sup> | CS-239           | GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT      | 834                       |
|                          | CS-1069          | CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT          |                           |
| <i>ompA</i> <sup>!</sup> | Rr190.70p        | ATGGCGAATATTTCTCCAAAA          | 532                       |
|                          | Rr190.602n       | AGTGCAGCATTGCTCCCCCT           |                           |

<sup>+</sup>Labruna et al (2004); <sup>!</sup>Regnery et al (1991).

### 3.5.3 Purificação, Clonagem e Sequenciamento

Todas as amostras positivas para ambos os genes foram purificadas utilizando o sistema HiYield™ Gel/PCR DNA Mini Kit (Real Genomics™) de acordo com as instruções contidas no manual do fabricante. O produto final purificado foi quantificado no NanoDrop™ 1000 (Thermo Scientific) através da aplicação direta de 1µL de amostra. As purificações que apresentavam DNA em quantidade suficiente foram utilizadas em reações de sequenciamento que totalizavam 10µL e continham: 1µL de Reaction Kit; 1.5µL de BigDye Sequencing Buffer (5X); 1µL do mesmo oligonucleotídeo iniciador utilizado nas reações de PCR inicial (senso ou antissenso) na concentração de 3.2pmol; volume de amostra contendo DNA a ser sequenciado (5 a 20ng para fragmentos com tamanhos entre 500-1000pb) e água Mili-Q para completar o volume. A ciclagem básica para reação de sequenciamento com o BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 foi: 96°C 1' [96°C 15"; 50°C 15"; 60°C 4'] 25 a 40 ciclos e 4°C a 8°C∞. Após a reação no termociclador as placas de sequenciamento passaram por uma etapa de precipitação do material antes de serem analisadas pelo sequenciador ABI 3130x1 – Applied Biosystems®.

Das amostras positivas obtidas após o sequenciamento da porção CS4 do gene *gltA*, três amostras (LIC 4316, LIC 4317 e LIC 4328) foram escolhidas para análise posterior e os oligonucleotídeos iniciadores CS-78 e CS-323; Rr190.70p e Rr190.602n foram utilizados para amplificar a porção CS2 do gene *gltA* e a porção

inicial do gene *ompA*, respectivamente. Para essas três amostras de DNA, os três fragmentos amplificados (CS2, CS4 e *ompA*) foram clonados utilizando o sistema TOPO® TA Cloning® com pCR™4-TOPO TA Vector de acordo com as especificações do fabricante. Os clones foram sequenciados com oligonucleotídeos M13F e M13R.

#### **3.5.4 Análise das Sequências**

O produto final do sequenciamento foi analisado e editado pelo programa SEQMAN® do pacote de programas para Windows Lasergene DNASTAR™. As sequências de nucleotídeos obtidas foram comparadas com as sequências de riquetsias previamente depositadas e disponíveis no banco de dados do GenBank utilizando os algoritmos BLASTN e BLASTP, respectivamente (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

#### **3.5.5 Análise Filogenética**

Para a reconstrução filogenética, foi utilizado o método (*Neighbor-joining*) no programa MEGA 5.2 (Tamura et al 2011). As sequências analisadas foram previamente alinhadas utilizando a ferramenta ClustalW disponível no mesmo programa. O modelo evolutivo escolhido foi Kimura dois-parâmetros com 1000 repetições e exclusão dos “gaps” presentes no alinhamento.

#### **3.5.6 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)**

O resultado do cálculo deste indicador permite inferir, com segurança, a frequência mínima de vetores infectados de uma dada espécie em uma determinada área. A FMVI foi calculada para cada espécie após obter os resultados na PCR (Burket et al 1998).

$$FMVI = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de amostras positivas para cada espécie}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de vetores de cada espécie}}$$

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Hospedeiros Vertebrados Obtidos na Área de Estudo

Os hospedeiros vertebrados parasitados por possíveis vetores de riquetsias totalizaram 260 espécimes durante vigilância de ambiente e investigação de casos para Febre Maculosa pela 4ª Coordenadoria Regional de Saúde da Secretaria Estadual de Saúde do Ceará (4ª CRES/SES/CE) (Tab. 2).

**Tabela 2** – Frequência absoluta (n) e relativa (%) de hospedeiros vertebrados com potenciais vetores riquetsias (carrapato, pulga, piolho e ácaro) coletados em diferentes municípios da região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

| <b>Hospedeiro Vertebrado</b> | <b>n</b>   | <b>%</b>   |
|------------------------------|------------|------------|
| <i>Canis familiaris</i>      | 188        | 72.3       |
| <i>Bos taurus</i>            | 28         | 10.8       |
| <i>Equus asinus</i>          | 18         | 6.9        |
| <i>Equus caballus</i>        | 6          | 2.3        |
| <i>Felis catus</i>           | 3          | 1.2        |
| <i>Cerradomys</i> sp.        | 5          | 1.9        |
| <i>Oligoryzomys</i> sp.      | 4          | 1.5        |
| <u>Cervidae</u>              | 1          | 0.4        |
| <u>Dasypodidae</u>           | 1          | 0.4        |
| <u>Myrmecophagidae</u>       | 1          | 0.4        |
| <u>Procyonidae</u>           | 1          | 0.4        |
| <i>Homo sapiens</i>          | 4          | 1.5        |
| <b>TOTAL</b>                 | <b>260</b> | <b>100</b> |

## 4.2 Distribuição de Artrópodes Coletados e Identificados

Dos 1727 potenciais vetores de riquétsias identificados, 824 foram provenientes de Aratuba, município que apresentou o primeiro caso de FM na região do Maciço de Baturité. A procedência dos demais potenciais vetores de riquétsias é demonstrada na tabela 3.

**Tabela 3** – Frequência absoluta (n) e relativa (%) de potenciais vetores de riquétsias (carrapatos, pulgas, piolhos, ácaros) coletados em diferentes municípios da região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

| Região             | Município      | n           | %          |
|--------------------|----------------|-------------|------------|
|                    | Aracoiaba      | 167         | 9.67       |
|                    | Aratuba *      | 824         | 47.71      |
|                    | Baturité *     | 96          | 5.56       |
|                    | Capistrano     | 111         | 6.43       |
| Maciço de Baturité | Guaramiranga * | 100         | 5.79       |
|                    | Itapiuna       | 48          | 2.78       |
|                    | Mulungu        | 259         | 15         |
|                    | Pacoti *       | 24          | 1.39       |
|                    | Redenção       | 98          | 5.67       |
|                    | <b>TOTAL</b>   | <b>1727</b> | <b>100</b> |

\* = Municípios com casos confirmados de Febre Maculosa (Fonte: SINAM, 2015).

Do total de potenciais vetores de riquétsias coletados na região estudada, ectoparasitos encontrados sobre animais de importância zootécnica corresponderam a frequência relativa de 41.7%, ao passo que artrópodes coletados em animais de companhia totalizaram 47.3% (Tab. 4).

**Tabela 4** – Frequência absoluta (n) e relativa (%) de potenciais vetores de riquetsias coletados sobre hospedeiros vertebrados e no ambiente na região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

| Hospedeiro              | Ectoparasitos |              |           |             |          |             |           |             |             |            |
|-------------------------|---------------|--------------|-----------|-------------|----------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|
|                         | Carrapatos    |              | Pulgas    |             | Piolhos  |             | Ácaros    |             | TOTAL       |            |
|                         | n             | %            | n         | %           | n        | %           | n         | %           | n           | %          |
| <i>Canis familiaris</i> | 748           | 43.31        | 60        | 3.47        | 5        | 0.29        | 0         | 0           | 813         | 47.07      |
| <i>Bos taurus</i>       | 331           | 19.17        | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 331         | 19.17      |
| <i>Equus asinus</i>     | 289           | 16.73        | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 289         | 16.73      |
| <i>Equus caballus</i>   | 100           | 5.79         | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 100         | 5.79       |
| <i>Homo sapiens</i>     | 4             | 0.23         | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 4           | 0.23       |
| <i>Felis catus</i>      | 0             | 0            | 4         | 0.23        | 0        | 0           | 0         | 0           | 4           | 0.23       |
| Dasypodidae             | 13            | 0.75         | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 13          | 0.75       |
| Cervidae                | 7             | 0.41         | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 7           | 0.41       |
| Myrmecophagidae         | 7             | 0.41         | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 7           | 0.41       |
| Procyonidae             | 2             | 0.12         | 0         | 0           | 0        | 0           | 0         | 0           | 2           | 0.12       |
| <i>Oligoryzomys sp.</i> | 2             | 0.12         | 4         | 0.23        | 0        | 0           | 27        | 1.56        | 33          | 1.91       |
| <i>Cerradomys sp.</i>   | 1             | 0.06         | 1         | 0.06        | 0        | 0           | 46        | 2.66        | 48          | 2.78       |
| Ambiente                | 71            | 4.11         | 5         | 0.29        | 0        | 0           | 0         | 0           | 76          | 4.4        |
| <b>TOTAL</b>            | <b>1575</b>   | <b>91.21</b> | <b>74</b> | <b>4.28</b> | <b>5</b> | <b>0.29</b> | <b>73</b> | <b>4.22</b> | <b>1727</b> | <b>100</b> |

Dos 1727 potenciais vetores de riquetsias obtidos no presente estudo, identificou-se 17 espécies de artrópodes na área estudada (Tab. 5). Dessas 17 espécies identificadas, 15 foram submetidos a PCR, totalizando 887 espécimes.

Todos os espécimes de ácaro e piolho submetidos à PCR foram negativos quanto a infecção por bactérias do gênero *Rickettsia*. Os únicos espécimes de pulga que não foram submetidos à PCR *Pulex irritans* e *Polygenes bohlsi bohlsi*, estão depositados na Coleção de Artrópodes Vetores Ápteros de Importância em Saúde das Comunidades (CAVAISC) sob os códigos CAVAISC-SIPHO 185 e CAVAISC-SIPHO 186, respectivamente (Tab. 6).

**Tabela 5** – Frequência absoluta (n) e relativa (%) das espécies de potenciais vetores de riquetsias coletados na região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

| Vetor                           | Município  |             |            |              |           |             |            |             |              |             |           |             |            |           |           |             |           |             |             |            |      |
|---------------------------------|------------|-------------|------------|--------------|-----------|-------------|------------|-------------|--------------|-------------|-----------|-------------|------------|-----------|-----------|-------------|-----------|-------------|-------------|------------|------|
|                                 | Aracoiaba  |             | Aratuba    |              | Baturité  |             | Capistrano |             | Guaramiranga |             | Itapiuna  |             | Mulungu    |           | Pacoti    |             | Redenção  |             | TOTAL       |            |      |
|                                 | n          | %           | n          | %            | n         | %           | n          | %           | n            | %           | n         | %           | n          | %         | n         | %           | n         | %           | n           | %          |      |
| <i>A. aureolatum</i>            | 0          | 0           | 0          | 0            | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 1           | 0.06      | 0           | 0           | 1          | 0.06 |
| <i>A. cajennense s. l.</i>      | 0          | 0           | 1          | 0.06         | 0         | 0           | 2          | 0.12        | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 3          | 0.17 |
| <i>A. longirostre</i>           | 0          | 0           | 1          | 0.06         | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 1          | 0.06 |
| <i>A. nodosum</i>               | 0          | 0           | 0          | 0            | 7         | 0.41        | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 7          | 0.41 |
| <i>A. ovale</i>                 | 0          | 0           | 98         | 5.67         | 2         | 0.12        | 2          | 0.12        | 17           | 0.98        | 0         | 0           | 51         | 2.95      | 5         | 0.29        | 1         | 0.06        | 176         | 10.19      |      |
| <i>A. parvum</i>                | 0          | 0           | 0          | 0            | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 15        | 0.87        | 15          | 0.87       |      |
| <i>Amblyomma sp.</i>            | 0          | 0           | 68         | 3.94         | 0         | 0           | 0          | 0           | 4            | 0.23        | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 72         | 4.16 |
| <i>A. tigrinum</i>              | 0          | 0           | 0          | 0            | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 1         | 0.06        | 1           | 0.06       |      |
| <sup>1</sup> <i>A. nitens</i>   | 57         | 3.3         | 131        | 7.59         | 5         | 0.29        | 28         | 1.62        | 65           | 3.76        | 22        | 1.27        | 77         | 4.46      | 8         | 0.46        | 46        | 2.66        | 439         | 25.42      |      |
| <i>B. microplus</i>             | 31         | 1.8         | 181        | 10.48        | 55        | 3.18        | 55         | 3.18        | 1            | 0.06        | 0         | 0           | 2          | 0.12      | 0         | 0           | 21        | 1.22        | 346         | 20.03      |      |
| <i>R. sanguineus</i>            | 75         | 4.34        | 223        | 12.9         | 27        | 1.56        | 24         | 1.39        | 10           | 0.58        | 21        | 1.22        | 113        | 6.54      | 7         | 0.41        | 14        | 0.81        | 514         | 29.76      |      |
| <i>C. felis</i>                 | 4          | 0.23        | 37         | 2.14         | 0         | 0           | 0          | 0           | 3            | 0.17        | 5         | 0.29        | 16         | 0.93      | 3         | 0.17        | 0         | 0           | 68          | 3.94       |      |
| <i>P. bohlsi bohlsi</i>         | 0          | 0           | 1          | 0.06         | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 1          | 0.06 |
| <sup>1</sup> <i>P. irritans</i> | 0          | 0           | 1          | 0.06         | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 1          | 0.06 |
| <i>X. cheopis</i>               | 0          | 0           | 4          | 0.23         | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 4          | 0.23 |
| <i>G. tiptoni</i>               | 0          | 0           | 73         | 4.23         | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 73         | 4.23 |
| <i>H. spiniger</i>              | 0          | 0           | 5          | 0.29         | 0         | 0           | 0          | 0           | 0            | 0           | 0         | 0           | 0          | 0         | 0         | 0           | 0         | 0           | 0           | 5          | 0.29 |
| <b>TOTAL</b>                    | <b>167</b> | <b>9.67</b> | <b>824</b> | <b>47.71</b> | <b>96</b> | <b>5.56</b> | <b>111</b> | <b>6.43</b> | <b>100</b>   | <b>5.78</b> | <b>48</b> | <b>2.78</b> | <b>259</b> | <b>15</b> | <b>24</b> | <b>1.39</b> | <b>98</b> | <b>5.68</b> | <b>1727</b> | <b>100</b> |      |

A: *Amblyomma*; s.l.: Sensu lato; <sup>1</sup>A: *Anocentor*; B: *Boophilus*; R: *Rhipicephalus*; C: *Ctenocephalides*; P: *Polygenis*; <sup>1</sup>P: *Pulex*; X: *Xenopsylla*; G: *Gigantolaelaps*; H: *Heterodoxus*.

**Tabela 6** - Frequência absoluta das espécies de potenciais vetores submetidos à PCR e frequência absoluta de positivos à presença de fragmentos de DNA de *Rickettsia* coletados na região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

| Vetor                         | Município |           |            |           |           |           |            |           |              |           |           |           |            |           |           |           |           |           |            |           |
|-------------------------------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|--------------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|-----------|
|                               | Aracoiaba |           | Aratuba    |           | Baturité  |           | Capistrano |           | Guaramiranga |           | Itapiuna  |           | Mulungu    |           | Pacoti    |           | Redenção  |           | TOTAL      |           |
|                               | PCR       | Positivos | PCR        | Positivos | PCR       | Positivos | PCR        | Positivos | PCR          | Positivos | PCR       | Positivos | PCR        | Positivos | PCR       | Positivos | PCR       | Positivos | PCR        | Positivos |
| <i>A. aureolatum</i>          | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 1         | 0         | 0         | -         | 1          | 0         |
| <i>A. cajennense s. l.</i>    | 0         | -         | 1          | 0         | 0         | -         | 2          | 0         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 3          | 0         |
| <i>A. longirostre</i>         | 0         | -         | 1          | 0         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 1          | 0         |
| <i>A. nodosum</i>             | 0         | -         | 0          | -         | 3         | 2         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 3          | 2         |
| <i>A. ovale</i>               | 0         | -         | 64         | 6         | 1         | 0         | 1          | 0         | 11           | 2         | 0         | -         | 33         | 4         | 3         | 0         | 1         | 0         | 114        | 12        |
| <i>A. parvum</i>              | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 9         | 2         | 9          | 2         |
| <i>Amblyomma sp.</i>          | 0         | -         | 68         | 0         | 0         | -         | 0          | -         | 4            | 0         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 72         | 0         |
| <i>A. tigrinum</i>            | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 1         | 0         | 1          | 0         |
| <sup>1</sup> <i>A. nitens</i> | 30        | 0         | 58         | 0         | 2         | 0         | 16         | 0         | 19           | 0         | 13        | 0         | 27         | 2         | 6         | 0         | 22        | 0         | 193        | 2         |
| <i>B. microplus</i>           | 6         | 0         | 62         | 0         | 11        | 0         | 15         | 0         | 1            | 0         | 0         | -         | 2          | 0         | 0         | -         | 7         | 0         | 104        | 0         |
| <i>R. sanguineus</i>          | 18        | 0         | 142        | 2         | 8         | 0         | 16         | 0         | 6            | 0         | 11        | 2         | 77         | 3         | 5         | 0         | 11        | 0         | 294        | 7         |
| <i>C. felis</i>               | 2         | 0         | 33         | 3         | 0         | -         | 0          | -         | 3            | 0         | 5         | 0         | 14         | 7         | 3         | 0         | 0         | -         | 60         | 10        |
| <i>P. bohlsi bohlsi</i>       | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 0          | -         |
| <i>P. irritans</i>            | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 0          | -         |
| <i>X. cheopis</i>             | 0         | -         | 3          | 0         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 3          | 0         |
| <i>G. tiptoni</i>             | 0         | -         | 26         | 0         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 26         | 0         |
| <i>H. spiniger</i>            | 0         | -         | 3          | 0         | 0         | -         | 0          | -         | 0            | -         | 0         | -         | 0          | -         | 0         | -         | 0         | -         | 3          | 0         |
| <b>TOTAL</b>                  | <b>56</b> | <b>0</b>  | <b>461</b> | <b>11</b> | <b>25</b> | <b>2</b>  | <b>50</b>  | <b>0</b>  | <b>44</b>    | <b>2</b>  | <b>29</b> | <b>2</b>  | <b>153</b> | <b>16</b> | <b>18</b> | <b>0</b>  | <b>42</b> | <b>2</b>  | <b>887</b> | <b>35</b> |

A: *Amblyomma*; s.l.: Sensu lato; <sup>1</sup>A: *Anocentor*; B: *Boophilus*; R: *Rhipicephalus*; C: *Ctenocephalides*; P: *Polygenis*; <sup>1</sup>P: *Pulex*; X: *Xenopsylla*; G: *Gigantolaelaps*; H: *Heterodoxus*.

### 4.3 Análise das Sequências

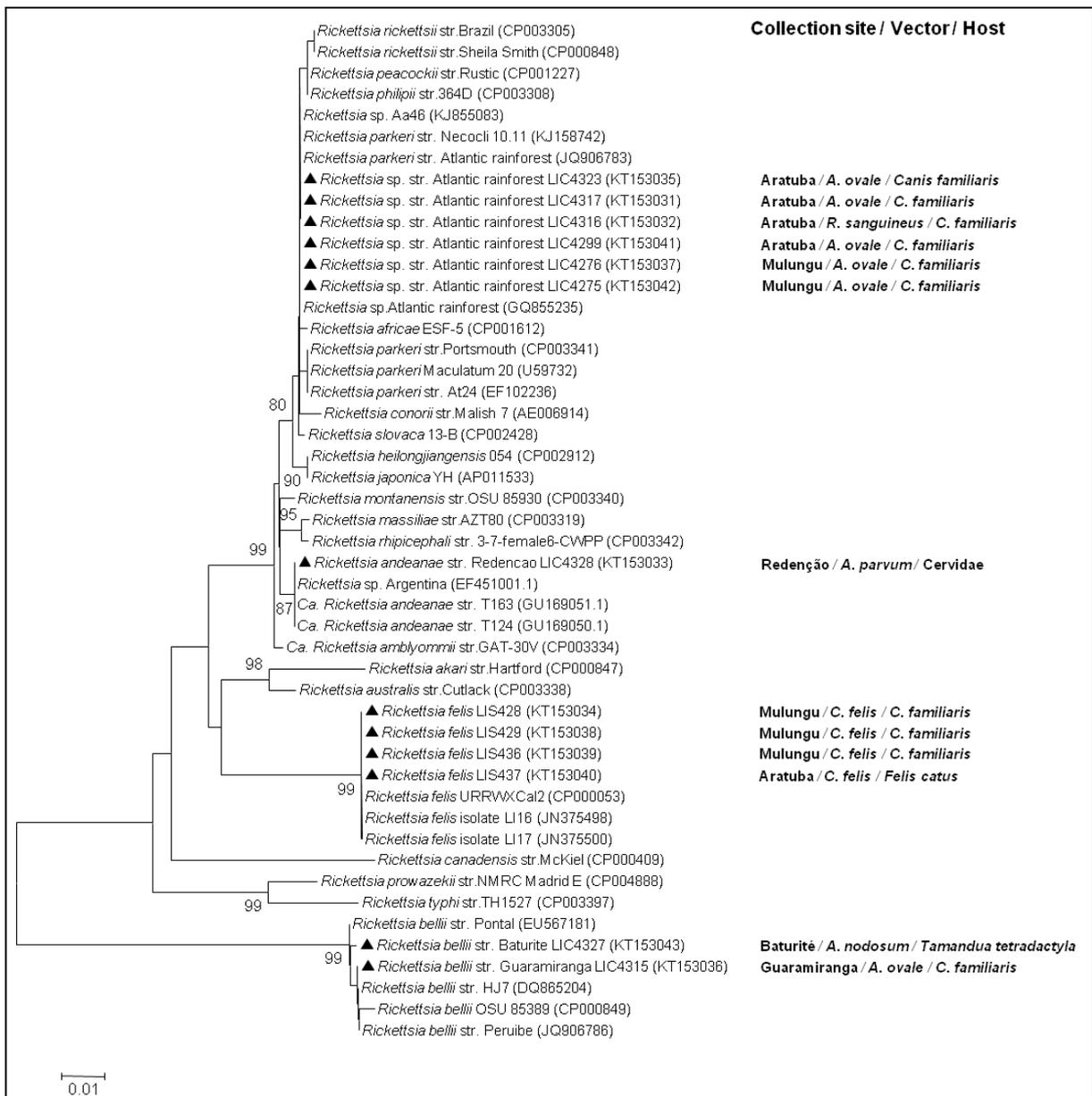
Das amostras consideradas positivas, treze foram sequenciadas para a região denominada CS4 do gene *gltA*. A figura 5 demonstra o resultado da árvore filogenética e pode-se verificar que há quatro diferentes espécies de bactérias do gênero *Rickettsia* sp. na região do Maciço de Baturité. A análise demonstrou a presença da espécie *Rickettsia felis* em seu vetor mais comum, pulgas da espécie *Ctenocephalides felis*. Este artrópode foi encontrado em dois municípios parasitando animais domésticos (cães – *Canis familiaris* e gatos – *Felis catus*) em um município com caso de FM já confirmado (Aratuba) e outro sem caso confirmado de FM (Mulungu).

Um carrapato da espécie *Amblyomma parvum* encontrado em cervídeo apresentou infecção por *Candidatus Rickettsia andeanae*, no município de Redenção, localidade esta que ainda não apresenta casos confirmados de FM.

*Rickettsia bellii* foi encontrada em duas espécies de carrapato (*Amblyomma nodosum* e *Amblyomma ovale*), em dois municípios com casos já confirmados de FM, Baturité e Guaramiranga, respectivamente.

Dentre todas as sequências, seis (46%) apresentaram identidade filogeneticamente próxima à *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest. Dessas sequências, cinco foram provenientes de ixodídeos da espécie *A. ovale* e uma de *Rhipicephalus sanguineus*, todos potenciais vetores encontrados parasitando cães (*C. familiaris*). Quatro sequências provenientes de Aratuba (município com casos confirmados de FM) e duas sequências de Mulungu (município ainda sem casos confirmado de FM).

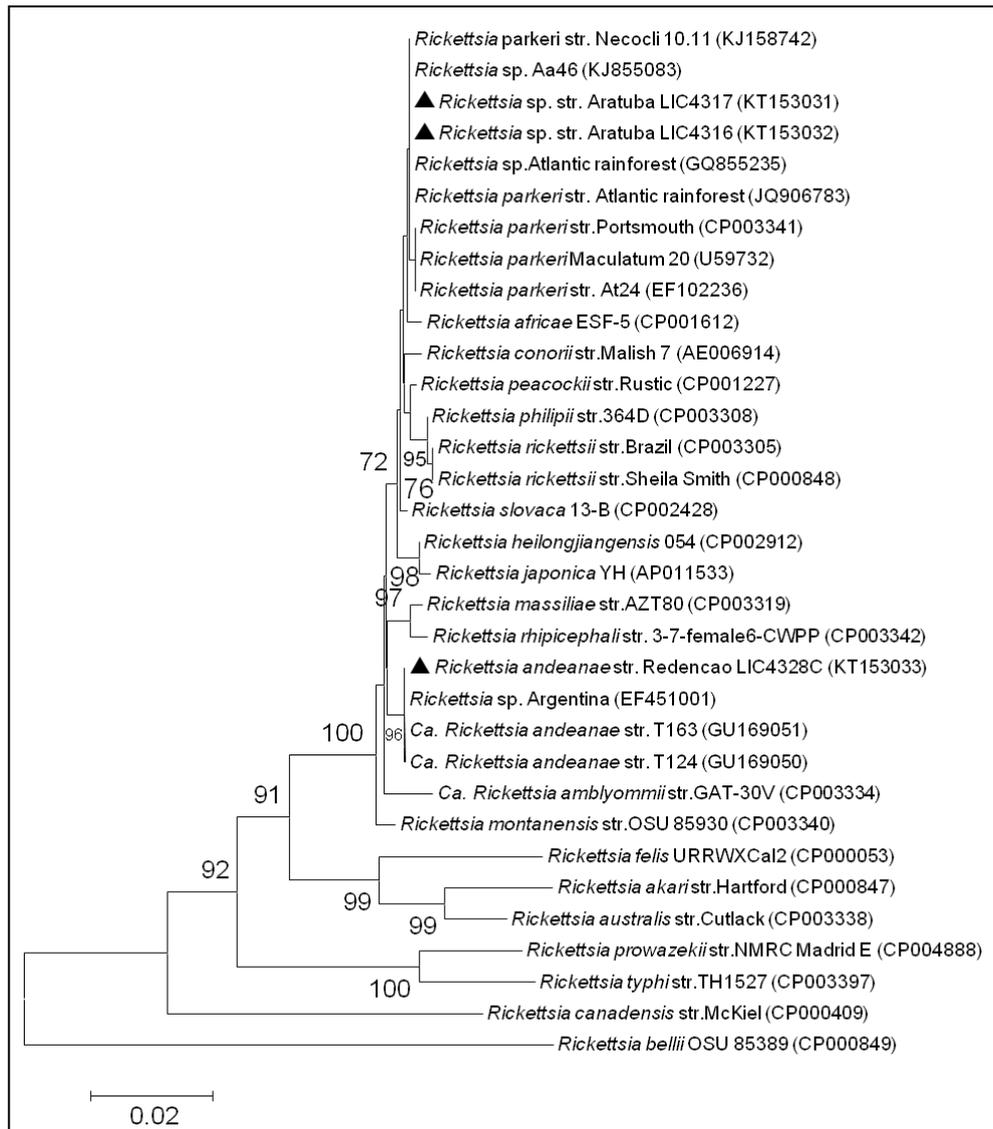
O fragmento de 608pb não apresentou resolução filogenética à ponto de ser capaz de distinguir espécies distintas do gênero *Rickettsia*, principalmente do GFM, como por exemplo, *R. peacockii*, *R. philipii* e *R. parkeri*, que agruparam-se no mesmo ramo. Apesar da politomia presente nesse ramo da árvore filogenética, todas as espécies agrupadas nesta região demonstraram diferença quando comparadas à *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest.



**Figura 5** – Árvore filogenética do fragmento "CS4" do gene riquetsial *gltA* através do método *Neighbor-joining* com distâncias evolutivas estabelecidas por Kimura dois-parâmetros a partir de potenciais vetores de riquetsias infectados provenientes da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

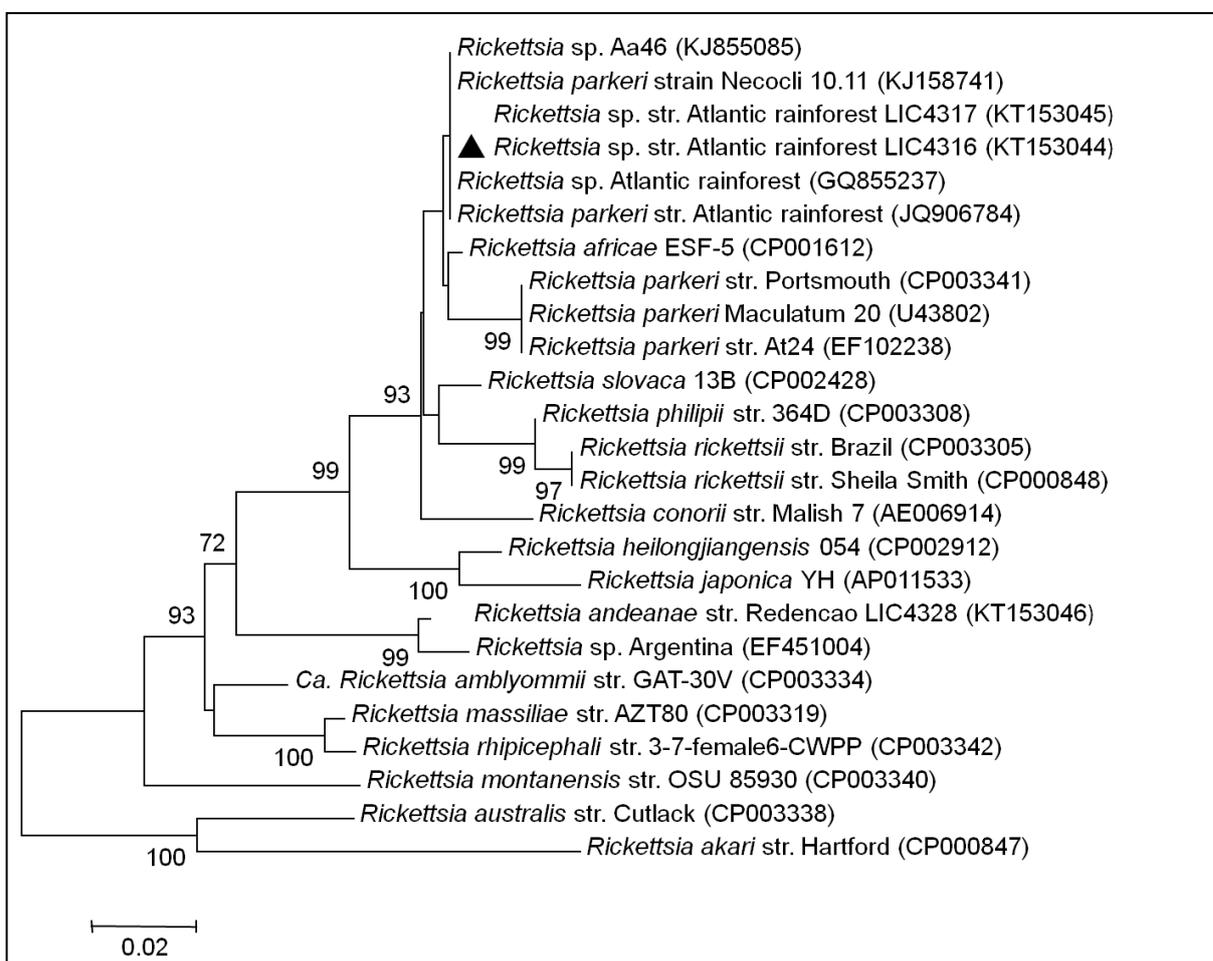
Com a finalidade de elevar a resolução filogenética, uma nova análise com três amostras foi realizada para o gene *gltA*. Duas amostras do fragmento CS4 do gene *gltA* identificadas como *Rickettsia* sp. str. Atlantic rainforest foram selecionadas e seus fragmentos CS2 e CS4 foram amplificados e clonados. A terceira amostra escolhida continha o DNA da espécie *Candidatus R. andeanae*. A sequência de

DNA do gene *gltA* obtida continha 1106pb após a união de ambas as porções através das suas regiões de interseção. A árvore filogenética obtida nessa análise apresenta uma melhor resolução àquela obtida anteriormente, e os fragmentos pertencentes às amostras LIC 4316 e LIC 4317 agruparam no mesmo ramo com as sequências de *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest e *R. parkeri*. As espécies *R. rickettsii*, *R. peacockii*, *R. philipii* e *R. africae* que apareciam no mesmo ramo na análise anterior, agora encontram-se em ramos diferentes (Fig. 6).



**Figura 6** – Árvore filogenética concatenada dos fragmentos "CS2" e "CS4" do gene riquetsial *gltA* através do método *Neighbor-joining* com distâncias evolutivas estabelecidas por Kimura dois-parâmetros a partir de potenciais vetores de riquetsias infectados provenientes na região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

A mesma estratégia de clonagem foi utilizada para amplificar os fragmentos de DNA do gene *ompA* dessas mesmas três amostras, assim a árvore filogenética obtida com fragmento de 533pb demonstrou que as amostras LIC 4316 e LIC 4317 agruparam no mesmo ramo com sequências de *Rickettsia* sp. str. Atlantic rainforest. Nessa análise filogenética, as amostras e as sequências de *R. parkeri* fazem parte do grupo irmão. Já para amostra LIC 4328, ambas as análises, de fragmentos da maior porção do gene *gltA*, como do gene *ompA* demonstraram que essa amostra está filogeneticamente relacionada com *Rickettsia* sp. Argentina, tendo em vista que esta espécie de riquetsia é semelhante a *Candidatus R. andeanae* (Parola et al 2013) (Fig. 7).



**Figura 7** – Árvore filogenética à partir de fragmento do gene riquetsial *ompA* através do método *Neighbor-joining* com distâncias evolutivas estabelecidas por Kimura dois-parâmetros a partir de potenciais vetores de riquetsias infectados provenientes da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

Todas as sequências geradas no presente estudo foram depositadas no GenBank. Os fragmentos das regiões CS4 sob os acessos: KT153035; KT153031; KT153032; KT153041; KT153037; KT153042; KT153033; KT153034; KT153038; KT153039; KT153040; KT153043 e KT153036. Os fragmentos gerados pela união das regiões de interseção dos fragmentos CS2 e CS4 sob acessos: KT153031; KT153032 e KT153033. E os fragmentos do gene *ompA* sob acessos: KT153045; KT153044 e KT153046.

#### 4.4 Frequência Mínima de Vetores Infectados

Calculada à partir de dos resultados da PCR para cada espécie encontrada em cada município da região do Maciço de Baturité (Tab. 5).

**Tabela 7** – Frequência mínima de vetores infectados por riquetsias (%) para cada espécie de potenciais vetores analisados por município da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

| Vetor / Município             | Aracoiaba | Aratuba | Baturité | Capistrano | Guaramiranga | Itapiuna | Mulungu | Pacoti | Redenção | TOTAL |
|-------------------------------|-----------|---------|----------|------------|--------------|----------|---------|--------|----------|-------|
| <i>A. aureolatum</i>          | -         | -       | -        | -          | -            | -        | -       | 0      | -        | 0     |
| <i>A. cajennense s. l.</i>    | -         | 0       | -        | 0          | -            | -        | -       | -      | -        | 0     |
| <i>A. longirostre</i>         | -         | 0       | -        | -          | -            | -        | -       | -      | -        | 0     |
| <i>A. nodosum</i>             | -         | -       | 66.7     | -          | -            | -        | -       | -      | -        | 66.7  |
| <i>A. ovale</i>               | -         | 9.38    | 0        | 0          | 18.18        | -        | 12.12   | 0      | 0        | 10.53 |
| <i>A. parvum</i>              | -         | -       | -        | -          | -            | -        | -       | -      | 22.22    | 22.22 |
| <i>Amblyomma sp.</i>          | -         | 0       | -        | -          | 0            | -        | -       | -      | -        | 0     |
| <i>A. tigrinum</i>            | -         | -       | -        | -          | -            | -        | -       | -      | 0        | 0     |
| <sup>1</sup> <i>A. nitens</i> | 0         | 0       | 0        | 0          | 0            | 0        | 7.41    | 0      | 0        | 1.04  |
| <i>B. microplus</i>           | 0         | 0       | 0        | 0          | 0            | -        | 0       | -      | 0        | 0     |
| <i>R. sanguineus</i>          | 0         | 1.41    | 0        | 0          | 0            | 18.18    | 3.9     | 0      | 0        | 2.38  |
| <i>C. felis</i>               | 0         | 9.1     | -        | -          | 0            | 0        | 50.0    | 0      | -        | 16.67 |
| <i>X. cheopis</i>             | -         | 0       | -        | -          | -            | -        | -       | -      | -        | 0     |
| <i>G. tiptoni</i>             | -         | 0       | -        | -          | -            | -        | -       | -      | -        | 0     |
| <i>H. spiniger</i>            | -         | 0       | -        | -          | -            | -        | -       | -      | -        | 0     |

A: *Amblyomma*; s.l.: Sensu lato; <sup>1</sup>A: *Anocentor*; B: *Boophilus*; R: *Rhipicephalus*; C: *Ctenocephalides*; X: *Xenopsylla*; G: *Gigantolaelaps*; H: *Heterodoxus*; "0": vetores encontrados em determinada região, porém negativos para fragmentos de DNA de *Rickettsia*; "-": vetores ausentes em determinada região.

## 4.5 Artrópodes Infectados por Riquétsias

Dos 887 espécimes que tiveram seu DNAg extraído, 13 amostras foram sequenciadas com êxito para fragmento dos genes *gltA* ou *ompA*, totalizando, quatro espécies de riquétsias (Tab. 6).

**Tabela 8** – Distribuição das amostras sequenciadas com as respectivas identidades dos gêneros *Rickettsia*, por biologia molecular para fragmentos dos genes *gltA* e *ompA*, na região do Maciço de Baturité Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.

| Municípios    | Hospedeiros             | Vetor                           | Identidade Bioagente                                      |
|---------------|-------------------------|---------------------------------|---|
| Aratuba*      | <i>Canis familiaris</i> | <i>Amblyomma ovale</i>          | <i>Rickettsia. sp.</i><br>strain Atlantic<br>rainforest   |
|               |                         | <i>Rhipicephalus sanguineus</i> | <i>Rickettsia. sp.</i><br>strain Atlantic<br>rainforest   |
|               |                         | <i>Ctenocephalides felis</i>    | <i>Rickettsia felis</i>                                   |
| Baturité*     | Myrmecophagidae         | <i>Amblyomma nodosum</i>        | <i>Rickettsia bellii</i>                                  |
| Guaramiranga* | <i>Canis familiaris</i> | <i>Amblyomma ovale</i>          | <i>Rickettsia bellii</i>                                  |
| Mulungu       | <i>Canis familiaris</i> | <i>Amblyomma ovale</i>          | <i>Rickettsia. sp.</i><br>strain Atlantic<br>rainforest   |
|               |                         | <i>Ctenocephalides felis</i>    | <i>Rickettsia felis</i>                                   |
| Redenção      | Cervidae                | <i>Amblyomma parvum</i>         | <i>Candidatus</i><br><i>Rickettsia</i><br><i>andeanae</i> |

\*Municípios com casos confirmado de FM.

## 5 DISCUSSÃO

Foram identificadas quatro espécies de riquetsias: *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, *Rickettsia felis* e *Candidatus Rickettsia andeanae*, todas pertencentes ao GFM e *Rickettsia belli* do grupo ancestral (Fig. 5).

No município de Aratuba foi assinalada a presença de *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest em três amostras de *Amblyomma ovale* (Tab. 6), local que apresenta casos confirmados de FM com sintomatologia semelhante àqueles achados clínicos previamente descritos na região sul do Brasil, bem como de um caso relatado para São Paulo e outro para a Bahia, onde essa riquetsia foi incriminada, incluindo um dos sinais frequentes mais relatados, a escara de inoculação no sítio de fixação do potencial vetor de riquetsias (Fig. 4B) (Silva et al 2011, Spolidorio et al 2010). Ainda em Aratuba, foi verificada uma amostra de *Rhipicephalus sanguineus*, positiva para *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest (Tab. 6), corroborando com prévios estudos em regiões endêmicas para FM no bioma Mata Atlântica, onde a infecção de *A. aureolatum* ou *R. sanguineus* por essa espécie de riquetsia ocorreu somente na presença de *A. ovale* na mesma população canina (Sabatini et al 2010, Medeiros et al 2011, Szabó et al 2013), indicando a estreita relação dessa espécie de riquetsia com *A. ovale* e o provável envolvimento de esse ectoparasito no ciclo epidêmico da FM em ambiente de Mata Atlântica em diferentes áreas do país.

Vale observar que *A. cajennense sensu lato* e *A. aureolatum*, espécies com elevada importância no ciclo epidêmico da FM em outras áreas endêmicas do Brasil (Barbieri et al 2014, Medeiros et al 2011, Moura-Martinião et al 2014, Sabatini et al 2010, Szabó et al 2013), foram encontrados em baixa frequência, três e um espécimes, respectivamente (Tab. 4), entre àqueles coletados na região estudada, bem como ausência de positividade para a infecção de RGFM nesses vetores, evidenciando assim a importância de *A. ovale* na participação do ciclo de riquetsias na região do Maciço de Baturité. Tal fato, provavelmente, se deve às condições eco-epidemiológicas da região com extensas áreas de mata preservada, uma economia baseada na produção agrícola de pequenas propriedades, corroborando, dessa forma, com Szabó et al (2009), que sugerem que a distribuição de *A. cajennense sensu lato* aumenta na mesma proporção em que há maior degradação do Bioma Mata Atlântica. Somando aos achados anteriores, a FMVI para ectoparasitos

relacionados somente ao cão como *A. ovale* e *R. sanguineus*, apresentaram respectivamente 11.65%, 3.17% chamando atenção para que *A. ovale* seja o vetor primário de *Rickettsia* sp strain Atlantic rainforest, apresentando um papel fundamental na manutenção do ciclo epidêmico, assim como o responsável pela transmissão horizontal dessa riquetsia para *R. sanguineus*, uma vez que a única amostra infectada deste potencial vetor de riquetsia estava parasitando cães, hospedeiro que, albergava um dos espécimes de *A. ovale* infectados por esta espécie de riquetsia em Aratuba.

Além disso, em Aratuba foi também encontrada *R. felis* infectando *C. felis* (Tab. 6) demonstrando a circulação de diferentes espécies de riquetsias nesse município. Identificada como a espécie de riquetsia infectando, em maior frequência, sifonápteros, principalmente, àquelas pertencentes as espécies do gênero *Ctenocephalides* em diversos países de globo terrestre como: Brasil, França, Tunísia e Coréia do Sul, por exemplo, *R. felis* é responsável por sintomas como febre, erupção cutânea, vômito e prostração, e em casos agravantes, trombocitopenia e coma (e.g. Choi et al. 2005, Raoult et al. 2001 Znazen et al. 2006). Recentemente, Horta et al. 2014 verificaram ampla distribuição dessa espécie do GFM no território nacional, confirmada pela presença em potenciais vetores nos principais biomas do país: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal.

Das 68 amostras de *Ctenocephalides felis* obtidas na região estudada, somente cinco foram capturadas no ambiente, as demais foram obtidas durante parasitismo em cães ou gatos, demonstrando a estreita relação deste potencial vetor com esses hospedeiros vertebrados (Parola et al 2005). O presente estudo detectou o total de quatro amostras infectadas por *Rickettsia felis*. Três amostras provenientes de cães do município de Mulungu e uma amostra de gato do município de Aratuba. Azad et al (1992) demonstraram elevada prevalência de *R. felis* em ovos depositados por fêmeas de *C. felis*, que associados a elevada FMVI (20.93%) na região estudada, indicam que o ciclo dessa RGFM pode ser mantido por conta da relação hospedeiro x potencial vetor, assim como a alta capacidade de transmissão vertical dessa riquetsia.

O município de Mulungu, ainda sem caso confirmado de FM, faz fronteira ao sul com Aratuba, ao norte com Guaramiranga e à leste com Baturité (Fig. 1 e 3), compartilhando das mesmas condições eco-epidemiológicas desses municípios, áreas endêmicas para FM. Duas amostras de *A. ovale*, coletadas em cães residentes em Mulungu, foram positivas para *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest,

evidenciando a circulação silenciosa de riquetsia patogênica na área amostrada. Igualmente, *Rickettsia felis* foi também detectada em Mulungu, corroborando a circulação de bioagentes de FM nesse município (Tab. 6), permitindo assinalá-lo como foco silencioso, ou antes, sem caso detectado.

Embora *Candidatus Rickettsia andeanae* pertença ao GFM, sua patogenicidade à humanos é desconhecida. Essa riquetsia já foi assinalada em *A. parvum* no Brasil nos biomas Cerrado e Pantanal, Paraguai e Argentina (Nieri-Bastos et al 2014, Ogrzewalska et al 2014, Pacheco et al 2007). Ainda que *A. parvum* seja um potencial vetor com predileção a humanos na América do Sul (Guglielmone et al 2006), no presente estudo, este potencial vetor foi diagnosticado infectado por *Ca. R. andeanae* na fase adulta, parasitando um cervídeo, além de outros espécimes de fase adulta terem sido encontrados parasitando tatu no município de Redenção, corroborando assim com os achados de Guglielmone e Nava (2006), que verificaram a preferência das formas adultas de *A. parvum* em parasitar mamíferos de médio a grande porte, ao passo que larvas e ninfas são mais frequentes em pequenos mamíferos, preferencialmente, roedores. Potenciais vetores de riquetsias da espécie *A. parvum* infectados por RGFM com FMVI de 22.22%, parasitando somente animais silvestres, associados ao comportamento deste potencial vetor na região e em estudos prévios (Guglielmone e Nava 2006), somados a ausência de casos confirmados de FM no município de Redenção, evidenciam o ciclo silvestre dessa espécie em ambiente de mata Atlântica.

Isolada pela primeira vez em carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis* nos E.U.A. em 1966, *Rickettsia bellii* já foi encontrada infectando diferentes espécies do gênero *Amblyomma* (Parola et al 2013, Tomassone et al 2010). O presente estudo demonstra a infecção dessa espécie de riquetsia, em área de foco de FM, em *Amblyomma nodosum* e *Amblyomma ovale*, já assinalados no Brasil (Lopes et al 2014, Szabó et al 2013). Conforme ausência de casos envolvendo humanos, *R. bellii* vem sendo caracterizada como agente não patogênico à humanos, ainda que haja registros de leve reação inflamatória intradérmica no local da inoculação, com o aparecimento posterior de escaras necróticas em coelhos e cobaios (Ogata et al 2006), bem como evidências sorológicas de infecção em capivaras (Labruna et al 2011).

Apesar de amostras de potenciais vetores coletadas em animais de importância zootécnica (equinos, asininos e bovinos), representarem 41.69% (720/1727) da amostra estudada, nenhum desses ectoparasitos analisados foram positivos para

infecção de riquetsias. Por outro lado, potenciais vetores coletados em animais domésticos (cães e gatos), representaram valores próximos àqueles para animais de importância zootécnica, com 47.31% (817/1727) das amostras coletadas, e resultaram quase na totalidade de amostras positivas para a presença de RGFM, à exceção de *Amblyomma parvum*, coletado em Cervídeo (Tab. 6).

A região do Maciço de Baturité, interior do Estado do Ceará, é predominantemente, composta de formações florestais equivalente ao bioma Mata Atlântica, onde o setor que compreende a borda de mata desta região, é incriminado como a principal área onde os casos de parasitismo por potenciais vetores é mais frequente. Este local é caracterizado pelo fácil acesso de humanos, seja para fins laborais (pecuária ou agricultura) quanto para o lazer, e de seus respectivos animais domésticos, principalmente os cães, que são manejados livremente na região e que apresentaram maior frequência de parasitismo entre todos os hospedeiros vertebrados do presente estudo (Tab. 4). Essa situação favorece a infestação de humanos por *A. ovale*, corroborando com Serra-Freire et al 2011 que constataram estágios adultos deste potencial vetor de riquetsias em região de Mata Atlântica, como também, favorecem o parasitismo de cães corroborando com Szabó et al 2013, que assinalaram a forma adulta desse artrópode com preferência a carnívoros de médio porte, ao passo que as formas imaturas apresentaram predileção à roedores.

Nossos resultados apontam para a necessidade de implantação de programa de controle de carrapatos em cães na região, bem como da implantação de um programa de monitoramento de infestação humana por carrapatos. Esse programa pode ser baseado na experiência do Município de Santo André, Estado de São Paulo, onde pessoas parasitadas por carrapatos vão à unidade de saúde do município para retirada e identificação do(s) vetor(es). Caso seja confirmada a infestação por *Amblyomma ovale*, o paciente deverá entrar em um período de observação para Febre Maculosa e uma ação de vigilância é iniciada no provável local de infestação, buscando o encontro de mais vetores.

Em função do agregado de casos confirmados na região do maciço de Baturité e o encontro de riquetsias patogênicas na região, é pertinente a orientação da população para os riscos de infecção, sinais e sintomas da doença, bem como para a rápida procura de unidades de saúde em caso de infestação por carrapato ou manifestação clínica compatível com febre maculosa.

## 6 CONCLUSÕES

### **Sobre a circulação de riquetsias em potenciais vetores na região do Maciço de Baturité pode ser afirmado:**

*Amblyomma ovale* atua como vetor primário de *Rickettsia* sp strain Atlantic rainforest, além de possuir papel fundamental na manutenção do ciclo epidêmico na região.

Esse é o primeiro relato de *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest para o Estado do Ceará.

*Ctenocephalides felis* é potencial vetor capaz de manter o ciclo de *Rickettsia felis* na região estudada.

*Candidatus Rickettsia andeanae* é assinalada pela primeira vez em ambiente de Mata Atlântica no Brasil.

*Rickettsia bellii* é registrada pela primeira vez em área endêmica de FM no Estado do Ceará.

Cães atuam como o principal hospedeiro vertebrado no ciclo epidêmico de *Rickettsia* sp strain Atlantic rainforest e no ciclo enzoótico de *Rickettsia felis* na região do Maciço de Baturité.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl. Acids. Res.* 1997; 25(22):4692-3.

Amorim M, Serra-Freire NM. Chave dicotômica para identificação de larvas de algumas espécies do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Entomologia y Vectores* 1999; 6(1):75-90.

Aragão HB, Fonseca F. Notas de ixodologia. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1961; 59:119-29.

Azad AF, Sacci Jr JB, Nelson WM, Dasch GA, Schmidtman ET, Carl M. Genetic characterization and transovarial transmission of a typhus-like rickettsia found in cat fleas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 1;89(1):43-6.

Barbieri ARM, Moraes Filho J, Nieri-Bastos FA, Souza Jr JC, Szabó MPJ, Labruna MB. Epidemiology of *Rickettsia* sp. Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2014 Oct;5:848-53.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox; 2006.

Bermúdez SE, Eremeeva ME, Karpathy SE, Samudio F, Zambrano ML, Zaldivagar Y et al. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in eastern Panama. *J Med Entom* 2009;46(4):856-61.

Blair PJ, Jiang J, Schoeler GB, Moron C, Anaya E, Cespedes M et al. Characterization of spotted fever group *Rickettsiae* in flea and tick specimens from Northern Peru. *J Clin Microbiol* 2004;42(11):4961-7.

Bonvicino CR, Oliveira JÁ, D'Andrea PS. Guia de roedores do Brasil. Com Chave para gêneros baseadas em caracteres externos. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa; 2008.

Breitschwerdt EB, Hegarty BC, Maggi RG, Lantos PM, Aslett DM, Bradley JM. *Rickettsia rickettsii* transmission by a lone star tick, North Carolina. Emerg Infect Dis 2011;17(5):873–5.

Burket CT, Vann CN, Pinger RR, Chatot CL, Steiner FE. Minimum infection rate of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in southern Indiana. J. Med. Entomol. 1998;35(5):653-9.

Carvalho RW. Aspectos ecológicos das faunas de pequenos roedores sinantrópicos e de seus sifonápteros (Relação parasito hospedeiro) do foco de Peste Bubônica da Serra dos Órgãos, município de Nova Friburgo, Sumidouro e Teresópolis. Rio de Janeiro. Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, 1999.

Choi YJ, Jang WJ, Kim JH, Ryu JS, Lee SH, Park KH et al. Spotted fever group and Typhus group Rickettsioses in humans, South Korea. Emerg Infect Dis 2005;11(2):237–44.

Dias E, Martins AV. Spotted fever in Brazil. Am J Trop Med Hyg 1938; 19(2):103-8.

Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC et al. 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 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int J Syst Evol Microbiol. 2001;51(6):2145-65.

Emmons LH, Feer F. Neotropical Rainforest Mammals – a field guide. 2<sup>nd</sup> Edition. Chicago, University of Chicago Press, 1997.

Gehrke FS, Gazeta GS, Souza ER, Ribeiro A, Marrelli MT, Schumaker TTS. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the state of Rio de Janeiro/Brazil. Clin Microbiol Infect 2009;15(2):267-8.

Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM et al. *Rickettsi* phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. Plos One 2008;3(4):1-34.

Guedes E, Leite RC, Prata MCA, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. Mem Inst Oswaldo Cruz 2005;100(8):841-5.

Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Exp Appl Acarol. 2006;40(2):83-100.

Guglielmone AA, Nava S. Las garrapatas argentinas del género *Amblyomma* (Acari: Ixodidae): distribución y hospedadores. Sit Arg Prod An. 2006; 35(3):133-53.

Hidalgo M, Orejuela L, Fuya P, Carrillo P, Hernandez J, Parra E et al. Emerg Infect Dis 2007;13(7):1058–60.

Horta MC, Ogrzewalska M, Azevedo MC, Costa FB, Ferreira F, Labruna MB. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* from five geographic regions of Brazil. Am J Trop Med Hyg 2014;91(1):96-100.

Hun L, Cortés X, Taylor L. Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* isolated from human clinical samples and from the rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* collected at different geographic zones in Costa Rica. Am J Trop Med Hyg 2008;79(6):899-902.

Krantz GW, Walter DE. A manual of acarology. 3<sup>rd</sup> Edition. Lubbock: Texas Tech University Press, 2009.

Labruna MB, Camargo LMA, Camargo EP, Walker DH. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis justakochi* in Rondônia, Brazil. *Vet Parasitol* 2005;127(2):169-74.

Labruna MB, Horta MC, Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM et al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, Western Amazon, Brazil. *VBZ* 2007;7(2):249-55.

Labruna MB, Mattar SV, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev MVZ Cord* 2011;16(2):2435-57.

Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann N Y Acad Sci*. 2009;1166:156-66.

Lemos ERS, Alvarenga FBF, Cintra ML, Ramos MC, Paddock CD, Ferebee TL et al. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiologic study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. *Am J Trop Med Hyg* 2001;65(4):329-34.

Linardi PM, Guimarães LR. Sifonápteros do Brasil. São Paulo, Ed. Museu de Zoologia USP/FAPESP, 2000.

Lopes LB, Guterres A, Rozental T, Oliveira RC, Mares-Guia MA, Fernandes J, et al. *Rickettsia belli*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavírus in an indian reserve in the Brazilian Amazon. *Paras Vect* 2014;7(191)1-7.

Martins TF, Onofrio VC, Barros-Battesti D, Labruna MB. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions and identification key. *Ticks Tick Borne Dis*. 2010;1(2):75-99.

Medeiros AP, Souza AP, Moura AB, Lavina MS, Bellato V, Sartor AA, Nieri-Bastos FA et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011;106(8):926-30.

Monteiro JL, Fonseca F. Typho exanthemático de São Paulo. XI novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). Mem Inst Butantan 1932;7:33-40.

Moura-Martinião NO, Machado-Ferreira E, Cardoso KM, Gehrke FS, Amorim M, Fogaça AC et al; Rickettsia and vector biodiversity of spotted fever focus, Atlantic rain forest biome, Brazil. Emerg Infect Dis 2014;20(3):498–500.

Nieri-Bastos FA, Lopes MG, Cançado PHD, Rossa GAR, Faccini JLH, Gennari SM et al. *Candidatus* Rickettsia andeanae, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. Mem Inst Oswaldo Cruz 2014;109(2):259–61.

Ogata H, La Scola B, Audic S, Renesto P, Blanc G, Robert C et al. Genome sequence of *Rickettsia belli* illuminates the role of Amoeba in gene exchanges between intracellular pathogens. PLoS Genet 2006;2(5):733-44.

Ogrzewalska M, Literak I, Martins TF, Labruna MB. Rickettsial infections in ticks from wild birds in Paraguay. Ticks Tick Borne Dis 2014; 5(2):83-9.

Oliveira KA, Pinter A, Medina-Sanchez A, Boppana VD, Wikel SK, Saito TB et al. *Amblyomma imitator* as vector of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. Emerg Infect Dis 2010;16(8):1282–4.

Pacheco RC, Moraes-Filho J, Marcili A, Richtzenhain LJ, Szabó MPJ, Catroxo MHB et al. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. Appl Environ Microbiol 2011;77(15): 5207–11.

Pacheco RC, Moraes-Filho J, Nava S, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari:Ixodidae) from Argentina. Exp Appl Acarol 2007;43(1):63-71.

Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, Zaki SR, Goldsmith CS, Goddard J et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. Clin Infect Dis 2004;15(6):805-11.

Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet Res* 2005;36(3):469-92.

Parola P, Labruna MB, Raoult D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered question and emerging diseases. *Curr Infect Dis Rep.* 2009;11(1):40-50.

Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clin Microbiol Rev.* 2005; 18(4):719–56.

Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY et al. Up date on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin Microbiol Rev* 2013;(4):657-702.

Parola P, Raoult D. Ticks and tick borne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin Infect Dis.* 2001;15(6):897-928.

Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci* 2006;1078:523-30.

Price RD, Hellenthal RA, Palma RL, Johnson KP, Clayton DH. The chewing lice world checklist and biological overview. Illinois Natural History Survey, special publication 24, 2003.

Raoult D, La Scola B, Enea M, Fournier PE, Roux V, Fenollar F et al. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis* 2001;7(1):73-81.

Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J Bacteriol* 1991;173:1576-89.

Romer Y, Seijo AC, Crudo F, Nicholson WL, Varela-Stokes A, Lash RR et al. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. *Emerg Infect Dis* 2011;17(7): 1169–73.

Rudakov NV, Shpynov SN, Samoilenko IE, Tankibaev MA. Ecology and epidemiology of spotted fever group *Rickettsiae* and new data from their study in Russia and Kazakhstan. *Ann NY Acad Sci* 2003;990:12-24.

Sabatini GS, Pinter A, Nieri-Bastos FA, Marcili A, Labruna MB. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their *Rickettsia* in an Atlantic rain forest reserve in the state of São Paulo, Brazil. *J Med Entomol* 2010;47(5):913-16.

Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> Edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 2001.

Serra-Freire NM, Sena LMM, Borsoi ABP. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. *EntomoBrasilis* 2011;4(2):67-72.

Silva N, Eremeeva ME, Rozental T, Ribeiro GS, Paddock CD, Ramos EA et al. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2011;17(2): 275–8.

Silveira I, Pacheco RC, Szabó MPJ, Ramos HGC, Labruna MB. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg Infect Dis* 2007;13(7):1111–13.

SINAN/SVS/MS. Sistema Integrado Nacional de Agravos de Notificação, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde. [Acessado em 01 de Agosto de 2015]. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>.

Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandão PE, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2010; 16(3):521–3.

Szabó MPJ, Labruna MB, Garcia MV, Pinter A, Castagnolli KC, Pacheco RC, et al. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 2009;103(1):57-72.

Szabó MPJ, Nieri-Bastos FA, Spolidorio MG, Martins TF, Barbieri AM, Labruna MB. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agente of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. *Parasitol* 2013;140(6):719-28.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 2011;28(10):2731-9.

Tomassone L, Nuñez P, Ceballos LA, Gürtler RE, Kitron U, Farber M. Detection of “*Candidatus Rickettsia* sp. strain Argentina” and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma ticks* (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. *Exp Appl Acarol* 2010;52(1):93-100.

Workshop Mata Atlântica do Nordeste. Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal 1993. [Acessado em 01 de Agosto de 2015]. Disponível em: <http://www.semace.ce.gov.br/2010/12/apa-da-serra-de-baturite/>.

Znazen A, Rolain JM, Hammami N, Hammami A, Jemaa MB, Raoult D. *Rickettsia felis* infection, Tunisia. *Emerg Infect Dis* 2006;12(1):138-40.

## 8 ANEXOS

### ANEXO A

**Sequências depositadas no GenBank de fragmentos das porções “CS4” do gene riquetsial *gltA* obtidos a partir de potenciais vetores de riquetsias infectados provenientes da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.**

Rickettsia\_felis\_LIS428

[Organism=Rickettsia felis] [Clone=LIS428]

[isolation-source=Ctenocephaliides felis on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Ctenocephaliides felis]

[country=Brazil - Ceara state - Mulungu municipality]

GAATTTTAAAGAAGCAGACTACGAACTTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCAACTATCG  
CCGCAATGTCCTATAAATATTCTATAGGACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTAC  
TGAAAATTTTCTGCATATGATGTTTGCAACGCCTTGACAAAATATAAAGTAAATCCAATAATAAAA  
AATGCTCTTAATAAAATATTTATTCTGCATGCTGACCATGAGCAGAACGCTTCTACTTCAACAGT  
CCGAATTGCCGGCTCATCCGGGGCTAACCCTTTTGCTTGCGTAAGTACAGGGATTGCCTCACT  
TTGGGGGCCTGCCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAG  
TTCTGAGAATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAATGATCCGTTTAGGTTAATGGG  
TTTCGGTCATCGTGTTTATAAAAATGACCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGCAAA  
GAAGTATTAAGGAACTCGGACAGCTAGAAAACAATCCGCTTTTGCAAATAGCAATAGAAGCTTG  
AAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATTC  
AGGT

Rickettsia\_sp.\_str.\_Atlantic\_rainforest\_LIC4323

[Organism=Rickettsia sp.] [Strain=Atlantic rainforest] [Clone=LIC4323]

[isolation-source=Amblyomma ovale on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma ovale]

[country=Brazil - Ceara state - Aratuba municipality]

CATTTTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCAGATTACGAACTTACCGCTATTAGAATGATTG  
CTAAGATACCTACCATCGCTGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGACAACCGTTTATTTATCCTGA  
TAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGATGTTTGCAACGCCTTGACGAAATATAC  
AGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACATGCCGATCATGAGCAGAAT  
GCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGAGCTAACCCTTTTGCTTGTATTAGCA  
CGGGTATTGCCTCACTTTGGGGACCTGCTCACGGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGC  
TTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAATGATC  
CATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAATGACCCGCGTGCCGCAGTACTT  
AAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAGGAACTCGGGCAGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAA  
ATAGCAATAGAAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAATTATATCCA  
AATGTTGATTTTATTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAATGTTACCGGTA  
CTTTTGAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGAT

## Continuação Anexo A

Rickettsia\_belli\_LIC4315

[Organism=Rickettsia belli] [Strain= Guaramiranga] [Clone=LIC4315]

[isolation-source=Amblyomma ovale on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma ovale]

[country=Brazil - Ceara state - Guaramiranga municipality]

```
TATTAGAATGATAGCTAAAATACCAACTATTGCTGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGTCAGCCT
TTTGTATATCCCGATAATCTTTAGATTTTACTGAAAATTTCTTGCATATGATGTTTGCCACACCTT
GTGAAAAATATAAAGTAAATCCAGTAATAAAAAATGCCTTAAACAAGATATTTATTTTACATGCTGA
TCATGAGCAAATGCTTCTACTTCAACAGTCAGAATTGCCGGCTCTTCAGGAGCTAACCCTTTT
GCTTGCGTCAGTACTGGTATTGCATCGCTTTGGGGTCCCTGCTCATGGCGGGGCTAATGAAGCA
GTGATAAATATGCTGAAAGAAATAGGCAGTGTAGAGAATATACCTAAATATATAGCGAAAGCTAAA
GATAAAATGATAATTTTAGGCTAATGGGCTTTGGTCATCGTGTATATAAAAACTATGATCCGCGT
GCGGCAGTGCTTAAAGAGACCTGCAAGGAGGTGTTAAAAGAATTAGGGCAGCTAGATAACAAC
CCATTACTACAAATAGCGATAGAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAGTATTTTATTGAGAG
AAAATTATATCCAAACGTTGATTTTTATTTCGGGTATTATTTATAAAGCGATGGGTATACCCCGCA
GATGTTACAGTGCTTTTTGCCACAGC
```

Rickettsia\_sp.\_str.\_Atlantic\_rainforest\_LIC4276

[Organism=Rickettsia sp.] [Strain=Atlantic rainforest] [Clone=LIC4276]

[isolation-source=Amblyomma ovale on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma ovale]

[country=Brazil - Ceara state - Mulungu municipality]

```
GCGGCTGTCGTTCTCTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCAGATTACGA
ACTTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCTGCAATGTCTTATAAATATTCTATA
GGACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGATGTTT
GCAACGCCTTGTACGAAATATACAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCC
TACATGCCGATCATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGAG
CTAACCTTTTGTATTAGCACGGGTATTGCCTCACTTTGGGGACCTGCTCACGGCGGGG
CTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCTAAATATATAGC
TAAAGCTAAGGATAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAACTAT
GACCCGCGTGCCGCAGTACTTAAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAGGAAGTATCGGGCAGCTA
GACAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAAGTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTT
ATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATAC
CGTCGCAAATGTTACGGTACTTTTTGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATGGCACAATG
```

## Continuação Anexo A

Rickettsia\_felis\_LIS429

[Organism=Rickettsia felis] [Clone=LIS429]

[isolation-source=Ctenocephaliides felis on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Ctenocephaliides felis]

[country=Brazil - Ceara state - Mulungu municipality]

```
CCGTTGGTTCTCTTTTCGGCATTTCCTGATTACTGAATTTAAAGAAGCAGACTACGAACTT
ACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCAACTATCGCCGCAATGTCCTATAAATATTCTATAGGA
CAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACTGAAAATTTTCTGCATATGATGTTTGCAA
CGCCTTGTAACAAAATATAAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAAAATTTTATTCTGCAT
GCTGACCATGAGCAGAACGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGGGGCTAAC
CCTTTTGCTTGCGTAAGTACAGGGATTGCCTCACTTTGGGGGCCTGCCACGGCGGGGCTAA
TGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGAATATTCCTAAATATATAGCTAA
AGCTAAGGATAAAAATGATCCGTTTAGGTTAATGGGTTTCGGTCATCGTGTTTATAAAAATATG
ACCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGCAAAGAAGTATTAAGGAACTCGGACAGCTAG
AAAACAATCCGCTTTTGCAAATAGCAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATTTTTA
TTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTTATTTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACC
GTCGCAAATGTTTACGGTACTTTT
```

Rickettsia\_felis\_LIS436

[Organism=Rickettsia felis] [Clone=LIS436]

[isolation-source=Ctenocephaliides felis on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Ctenocephaliides felis]

[country=Brazil - Ceara state - Mulungu municipality]

```
GCTTGCGGCCGTTGGTTCTCTTTTCGGCATTTCCTGATTACTGAATTTAAAGAAGCAGACT
ACGAACTTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCAACTATCGCCGCAATGTCCTATAAATATT
CTATAGGACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACTGAAAATTTTCTGCATATGAT
GTTTGCAACGCCTTGTAACAAAATATAAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAAAATTTT
ATTCTGCATGCTGACCATGAGCAGAACGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCC
GGGGCTAACCCTTTTGCTTGCGTAAGTACAGGGATTGCCTCACTTTGGGGGCCTGCCACGG
CGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGAATATTCCTAAAT
ATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAATGATCCGTTTAGGTTAATGGGTTTCGGTCATCGTGTTTATA
AAAATATGACCCACGTGCCGCAGTACTTAAAGAACTTGCAAAGAAGTATTAAGGAACTCGG
ACAGCTAGAAAACAATCCGCTTTTGCAAATAGCAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATG
AATATTTTATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTTATTTCAGGTATTATCTATAAAGCTATG
GGTATACCGTCGCAAATGTTTACGGTACTTTT
```

## Continuação Anexo A

Rickettsia\_felis

[Organism=Rickettsia felis] [Clone=LIS437]

[isolation-source=Ctenocephaliides felis on Felis catus]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Ctenocephaliides felis]

[country=Brazil - Ceara state - Aratuba municipality]

```
GGCATTTCCTGATTTACTGAATTTTAAAGAAGCAGACTACGAACTTACCGCTATTAGAATGAT
TGCTAAGATACCAACTATCGCCGCAATGTCTATAAATATTCTATAGGACAACCGTTTATTTATCC
TGATAATTCGTTAGATTTTACTGAAAATTTCTGCATATGATGTTTGCAACGCCTTGACAAAATAT
AAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAATATTTATTCTGCATGCTGACCATGAGCAG
AACGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGGGCTAACCCTTTTGCTTGCGTA
AGTACAGGGATTGCCTCACTTTGGGGGCTGCCACGCGGGGCTAATGAAGCGGTAATAAAT
ATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGAATATTCCTAAATATATAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAT
GATCCGTTTAGGTTAATGGGTTTCGGTTCATCGTGTATATAAAACTATGACCCACGTGCCGCAG
TACTTAAAGAACTTGCAAAGAAGTATTAAGGAAGCTCGGACAGCTAGAAAACAATCCGCTTTT
GCAAATAGCAATAGAAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATTGAGAGAAAATTATA
TCAAATGTTGATTTTTATTTCAGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGTCGCAAATGTTTAC
GGTACTTTTTGCAATAGCAAGAACC
```

Rickettsia\_sp.\_str.\_Atlantic\_rainforest\_LIC4299

[Organism=Rickettsia sp.] [Strain=Atlantic rainforest] [Clone=LIC4299]

[isolation-source=Amblyomma ovale on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma ovale]

[country=Brazil - Ceara state - Aratuba municipality]

```
GCTTGCGGCTGTCGGTCTCTTTTCGGCATTTCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCAGATT
ACGAACTTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCTGCAATGTCTTATAAATATT
CTATAGGACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGAT
GTTTGCAACGCCTTGACGAAATATACAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTT
ATCCTACATGCCGATCATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCG
GAGCTAACCCCTTTTGCTTGATTAGCACGGGTATTGCCTCACTTTGGGGACCTGCTCACGGCG
GGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCCTAAATATA
TAGCTAAAGCTAAGGATAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTTCATCGTGTATATAAAA
ACTATGACCCGCGTGCCGCAGTACTTAAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAGGAAGCTCGGGC
AGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAATAGCAATAGAAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAA
TATTTTATTGAGAGAAAATTATATCCAATGTTGATTTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGG
GTATACCGTCGCAAATGTTTCACGGTACTTTTTGCAATAGCAAGAACCCTA
```

## Continuação Anexo A

Rickettsia\_sp.\_str.\_Atlantic\_rainforest\_LIC4275

[Organism=Rickettsia sp.] [Strain=Atlantic rainforest] [Clone=LIC4275]

[isolation-source=Amblyomma ovale on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma ovale]

[country=Brazil - Ceara state - Mulungu municipality]

```
GCGGCTGTCGGTTCTCTTTTCGGCATTTCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCAGATTACGA
ACTTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCTGCAATGTCTTATAAATATTCTATA
GGACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGATGTTT
GCAACGCCTTGACGAAATATACAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCC
TACATGCCGATCATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGAG
CTAACCCCTTTGCTTGTATTAGCACGGGTATTGCCTCACTTTGGGGACCTGCTCACGGCGGGG
CTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCTAAATATATAGC
TAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAACTAT
GACCCGCGTGCCGCAGTACTTAAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAGGAACTCGGGCAGCTA
GACAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTT
ATTGAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATAC
CGTCGCAAATGTTACGGTACTTTTTGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATGG
```

Rickettsia\_andeanae

[Organism=Rickettsia andeanae] [Strain=Redencao] [Clone=LIC4328]

[isolation-source=Amblyomma parvum on Cervidae]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma parvum]

[country=Brazil - Ceara state - Redencao municipality]

```
GCTTGCGGCTGTCGGTTCTCTTTTCGGCATTTCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCAGATT
ACGAACTTACCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCCGCAATGTCTTATAAATATT
CTATAGGACAACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGAT
GTTTGCAACGCCTTGACGAAATATAAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTT
ATCCTACATGCCGATCATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGTCGGCTCATCCG
GAGCTAACCCCTTTGCTTGTATTAGCACGGGTATTGCCTCACTTTGGGGACCTGCTCACGGCG
GGGCTAATGAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCTAAATATA
TAGCTAAAGCTAAGGATAAAAAATGATCCATTTAGGTTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAA
ACTATGACCCGCGTGCCGCAGTACTTAAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAGGAACTCGGGC
AGCTAGACAACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAACTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAA
TATTTTATTAAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGG
TATACCGTCGCAAATGTTACGGTACTTTTTGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATGG
```

## Continuação Anexo A

Rickettsia\_belli\_LIC4327

[Organism=Rickettsia belli] [Strain=Baturite] [Clone=LIC4327]

[isolation-source=Amblyomma nodosum on Tamandua tetradactyla] [mol\_type=genomic DNA]

[host=Amblyomma nodosum]

[country=Brazil - Ceara state - Baturite municipality]

```
CTATTAGAATGATAGCTAAAATACCAACTATTGCTGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGTCAGCC
TTTTGTTTATCCCGATAATTCTTTAGATTTTACTGAAAATTTCTTGCATATGATGTTTGCCACACCT
TGTGAAAAATATAAAGTAAATCCAGTAATAAAAAATGCCTTAAACAAGATATTTATTTTACATGCTG
ATCATGAGCAAATGCTTCTACTTCAACAGTCAGAATTGCCGGCTCTTCAGGAGCTAACCCTTT
TGCTTGCGTCAGTACTGGTATTGCATCGCTTTGGGGTCCTGCTCATGGCGGGGCTAATGAAGC
AGTGATAAATATGCTGAAAGAAATAGGCAGTGTAGAGAATATACCTAAATATATAGCGAAAGCTAA
AGATAAAAATGATAATTTTAGGCTAATGGGCTTTGGTCATCGTGTATATAAAAATGATCCGCG
TGCGGCAGTGCTTAAAGAGACCTGCAAGGAGGTATTAAGAATTAGGGCAGCTAGATAACAA
CCCATTACTACAAATAGCGATAGAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAGTATTTTATTGAGA
GAAAATTATATCCAAACGTTT
```

## ANEXO B

**Sequências depositadas no GenBank de fragmentos concatenados das porções “CS4” e “CS2” do gene riquetsial *gltA* obtidos a partir de potenciais vetores de riquetsias infectados provenientes da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.**

Rickettsia\_sp.\_str.\_Atlantic\_rainforest\_LIC4317

[Organism=Rickettsia sp.] [Strain=Atlantic rainforest] [Clone=LIC4317]

[isolation-source=Amblyomma ovale on Canis familiaris]

[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma ovale]

[country=Brazil - Ceara state - Aratuba municipality]

```
CGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTTACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACT
GCTTCTTGTCAGTCTACTATCACCTATATAGATGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATA
TGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGTGATTTTTTGAAGTGGCATATTTACTGATTTATGGGGA
ACTACCAAGTGGCGAGCAGTATAATAATTTCACTAACAGGTTGCTCATCATTATTAGTGAATG
AAAGATTACACTATTTATTTCAAACCTTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGG
CTGTGCGTTCTCTTTGCGGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCAGATTACGAACTTA
CCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCTGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGAC
AACCGTTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGATGTTTGCAAC
GCCTTGACGAAATATACAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACAT
GCCGATCATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGAGCTAAC
CCTTTTGCTTGATTAGCACGGGTATTGCCTCACTTTGGGGACCTGCTCACGGCGGGGCTAAT
GAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAA
GCTAAGGATAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAACTATGAC
CCGCGTGCCGCAGTACTTAAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAGGAAGTATCGGGCAGCTAGAC
ACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAAGTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATT
GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTTATTGCGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGT
CGCAAATGTTACGGTACTTTTTGCAATAGCAAGAACCCTAGGCTGGATGGCACAATGGA
```

Rickettsia\_belli\_LIC4327

[Organism=Rickettsia belli] [Strain=Baturite] [Clone=LIC4327]

[isolation-source=Amblyomma nodosum on Tamandua tetradactyla] [mol\_type=genomic DNA]

[host=Amblyomma nodosum]

[country=Brazil - Ceara state - Baturite municipality]

```
CTATTAGAATGATAGCTAAAATACCAACTATTGCTGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGTCAGCC
TTTTGTTTATCCCGATAATTCTTTAGATTTTACTGAAAATTTCTTGCATATGATGTTTGCCACACCT
TGTGAAAAATATAAAGTAAATCCAGTAATAAAAAATGCCTTAAACAAGATATTTATTTTACATGCTG
ATCATGAGCAAAATGCTTCTACTTCAACAGTCAGAATTGCCGGCTCTTCAGGAGCTAACCCCTTT
TGCTTGCGTCAGTACTGGTATTGCATCGCTTTGGGGTCTGCTCATGGCGGGGCTAATGAAGC
AGTGATAAATATGCTGAAAGAAATAGGCAGTGTAGAGAATATACCTAAATATATAGCGAAAGCTAA
AGATAAAAATGATAATTTTAGGCTAATGGGCTTTGGTCATCGTGTATATAAAAACTATGATCCGCG
TGCGGCAGTGCTTAAAGAGACCTGCAAGGAGGTATTAAGAATTAGGGCAGCTAGATAACAA
CCCATTACTACAAATAGCGATAGAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAGTATTTTATTGAGA
GAAAATTATATCCAAACGTTT
```

## Continuação Anexo B

Rickettsia\_sp.\_str.\_Atlantic\_rainforest\_LIC4316

[Organism=Rickettsia sp.] [Strain=Atlantic rainforest] [Clone=LIC4316] [isolation-source=Rhipicephalus sanguineus on Canis familiaris] [mol\_type=genomic DNA] [host=Rhipicephalus sanguineus] [country=Brazil - Ceara state - Aratuba municipality]

```
CGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTTACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACT
GCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGATGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATA
TGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGTGATTTTTTAGAAGTGCCATATTTACTGATTTATGGGGA
ACTACCAAGTGGCGAGCAGTATAATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCATCATTATTAGTGAATG
AAAGATTACACTATTTATTTCAAACCTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGG
CTGTGCGTTCTCTTTGCGCATTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCAGATTACGAACTTA
CCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCTGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGAC
AACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGATGTTTGCAAC
GCCTTGACGAAATATACAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACAT
GCCGATCATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGCCGGCTCATCCGGAGCTAAC
CCTTTTGCTTGTATTAGCACGGGTATTGCCTCACTTTGGGGACCTGCTCACGGCGGGGCTAAT
GAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAA
GCTAAGGATAAAAATGATCCATTTAGATTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAACTATGAC
CCGCGTGCCGCAGTACTTAAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAGGAACTCGGGCAGCTAGAC
ACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATT
GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGT
CGCAAATGTTACGGTACTTTTTGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATGGCACAATGGA
```

Rickettsia\_andeanae

[Organism=Rickettsia andeanae] [Strain=Redencao] [Clone=LIC4328] [isolation-source=Amblyomma parvum on Cervidae] [mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma parvum] [country=Brazil - Ceara state - Redencao municipality]

```
CGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAGCCGATTGCTTTACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACT
GCTTCTTGTGAGTCTACTATCACCTATATAGACGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATA
TGATATTAAGACTTAGCTGAGAAAAGTGATTTTTTAGAAGTGCCATATTTACTGATTTATGGGGA
ACTACCAAGTGGCGAGCAGTATAATAATTTCACTAAACAGGTCGCTCATCATTATTAGTGAATG
AAAGATTACACTATTTATTTCAAACCTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGG
CTGTGCGTTCTCTTTGCGCATTATCCTGATTTATTGAATTTAAGGAAGCAGATTACGAACTTA
CCGCTATTAGAATGATTGCTAAGATACCTACCATCGCCGCAATGTCTTATAAATATTCTATAGGAC
AACCGTTTATTTATCCTGATAATTCGTTAGATTTTACCGAAAATTTTCTGCATATGATGTTTGCAAC
GCCTTGACGAAATATAAAGTAAATCCAATAATAAAAAATGCTCTTAATAAGATATTTATCCTACAT
GCCGATCATGAGCAGAATGCTTCTACTTCAACAGTCCGAATTGTCGGCTCATCCGGAGCTAAC
CCTTTTGCTTGTATTAGCACGGGTATTGCCTCACTTTGGGGACCTGCTCACGGCGGGGCTAAT
GAAGCGGTAATAAATATGCTTAAAGAAATCGGTAGTTCTGAGTATATTCCTAAATATATAGCTAAA
GCTAAGGATAAAAATGATCCATTTAGGTTAATGGGTTTTGGTCATCGTGTATATAAAAACTATGAC
CCGCGTGCCGCAGTACTTAAAGAAACGTGCAAAGAAGTATTAAGGAACTCGGGCAGCTAGAC
ACAATCCGCTCTTACAAATAGCAATAGAAGCTTGAAGCTATCGCTCTTAAAGATGAATATTTTATT
AAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGATTTTTATTTCGGGTATTATCTATAAAGCTATGGGTATACCGT
CGCAAATGTTACGGTACTTTTTGCAATAGCAAGAACCGTAGGCTGGATGGCACAATGGA
```

## ANEXO C

**Sequências depositadas no GenBank de fragmentos do gene riquetsial *ompA* obtidos a partir de potenciais vetores de riquétsias infectados provenientes da região do Maciço de Baturité, Estado do Ceará, no período de Abril de 2011 a Março de 2013.**

Rickettsia\_sp.\_str.\_Atlantic\_rainforest\_LIC4316  
[Organism=Rickettsia sp.] [Strain=Atlantic rainforest] [Clone=LIC4316]  
[isolation-source=Rhipicephalus sanguineus on Canis familiaris] [mol\_type=genomic DNA]  
[host=Rhipicephalus sanguineus]  
[country=Brazil - Ceara state - Aratuba municipality]

TTATTTCAAAAAGCAATACAACAAGGTCTTAAAGCCGCTTTATTCACCACCTCAACCGCAGCGAT  
AATGCTGAGTAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTGCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCA  
GCATTTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATAACGGCTGCAGGGGTAGCTAATG  
GTAATCCTGCTGGCGGTCTCAAACAATTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACTATCACT  
GCAGATGCAGCCGATCGTATTATTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCCTAGGTCTAAA  
TATTGCTCAAATAACCGTTGTTGGTTCGATTATAACGGGAGGTAACCTTGTTCCTGTTACTATTA  
CTGCCGGCAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATGC  
TCCTGCCGATAATTATACAGGTTTAGGAAATATAGCTTT

Rickettsia\_sp.\_str.\_Atlantic\_rainforest\_LIC4317  
[Organism=Rickettsia sp.] [Strain=Atlantic rainforest][Clone=LIC4317]  
[isolation-source=Amblyomma ovale on Canis familiaris]  
[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma ovale]  
[country=Brazil - Ceara state - Aratuba municipality]

TTATTTCAAAAAGCAATACAACAAGGTCTTAAAGCCGCTTTATTCACCACCTCAACCGCAGCGAT  
AATGCTGAGTAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTGCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCA  
GCATTTAGTGATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATAACGGCTGCAGGGGTAGCTAATG  
GTAATCCTGCTGGCGGTCTCAAACAATTGGGCATTTACTTACGGTGGTGATTATACTATCACT  
GCAGATGCAGCCGATCGTATTATTACGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCCTAGGTCTAAA  
TATTGCTCAAATAACCGTTGTTGGTTCGATTATAACGGGAGGTAACCTTGTTCCTGTTACTATTA  
CTGCCGGCAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATGC  
TCCTGCCGATAATTATACAGGTTTAGGAAATATAGCTTT

Rickettsia\_andeanae\_str.\_Redencao  
[Organism=Rickettsia andeanae] [Strain=Redencao] [Clone=LIC4328]  
[isolation-source=Amblyomma parvum on Cervidae]  
[mol\_type=genomic DNA] [host=Amblyomma parvum]  
[country=Brazil - Ceara state - Redencao municipality]

TTATTTCAAAAAGCAATACAACAAGGTCTTAAAGCCGCTTTATTCACCACCTCAACCGCAGCGAT  
AATGCTAAGTAGTAGCGGGGCACTCGGTGTTGCTGCAGGTGTTATTTCTACTAATAATGCAGCA  
TTTAGTGATGTTGCTGAGTTCGGTCATTGGAATAAAATAGCGGCTGGAGGGGTAGCTAATGGTA  
TTCTTGCTAACGGTCTCAAGACAATGAGGCATTTACTTACGGTGGTGATCATACTATCACTGC  
AAATAAAGCCGTCGTATTATTGTGGCTATAAATGTTGCGGGTACTACTCCCCTAGGTCTAAATA  
TTGCTCAAATAACCGTTGTTGGTTCGATTATAACGGGAGGTAACCTTGTTCCTGTTACTATTACT  
GCCGGCAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTTTGATGCTC  
CTGCCGATAATTATACAGGTTTAGGAAATATAGCTTT