



Ministério da Saúde  
FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz  
Curso de Especialização em Entomologia Médica

Diversidade de potenciais vetores ectoparasitos e pesquisa de riquetsia em área de interesse epidemiológico para a Febre Maculosa no Estado de Rondônia-Brasil

Ana Beatriz Martins de Gois

Orientadores

Dra. Marinete Amorim  
Dra. Karla Bitencourth Garcia

Rio de Janeiro  
2018

**Ana Beatriz Martins de Gois**

**Diversidade de potenciais vetores ectoparasitos e pesquisa de riquetsia em  
área de interesse epidemiológico para a Febre Maculosa no Estado de  
Rondônia-Brasil**

Monografia submetida como requisito parcial  
para obtenção do grau de especialista em  
Entomologista Médica, Curso de Especialização  
em Entomologia Médica, pelo Instituto Oswaldo  
Cruz/FIOCRUZ.

Rio de Janeiro

Data:10/12/2018

---

Assinatura do 1º membro da banca

Rubens Pinto de Mello

---

Assinatura do 2º membro da Banca

Ana Beatriz Pais Borsoi

---

Assinatura do 3º membro da Banca

Gilberto Salles Gazêta

de Gois, Ana Beatriz Martins.

Diversidade de potenciais vetores ectoparasitos e pesquisa de riquetsia em área de interesse epidemiológico para a Febre Maculosa no Estado de Rondônia-Brasil. / Ana Beatriz Martins de Gois. - Rio de Janeiro, 2018.  
xi, 41 f.; il.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2018.

Orientadora: Marinete Amorim.

Co-orientadora: Karla Bitencourth Garcia.

Bibliografia: f. 31-40

1. Bioma Amazônia. 2. Doenças associadas a carrapatos. 3. Epidemiologia. 4. Ixodídeos. 5. Riquetsiose. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus em primeiro lugar que me deu a oportunidade de realizar esse trabalho. Aos meus pais, Noemia e Alcir (*in memoriam*), por todo incentivo de seguir meus sonhos. Aos meus irmãos, Anderson e Nivia, por todo apoio durante a caminhada. Ao meu esposo, Felipe Alves, por todo o suporte e compreensão durante esse período e também a minha tia Nelcy por todo apoio financeiro e ajuda para tornar esse sonho possível.

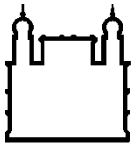
À todos do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN), pelo acolhimento e dando todo o suporte para o aprendizado durante os experimentos no laboratório. Principalmente ao Dr. Gilberto Gazêta pela oportunidade de fazer parte dessa grande família

Às minhas orientadoras Dra. Marinete Amorim, que me ajudou desde a idealização do projeto até a conclusão, e a Dra. Karla Bitencourth, que compartilhou comigo seus conhecimentos e ajudou na execução dos experimentos, o meu muito obrigada a todos, que Deus à todos recompense.

À Secretaria Estadual de Saúde do Estado de Rondônia pela coleta e envio dos ectoparasitos para o presente trabalho.

À Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, Pavilhão Leônidas Deane, pelos trabalhos realizados com toda dedicação e agilidade possível.

E a todos que de alguma forma me auxiliaram para a conclusão desse trabalho muito obrigada.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Diversidade de potenciais vetores ectoparasitos e pesquisa de riquetsia em área de interesse epidemiológico para a Febre Maculosa no Estado de Rondônia-Brasil

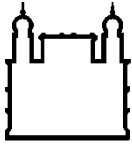
#### RESUMO

#### MONOGRAFIA DE ESPECIALIZAÇÃO EM ENTOMOLOGIA MÉDICA

Ana Beatriz Martins de Gois

O estado de Rondônia (RO) era considerado área silenciosa para febre maculosa (FM), porém um caso da doença foi confirmado em 2015. O conhecimento sobre a história natural, vetores e bioagentes da FM em RO ainda são incipientes. O objetivo foi realizar um levantamento da diversidade de ectoparasitos do estado e pesquisar a presença de riquetsia nesses potenciais vetores coletados durante a investigação ou vigilância de casos de FM em RO. Inicialmente, os ectoparasitos foram identificados utilizando chaves dicotômicas específicas. Parte das amostras foi submetida à extração de DNA, amplificação e sequenciamento: para a identificação molecular dos carrapatos foram utilizados fragmentos dos genes 12S rDNA, 16S rDNA e ITS2; e para pesquisa de riquetsia fragmentos dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB*. As sequências obtidas foram identificadas por análise comparativa com sequências do “GenBank” e submetidas à reconstrução filogenética através de análise de máxima verossimilhança. Foram identificados 2550 ectoparasitos, sendo 2511 carrapatos, 36 pulgas e três ácaros. A espécie mais encontrada foi *Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.)* (LATREILLE, 1806) (1034 espécimes), seguida por *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (675 espécimes), *Dermacentor nitens* NEUMANN, 1897 (655 espécimes), *Amblyomma* sp. (108 espécimes), *Amblyomma paca* ARAGÃO, 1911 (10 espécimes), *Amblyomma oblongoguttatum* KOCH, 1844 (sete espécimes), *Amblyomma naponense* (PACKARD, 1869) (seis espécimes), *Amblyomma scalpturatum* NEUMANN, 1906 (cinco espécimes), *Amblyomma latepunctatum* TONELLI-RONDELLI, 1939 (quatro espécimes), *Amblyomma calcaratum* NEUMANN, 1899 (dois espécimes), *Amblyomma dissimile* KOCH, 1844, *Amblyomma dubitatum* NEUMANN, 1899, *Amblyomma coelebs* NEUMANN, 1906, *Amblyomma longirostre* (KOCH, 1844) e *Amblyomma ovale* KOCH, 1844 (todos com um espécime cada); as pulgas *Ctenocephalides felis* (BOUCHÉ, 1835) (33 espécimes), *Xenopsylla cheopis* (ROTHSCHILD, 1903) (dois espécimes), e *Polygenis* sp. JORDAN, 1939 (um espécime); e o ácaro *Tur turki* FONSECA, 1959 (três espécimes). Das 707 amostras de carrapatos e 13 de pulgas submetidas à pesquisa de riquetsia, foi detectada a presença de *Candidatus Rickettsia andeanae* em três amostras de ninfas de *R. sanguineus s.l.*, e *Rickettsia aseboensis* em nove exemplares de *C. felis* de áreas com casos suspeitos e confirmados de FM em RO. É o primeiro registro dessas riquetsias para região norte do país. A circulação de riquetsias do grupo transicional e do grupo FM em RO, em ectoparasitos que são encontrados em animais domésticos, em áreas com casos suspeitos e confirmados da doença, evidencia a necessidade de mais estudos para o entendimento da epidemiologia da doença no estado, bem como verificar a existência de cenários epidemiológicos da FM específicos para a região.

**Palavras-chave:** Bioma Amazônia, Doenças associadas a carrapatos, Epidemiologia, Ixodídeos, Riquetsiose, Sifonápteros.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ  
Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Diversity of ectoparasites potential vectors and research of rickettsia in an area of epidemiological interest for Spotted Fever in the State of Rondônia-Brazil

#### ABSTRACT

#### SPECIALIZATION MONOGRAPH IN ENTOMOLOGIA MÉDICA

Ana Beatriz Martins de Gois

The state of Rondônia (RO) was considered a silent area for spotted fever (SF), but one case of the disease was confirmed in 2015. Knowledge about the natural history, vectors and bioagents of SF in RO is still incipient. The objective was to perform a survey of the diversity of ectoparasites and to investigate the presence of rickettsia in these potential vectors collected during the investigation or surveillance of SF cases in RO. Initially, ectoparasites were identified using specific dichotomous keys. Part of the samples was submitted to DNA extraction, amplification and sequencing: fragments of the 12S rDNA, 16S rDNA and ITS2 genes were used for the molecular identification of ticks; and for rickettsia research fragment of genes *gltA*, *htrA*, *ompA* and *ompB*. The obtained sequences were identified by comparative analysis with GenBank sequences and submitted to phylogenetic reconstruction through maximum likelihood analysis. 2550 ectoparasites were identified, being 2511 ticks, 36 fleas and three mites. The species most commonly found were *Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s. l.)* (LATREILLE, 1806) (1034 specimens), followed by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) (675 specimens), *Dermacentor nitens* NEUMANN, 1897 (655 specimens), *Amblyomma* sp. (108 specimens), *Amblyomma paca* ARAGÃO, 1911 (10 specimens), *Amblyomma oblongoguttatum* KOCH, 1844 (seven specimens), *Amblyomma naponense* (PACKARD, 1869) (six specimens), *Amblyomma sculpturatum* NEUMANN, 1906 (five specimens), *Amblyomma latepunctatum* TONELLI-RONDELLI, 1939 (four specimens), *Amblyomma calcaratum* NEUMANN, 1899 (two specimens), *Amblyomma dissimile* KOCH, 1844, *Amblyomma dubitatum* NEUMANN, 1899, *Amblyomma coelebs* NEUMANN, 1906, *Amblyomma longirostre* (KOCH, 1844) and *Amblyomma ovale* KOCH, 1844 (all with one specimens of each species); the fleas *Ctenocephalides felis* (BOUCHÉ, 1835) (33 specimens), *Xenopsylla cheopis* (ROTHSCHILD, 1903) (two specimens), and *Polygenis* sp. JORDAN, 1939 (one specimens); and the mite *Tur turki* FONSECA, 1959 (three specimens). Of the 707 samples of ticks and 13 of fleas submitted to the rickettsia research, the presence of *Candidatus Rickettsia andeanae* was detected in three samples of *R. sanguineus s. l.* nymphs, and *Rickettsia asemboensis* in nine *C. felis* specimens from areas with suspected and confirmed SF cases in RO. It is the first record of these rickettsias to north region of the country. The circulation of rickettsias from the transitional group and SF group in RO, in ectoparasites that are found in domestic animals, in areas with suspected and confirmed cases of the disease, evidence the need for further studies to understand the epidemiology of the disease in the state, as well as to verify the existence of specific SF epidemiological scenarios for the region.

**Keywords:** Amazon biome, Tick-borne diseases, Epidemiology, Ixodidae, Rickettsiosis, Siphonaptera.

## ÍNDICE

<b>RESUMO</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>v</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>01</b>
A Febre Maculosa .....	01
Vetores da Febre Maculosa .....	03
O Estado de Rondônia .....	05
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>07</b>
Objetivo Geral .....	07
Objetivos Específicos .....	07
<b>3 METODOLOGIA</b>	<b>08</b>
Coleta e acondicionamento dos ectoparasitos.....	08
Triagem e identificação dos ectoparasitos .....	09
Extração de DNA de carrapatos e pulgas .....	10
Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) .....	10
Pesquisa de riquetsias.....	10
Identificação molecular dos carrapatos.....	11
Eletroforese.....	12
Purificação e Sequenciamento de Nucleotídeos.....	12
Edição, identificação e alinhamento das sequências de DNA .....	13
Análises Filogenéticas.....	13
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>14</b>
Identificação dos ectoparasitos coletados.....	14
Identificação molecular e reconstrução filogenética dos espécimes de carrapatos .....	17
Pesquisa, identificação e reconstrução filogenética das riquetsias detectadas nos carrapatos e pulgas em Rondônia .....	17
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>23</b>
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>30</b>





## INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do Brasil indicando a localização e os biomas do estado de Rondônia (A). Mapa do estado de Rondônia com destaque para os municípios onde foram realizadas coletas de ectoparasitos durante vigilância e/ ou investigação de casos de Febre Maculosa (B). RO, Rondônia.....**08**
- Figura 2.** Coleta de carrapato no ambiente através da técnica de arrasto de flanela sobre a vegetação (Fonte: Secretaria Estadual de Saúde de Rondônia)..... **09**
- Figura 3.** Filogenia concatenada, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo GTR+G, de sequências parciais dos genes mitocondriais 12S rDNA, 16S rDNA e do marcador nuclear – “Segundo Espaçador Interno Transcrito” (ITS2) (338 + 357 + 1100 pb) de carrapatos Ixodidae coletados em Rondônia (RO) durante vigilância e/ ou investigação de casos de Febre Maculosa. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% “cut-off”)..... **19**
- Figura 4.** Filogenia concatenada, de fragmento dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB* de riquétsias (1098 + 407 + 494 + 803 pb) detectados nos carrapatos e pulgas estudados durante vigilância e/ ou investigação de casos de Febre Maculosa em Rondônia (RO), inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo GTR+G. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% “cut-off”)..... **22**

## INDICE DE TABELAS

- Tabela 1.** Iniciadores e referências dos protocolos de amplificação utilizados na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a pesquisa de riquetsias nas amostras de pulgas e carrapatos coletados em Rondônia/ Brasil ..... **11**
- Tabela 2.** Iniciadores e referências dos protocolos de amplificação utilizados na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação de fragmentos de marcadores nuclear e mitocondriais de carrapatos procedentes de Rondônia/ Brasil..... **12**
- Tabela 3.** Espécies e quantidade de espécimes de ectoparasitos, por estádios, coletados nos municípios do estado de Rondônia/ Brasil no período de 2014-2017 durante investigação e/ ou vigilância de casos de Febre Maculosa ..... **15**
- Tabela 4.** Total de ectoparasitos coletados no período de 2014-2017, por municípios do estado de Rondônia/ Brasil, durante investigação e/ ou vigilância de casos de Febre Maculosa ..... **16**
- Tabela 5.** Dados das amostras de carrapatos coletadas em Rondônia/ Brasil que foram submetidas à identificação molecular através do BLASTN (“Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide”) ..... **18**
- Tabela 6.** Dados das amostras de carrapatos e pulgas coletadas em Rondônia/ Brasil que amplificaram fragmentos de genes de riquetsias e a identificação molecular dessas riquetsias através do BLASTN (“Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide”) **20**

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%- Por cento

°C- Graus Celsius

µg- Micrograma

µL- Microlitro

CAVAISC- Coleção de Artrópodes Vetores Ápteros de Importância em Saúde das Comunidades

cm- Centímetro

CO<sub>2</sub>- Gás Carbônico

DNA- Do inglês, “Deoxyribonucleic Acid”- Ácido Desoxirribonucléico

DNAg- Do inglês, “genomic Deoxyribonucleic Acid”- Ácido Desoxirribonucléico genômico

Dnase- Desoxirribonuclease

dNTP- Do inglês, “Deoxynucleotide Triphosphates”- Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA- Do inglês, “Ethylenediaminetetraacetic acid”- Ácido etilenodiamino tetra-acético

EUA- Estados Unidos da América

et al.- E colaboradores

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

FM- Febre Maculosa

FMB- Febre Maculosa Brasileira

g- Grama

GFM- Grupo Febre Maculosa

GT- Grupo Tifo

h- Hora

HCl- Ácido Clorídrico

IBGE- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IOC- Instituto Oswaldo Cruz

ITS2- Do inglês, “Second internal transcribed spacer”, Segundo Espaçador Interno Transcrito

Km- Quilômetro

L- Litro

LIRN- Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses

M- Metro

MgCl<sub>2</sub>- Cloreto de Magnésio

mL- Mililitro

n° - Número

N<sub>2</sub>- Nitrogênio

NaCl- Cloreto de Sódio

P.A.- Para Análise

pb- Pares de bases

PCR- Do inglês, “Polymerase Chain Reaction”- Reação em Cadeia da Polimerase

PDTIS- Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

Pmol- Picomoles

RJ- Rio de Janeiro

RMSF- Do inglês, “Rocky Mountain Spotted Fever”- Febre Maculosa das Montanhas  
Rochosas

RO- Rondônia

sp.- Espécie

spp.- Espécies

Taq- *Thermus aquaticus*

TAE- Tris-acetato-EDTA

## 1. INTRODUÇÃO

Os ectoparasitos podem atuar como vetores de diversos patógenos para os animais vertebrados, incluindo os seres humanos. Considerando o cenário atual da Febre Maculosa (FM), podemos destacar os carrapatos e pulgas como os ectoparasitos de maior relevância para o ciclo da doença. São endêmicas do Brasil cerca de 60 espécies de carrapatos, algumas das quais são reconhecidas como vetores de riquetsias bioagentes da FM. Esse artrópode apresenta duas famílias no país, Argasidae e Ixodidae, com a segunda família possuindo maior relevância na epidemiologia da FM. No Brasil, os argasídeos são compostos pelos gêneros *Antricola*, *Argas*, *Ornithodoros* e *Nothoaspis*, e os ixodídeos pelos seguintes gêneros: *Amblyomma* (o mais numeroso, com aproximadamente 30 espécies), *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (DANTAS-TORRES et al., 2009; GUGLIELMONE et al., 2010; BURGER et al., 2014). Com relação aos sifonápteros, aproximadamente 62 espécies e/ou subespécies de pulgas foram assinaladas no Brasil, incluídas em 19 gêneros e oito famílias (LINARDI, 2011). Dessas espécies, as de maior importância médica e veterinária são *Tunga penetrans* (LINNAEUS, 1758), *Pulex irritans* LINNAEUS, 1758, *Xenopsylla cheopis* (ROTHSCHILD, 1903), *Polygenis bohlsi* (WAGNER, 1901), *Ctenocephalides canis* (CURTIS, 1826), *Ctenocephalides felis* (BOUCHÉ, 1835), *Nosopsyllus fasciatus* (BOSC, 1800) e *Leptopsylla segnis* (SCHÖNHERR, 1811) (SERRA-FREIRE & MELLO, 2006; LINARDI, 2011).

### 1.1 A Febre Maculosa

A FM é uma doença infecciosa febril aguda causada por bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias do gênero *Rickettsia* (Rickettsiaceae; Rickettsiales), que se localizam no núcleo ou citoplasma da célula hospedeira (EREMEEVA & DASCH, 2000). Podem ser transmitidas aos animais vertebrados por vetores ápteros (principalmente por carrapatos). Em alguns casos pode levar o indivíduo infectado à morte se o tratamento não for precoce. Nos ectoparasitos essa bactéria tem preferência pelas células intestinais, túbulos de Malpighi, hemolinfa, glândulas salivares e ovários (GIMENEZ, 1964; BURGDORFER, 1970; BILLINGS et al., 1998; YU & WALKER, 2003; RAOULT et al., 2005). Já nos vertebrados, atingem as células endoteliais onde se multiplicam e podem causar vasculites, ativação de plaquetas e do sistema de coagulação (GREENE & BREITSCHWERDT, 2006).

Com exceção da Antártica, a FM está presente em todos os outros continentes, em focos endêmicos, podendo emergir em intervalos esporádicos de forma epidêmica na população humana (AZAD & BEARD, 1998; PAROLA et al, 2013). Porém, em cada

lugar ou a cada diferente patógeno a doença é conhecida por nomes distintos, por exemplo: Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (que tem como bioagente a bactéria *Rickettsia rickettsii*) nos Estados Unidos da América (EUA); a Febre Maculosa Mediterrânea ou Febre Botonosa (causada pela *Rickettsia conorii*) na Europa, Ásia e África; a Febre da Picada do Carrapato (cujo agente etiológico é a *Rickettsia africae*) na África; a Febre Maculosa Oriental (associada à *Rickettsia japonica*) no Japão, e a Riquetsiose felis (causada pela *Rickettsia felis*) com registro em diversos países. Dessas riquetsioses citadas anteriormente, com exceção da Riquetsiose felis, cujo vetor inclui as pulgas, as outras têm como vetor os carrapatos (RAOULT & ROUX, 1997; BROUQUI et al., 2004; PAROLA et al., 2013).

Existem algumas propostas de classificação para as espécies de *Rickettsia*, dentre essas, a mais utilizada é: (i) Grupo Ancestral - com a *Rickettsia canadensis* e *Rickettsia bellii*, de patogenicidade desconhecida; (ii) Grupo Tifo - composto por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, transmitidas por piolhos e pulgas respectivamente; (iii) Grupo Transicional - constituído por *R. felis*, *Rickettsia asemboensis*, *Rickettsia akari* e *Rickettsia australis*, e (iv) Grupo Febre Maculosa (GFM) - com cerca de 30 espécies sendo, ao menos, 17 com patogenicidade comprovada e potencial para induzir, em humanos a FM, que apresenta características clínica e evolução variáveis, segundo a espécie do bioagente envolvido (STOTHARD et al., 1994; ROUX et al., 1997; ROUX & RAOULT, 2000; PADDOCK et al., 2004; GILLESPIE et al., 2008; PAROLA et al., 2013; FANG et al., 2017).

Dessas bactérias, a *R. rickettsii* é reconhecida como o agente causador da Febre Maculosa Brasileira (FMB), no entanto, outras espécies do gênero já foram observadas como bioagentes de FM em alguns estados do Brasil (RAOULT et al., 2001; SPOLIDORIO et al., 2010; LABRUNA et al., 2011). Ainda assim, a *R. rickettsii* é o agente da FM onde se observa o quadro clínico mais severo, com erupção cutânea como quadro característico para doença aparecendo a partir do 5º dia à exposição ao carrapato infectado, podendo levar o paciente a morte se o tratamento não for iniciado rapidamente. Quando o indivíduo não apresenta esses sinais clínicos o diagnóstico pode ser mais difícil, podendo a patologia ser confundida com outras viroses ou bacterioses, até mesmo com riquetsia do grupo tifo (WALKER et al., 2005; ANGERAMI et al., 2012). Nesse cenário da FM no Brasil, a *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica é relatada em pacientes com um quadro clínico mais leve (em geral, com escara de inoculação e linfadenopatia) resultando em doença com clínica mais branda (quando comparada com *R. rickettsii*), que tende a evoluir para cura (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011).

Nos dias de hoje, a FM é considerada uma doença emergente no Brasil pelo aumento de casos diagnosticados e a expansão das áreas de ocorrência. No entanto, ainda é pouco conhecida pelos profissionais de saúde e pelo público em geral (PAROLA et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016a). Atualmente, há notificações de casos suspeitos da doença em 20 Unidades da Federação e casos confirmados em 15 estados e no Distrito Federal, compreendendo diferentes biomas brasileiros (BARROS-SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a). A morbidade é moderada, mas a letalidade é alta, podendo atingir 80% nos casos mais graves. No período de 2007 a 2015, as regiões sudeste e sul do Brasil apresentaram as maiores taxas de incidência da doença no país: 62,33% (776 casos) e 24,90% (310 casos), respectivamente. Os óbitos, porém, concentram-se na região sudeste (81,75% do total de óbitos) (OLIVEIRA et al., 2016a).

## 1.2 Vetores da Febre Maculosa

Os carrapatos atuam como reservatórios, amplificadores e principais vetores das riquetsias associadas aos casos de FM. Eventualmente, animais sinantrópicos e/ ou domésticos, que atuam como hospedeiros de carrapatos, podem introduzir e manter linhagens infectadas desse artrópode em ambientes antrópicos (PAROLA et al., 2005; LABRUNA, 2009). Entretanto, é crescente a detecção de pulgas infectadas com riquetsias em áreas de investigação e com casos confirmados de FM (BROWN & MACALUSO, 2016; DALL'AGNOL et al., 2017; SILVA et al., 2017). Dessa forma, é necessário investigar a participação desses ectoparasitos nos casos de FM.

Diversas espécies de carrapatos são vetores de bioagentes da FM em todo o mundo: nos EUA, além de duas espécies do gênero *Dermacentor*- *Dermacentor andersoni* STILES, 1908 e *Dermacentor variabilis* SAY, 1821, espécies de *Amblyomma cajennense sensu lato (s.l.)* (FABRICIUS, 1787) e *Rhipicephalus sanguineus sensu lato (s.l.)* (LATREILLE, 1806) também são considerados vetores. No Uruguai o *Amblyomma triste* KOCH, 1844 foi incriminado como vetor (CONTI-DIAZ et al., 1990), e na Argentina foram reportados *A. cajennense s.l.* e *Amblyomma tigrinum* KOCH, 1844 (RIPOLL et al., 1999; ROMER et al., 2014).

No Brasil, atualmente, são reconhecidos quatro perfis epidemiológicos associados à FM: (1) *Amblyomma sculptum* BERLESE, 1888 como vetor de *R. rickettsii* é o cenário predominante na região sudeste do país. Onde, animais domésticos e silvestres (cavalos e capivaras) mantêm as populações desse carrapato na natureza. O risco de infecção para os humanos está associado a comportamentos que favorecem o

contato com os carrapatos (por exemplo, práticas de lazer, pescaria, contato com capivaras e atividades de fazenda). O quadro clínico, geralmente, caracteriza-se por febre de início abrupto, erupção cutânea, manifestações icterohemorrágicas, evolução rápida e alta letalidade; (2) *Amblyomma aureolatum* (PALLAS, 1772) vetor de *R. rickettsii* na região metropolitana de São Paulo (em áreas urbanas próximas a fragmentos de Mata Atlântica). Nesse perfil, cães e gatos que possuem livre acesso aos fragmentos de Mata Atlântica são parasitados por estádios adultos de *A. aureolatum*, levando-os ao domicílio e peridomicílio, com o subsequente risco de parasitismo para os humanos. O quadro clínico nos humanos não apresenta diferenciais quanto ao perfil anterior. Há suspeita que o carrapato do cão urbano, *R. sanguineus s.l.*, também possa atuar como vetor nessas áreas, onde esse artrópode tem sido encontrado infectado por *R. rickettsii* em locais com presença do vetor primário *A. aureolatum* (OLIVEIRA et al., 2016a); (3) *Amblyomma ovale* KOCH, 1844 é vetor de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em áreas de Mata Atlântica nas regiões sul (Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná), sudeste (litoral de São Paulo e do Rio de Janeiro) e nordeste do país (Ceará). Nesse contexto, o ciclo epidêmico ocorre quando humanos têm contato com os estádios adultos de *A. ovale* infectados (seja por atividades diversas em áreas preservadas de Mata Atlântica, ou no domicílio/peridomicílio pela convivência com cães que têm acesso livre a áreas de Mata Atlântica- de onde vêm infestados com carrapatos). As manifestações clínicas (em geral, febre escara de inoculação, erupção cutânea e linfadenopatia) tendem a ser mais brandas do que aquelas associadas ao quadro clínico desencadeado por *R. rickettsii*. Os dados epidemiológicos indicam que a evolução da doença associada a esse perfil não é grave e não há letalidade associada; e (4) *A. tigrinum* como potencial vetor de *Rickettsia parkeri sensu stricto (s.s.)* em área de Pampa no Rio Grande do Sul. Esse cenário é o mais recentemente relatado para o país (WECK et al., 2016), e estaria associado à escara de inoculação em humanos residentes em áreas rurais com relatos prévios de casos de FM nessa região do Brasil. Este perfil é semelhante com o padrão epidemiológico sugerido em algumas regiões da Argentina, onde *A. tigrinum* é apontado como o vetor da *R. parkeri s.s.*, e também em outros países onde *A. triste* e *Amblyomma maculatum* KOCH, 1844 são vetores reconhecidos de *R. parkeri s.s.* para humanos (SZABÓ et al., 2013; MOERBECK et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2016a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b). Entretanto, para a região norte, centro-oeste e parte da região nordeste do Brasil o conhecimento sobre a história natural, presença de riquetsias patogênicas, potenciais ectoparasitos vetores e a epidemiologia da doença ainda são incipientes.



### 1.3 O Estado de Rondônia

Rondônia é um estado jovem, criado em 1982, situado na região norte do Brasil. Apresenta uma área geográfica de aproximadamente 237.765,376 km<sup>2</sup>, com a população estimada em 1.757.589 habitantes. O estado possui clima equatorial e vegetação formada pela Floresta Amazônica em grande parte do território, mas também conta com a presença do bioma Cerrado na região oeste do estado (IBGE, 2018).

O estado de Rondônia apresenta um dos maiores índices de desmatamento e degradação florestal dos últimos anos (INPE, 2018). A degradação ambiental associada às mudanças climáticas influencia a relação parasito-hospedeiro. Adicionalmente, o reflorestamento, com o plantio de arbustos, e a prática da monocultura estão produzindo microclimas favoráveis à proliferação de carrapatos e de seus hospedeiros (CARDOSO et al., 2006). Ainda nesse contexto, o processo de urbanização de áreas anteriormente rurais aumenta as chances de contato entre os animais silvestres, os animais domésticos e o homem. Podendo, assim, haver intercâmbio dos carrapatos de áreas silvestres para áreas urbanas/ peridomiciliares através desses animais, o que pode propiciar o parasitismo humano por esse ectoparasito (SZABÓ et al., 2013).

Estudos anteriores no estado de Rondônia identificaram a presença de 35 espécies de carrapatos em diferentes gêneros: para a família Ixodidae os gêneros *Amblyomma* (21 espécies), *Ixodes* (três espécies), *Haemaphysalis* (uma espécie), *Dermacentor* (uma espécie) e *Rhipicephalus* (duas espécies), além de *Antricola* (três espécies) e *Ornithodoros* (quatro espécies) da família Argasidae (LABRUNA et al., 2002; LABRUNA et al., 2004a, b; LABRUNA et al., 2005a, b; LABRUNA et al., 2010; MARTINS et al., 2014, 2016; AGUIRRE et al., 2018; ZIMMERMANN et al., 2018).

Portanto, a fauna de carrapatos de Rondônia corresponde a mais de 50% das espécies brasileiras de carrapatos, destacando a relevância de estudos desse artrópode nessa região.

Entretanto, as intensas alterações ambientais que Rondônia vem sofrendo podem ter consequências nas espécies de carrapatos locais. Possibilitando, assim, a expansão de algumas espécies de parasitos e/ou extinção de outras. Como, por exemplo, o *A. sculptum* que tem expandido para essa região (MARTINS et al., 2016). Esse dado, associado a antropização faz de Rondônia um local potencial para ocorrência de doenças associadas a carrapatos.

O estado de Rondônia era considerado como área silenciosa para FM até o ano de 2015, quando foi registrado o primeiro caso da doença no município de Ariquemes. Posteriormente, em 2016, dois casos da doença foram registrados no estado, um para o município de Alvorada D'Oeste e outro para a capital do estado, Porto Velho (SINAN,

2018). Todos os casos de FM registrados em Rondônia evoluíram para cura após o atendimento médico. Adicionalmente, estudo de biologia molecular demonstrou a detecção de riquetsias nos carrapatos *Dermacentor nitens* NEUMANN 1897, *R. sanguineus s.l.*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1888) e em pulgas *C. felis* coletadas durante investigação e vigilância de casos de FM em Rondônia (OLIVEIRA et al., 2016b). Entretanto, esse estudo não caracterizou geneticamente as espécies de riquetsias presentes nesses ectoparasitos.

Considerando a grande diversidade de carrapatos presentes em Rondônia, as alterações ambientais que o estado vem sofrendo, os registros recentes de casos confirmados de FM, bem como o conhecimento incipiente sobre a história natural, vetores e bioagentes da FM é necessário a realização de estudo sobre a fauna de potenciais vetores ectoparasitos e as riquetsias circulantes em áreas com casos confirmados ou suspeitos de FM no estado. Propiciando, assim, um melhor entendimento da epidemiologia da doença em Rondônia.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar a diversidade de potenciais vetores e pesquisar a presença de riquetsias nos espécimes coletados durante vigilância e investigação de casos de FM em Rondônia.

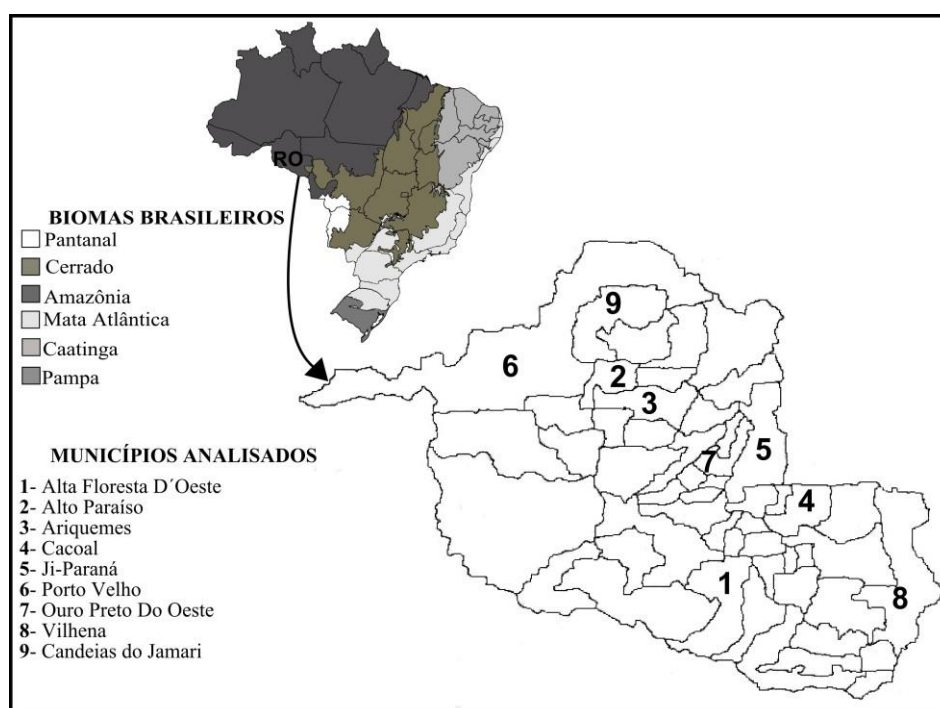
### **2.2 Objetivos Específicos**

- Identificar a composição da fauna de ectoparasitos na área de estudo.
- Pesquisar e identificar molecularmente riquetsias presentes nas amostras coletadas.
- Utilizar a biologia molecular para confirmar o diagnóstico específico de carrapatos das áreas estudadas.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1. Coleta e acondicionamento dos ectoparasitos

Os ectoparasitos foram coletados em nove municípios do estado de Rondônia (Figura 1), no período de 2014 a 2017, durante vigilância e/ ou investigação de casos de FM pelas equipes das Secretarias Municipais e Estadual de Saúde de Rondônia.



**Figura 1.** Mapa do Brasil indicando a localização e os biomas do estado de Rondônia (A). Mapa do estado de Rondônia com destaque para os municípios onde foram realizadas coletas de ectoparasitos durante vigilância e/ ou investigação de casos de Febre Maculosa (B). RO, Rondônia.

Os carrapatos foram removidos em cães, cavalos, bois, gato, jumento, porco do mato e em humano através de torção contínua em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma. As pulgas foram coletadas em cães e o ácaro em roedor, ambos por catação. Também foram realizadas coletas de carrapato no ambiente (domicílio, peridomicílio e em áreas de borda de mata) utilizando as técnicas de arrasto de flanela, armadilha de gelo seco (CO<sub>2</sub>) e busca ativa (Figura 2) (SONENSHINE, 1993).



**Figura 2.** Coleta de carrapato no ambiente através da técnica de arrasto de flanela sobre a vegetação (Fonte: Secretaria Estadual de Saúde de Rondônia).

As amostras foram definidas por espécimes coletados em um mesmo hospedeiro ou ambiente. Após a coleta, as amostras foram acondicionadas em microtubos plásticos estéreis, contendo álcool isopropanol P. A., e encaminhados ao Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)/ Rio de Janeiro (RJ), juntamente com as fichas de coleta preenchidas, para triagem dos ectoparasitos e posterior identificação.

### **3.2. Triagem e identificação dos ectoparasitos**

A triagem e identificação morfológica dos artrópodes foram realizadas de acordo com o Procedimento Operacional Padrão (POP-LIRN-017), utilizando as normas estabelecidas pelo LIRN, com auxílio de estereomicroscópio e microscópio óptico, e empregando descrições e chaves dicotômicas para carrapatos de AMORIM et al. (1997) e AMORIM & SERRA-FREIRE (1999) para larvas; MARTINS et al. (2010) para ninfas; ARAGÃO & FONSECA (1961) e BARROS-BATTESTI et al., (2006) para adultos. As pulgas foram identificadas de acordo com as chaves de BICHO & RIBEIRO (1998) e LINARDI & GUIMARÃES (2000), e para o ácaro foi utilizada a bibliografia de FURMAN (1972). Antes da identificação taxonômica, parte das larvas dos carrapatos e os ácaros foram preparados em montagem definitiva entre lâmina e lamínula, de acordo com a metodologia descrita por AMORIM & SERRA-FREIRE (1995).

Após a análise morfológica de 2550 exemplares coletados, 707 amostras de carrapatos e 13 de pulgas foram separadas em alíquotas para serem submetidas à pesquisa

de riquetsia através de análises moleculares. As alíquotas foram elaboradas para as amostras de pulgas e carrapatos de acordo com o cenário de envolvimento com os casos de FM: 30% (quando procedente de vigilância de caso de FM) ou 50% (quando oriunda de investigação de caso de FM) dos exemplares de cada amostra foram selecionados para os estudos de biologia molecular. As alíquotas foram preparadas de acordo com a espécie, estágio (larvas, ninfas e adultos) e sexo (fêmea e macho), sendo compostas por exemplares unitários ou em *pool* (2-20 larvas de carrapatos; 2-3 ninfas de carrapatos). Quando a diagnose taxonômica específica das amostras não foi conclusiva através das análises morfológicas, esses exemplares também foram submetidos à identificação genotípica através das análises moleculares. Todas as alíquotas elaboradas foram submetidas à extração de DNA.

### **3.3. Extração de DNA de carrapatos e pulgas**

A extração total de DNA genômico (DNAg) das alíquotas foi realizada através da técnica de extração por sal NaCl (ALJANABI & MARTINEZ, 1997). Onde, inicialmente, os tubos contendo os carrapatos e pulgas foram mergulhados em N<sub>2</sub> líquido e macerados com o auxílio de bastão de vidro. Posteriormente, as alíquotas maceradas foram ressuspendidas com 400 µL de solução contendo NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM pH 8,0. Foi adicionado também 40 µL de SDS 20% e 8 µL de Proteinase K 20 mg/mL (Invitrogen, Califórnia, EUA). Na sequência, o material foi homogeneizado utilizando vórtex e incubado em banho Maria à 56°C durante uma hora. Em seguida, foi adicionado 300 µL de NaCl 6M a alíquota, que foi homogeneizada e centrifugada à 10000 rpm por 30 minutos. Finalizada a centrifugação, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo onde foi precipitado com o mesmo volume (~600 µL) de álcool isopropanol P. A, por no mínimo uma hora à -20°C. Após esse período, o material foi centrifugado à 10000 rpm por 10 minutos, foi desprezado o sobrenadante e o *pellet* foi lavado com 600 µL de etanol 70% através de centrifugação à 10000 rpm por 10 minutos. Por fim, o sobrenadante foi desprezado e o microtubo foi posto para secar a temperatura ambiente. Posteriormente, o DNAg foi ressuspendido em 25 µl de água Milli-Q livre de DNases e RNases e armazenado a -20 °C até a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para as análises moleculares.

### **3.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)**

#### **3.4.1. Pesquisa de riquetsias**

A pesquisa de riquetsias foi feita em todas as alíquotas de DNAg de amostras de carrapatos e pulgas através da PCR. Inicialmente, para uma triagem quanto a presença de riquetsia, todas as alíquotas foram submetidas à busca de fragmento dos genes citrato sintase (*gltA*) (utilizando os iniciadores CS2-78 e CS2-323; LABRUNA et al., 2004a) e do gene da proteína externa de membrana A (*ompA*- do inglês, “outer membrane protein A”). Posteriormente, as amostras que amplificaram para algum desses marcadores foram submetidas a novas PCR’s para os marcadores: *htrA* (do inglês, “High-temperature requirement A”) que codifica a proteína estrutural de membrana de 17 kilodaltons, o gene da proteína externa de membrana B (*ompB*- do inglês, “outer membrane protein B”), o *gltA* (utilizando os iniciadores CS4-239 e CS4-1069; LABRUNA et al., 2004b) e o *Gene D/* antígeno de superfície celular 4 (*sca4*- do inglês, “surface cell antigen 4”). Nessas ampliações foram empregados oligonucleotídeos e respectivos protocolos de amplificação disponíveis na literatura (Tabela 1). Em todas as reações foi utilizado como controle positivo DNA de *R. rickettsii* e água Milli-Q livre de DNases e RNases como controle negativo.

**Tabela 1.** Iniciadores e referências dos protocolos de amplificação utilizados na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a pesquisa de riquetsias nas amostras de pulgas e carrapatos coletados em Rondônia/ Brasil.

Alvo da detecção	Gene	Técnica utilizada	Iniciador	Sequência de nucleotídeo(5'-3')	Fragmento (pb)	Referência
<i>Rickettsia</i> sp. (Gênero específico)	<i>gltA</i>	PCR	CS2-78	5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3'	401	LABRUNA et al., 2004a
			CS2-323	5'-GCTTCCTTAAATTCATAAATCAGGAT-3'		
	<i>htrA</i>	PCR <i>nested</i>	CS4-239	5'-GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT-3'	334	LABRUNA et al., 2004b
			CS4-1069	5'-CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT-3'		
<i>Rickettsia</i> sp. (GFM + GT)	<i>ompB</i>	PCR	120-M59	5'-CCGCAGGGTTGGTAACTGC-3'	862	ROUX; RAOULT, 2000
			120-807	5'-CCTTTTAGATTACCGCTAA-3'		
<i>Rickettsia</i> sp. GFM <i>ompA</i>			<i>Rr</i> 190.70p <i>Rr</i> 190.602n	5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAA-3' 5'-AGTGCAGCATTGCTCCCT-3'	532	REGNERY et al., 1991

GFM, Grupo Febre Maculosa; GT, Grupo Tifo.

### 3.4.2. Identificação molecular dos carrapatos

Para a identificação molecular, as amostras de carrapatos foram submetidas à amplificação de fragmentos parciais dos genes mitocondriais 16S rDNA e 12S rDNA, e do marcador nuclear Segundo Espaço Interno Transcrito (ITS2). Essas ampliações foram realizadas através da PCR, onde foram utilizados iniciadores e protocolos de amplificação disponíveis na literatura (Tabela 2).

**Tabela 2.** Iniciadores e referências dos protocolos de amplificação utilizados na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para amplificação de fragmentos de marcadores nuclear e mitocondriais de carrapatos procedentes de Rondônia/ Brasil.

Localização	Gene	Pares de Iniciadores	Sequência de nucleotídeos	Tamanho aproximado do produto amplificado	Referência
Nuclear	Espaçador Interno Transcrito 2 (ITS-2)	F2LITS2 McLn	5' -TGAGGGTCGGATCAYATATCA -3' 5' -GTGAATTCTATGCTTAAATTCAGGGGGT -3'	950 pb	McLAIN et al., 1995
	12S rDNA	T2A T1B	5'-AAAGAGTGACGGGCGATATGT-3' 5'-AAACTAGGATTAGATACCCT-3'	340 pb	BEATI; KEIRANS, 2001
Mitocondrial	16S rDNA	16S+1 16S-1	5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3' 5'-GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT-3'	460 pb	MANGOLD et al., 1998

pb, pares de base.

As amplificações através da PCR, dos marcadores dos carrapatos e dos genes de riquétsias, foram realizadas no termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems, Califórnia, EUA).

### 3.5 Eletroforese

Para visualização dos produtos amplificados, os amplicons foram submetidos à eletroforese (89 volts por 90 minutos) em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio. Posteriormente, os géis foram observados em scanner de gel MiniBis Pro (DNR Bio- Imaging Systems Ltd. Jerusalém, Israel) com luz ultravioleta. Imagens digitais de cada gel foram geradas e arquivadas.

Todos os produtos da PCR que corresponderam ao tamanho de DNA esperado, para cada marcador, foram selecionados para purificação e sequenciamento.

### 3.6 Purificação e Sequenciamento de Nucleotídeos

As amostras foram purificadas, a partir do amplicon, utilizando o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up System (Promega, Corp., Madison, WI, EUA), seguindo as recomendações do fabricante.

Posteriormente, os amplicons purificados foram encaminhados para o sequenciamento do DNA, cujas reações foram executadas utilizando os mesmos iniciadores empregados na PCR e o BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (AppliedBiosystems, Califórnia, EUA), de acordo com o manual do fabricante. Em seguida, as amostras foram precipitadas, ressuspendidas em formamida e aplicadas em sequenciador automático ABI 3730 (Applied Biosystems, Califórnia, EUA) na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS) da FIOCRUZ/RJ para determinação das sequências em ambas as direções (3' - 5' e 5' - 3').



Todas as sequências obtidas estão depositadas no “GenBank” (MK030074-77, MK030019-33, MK031655-93).

### **3.7 Edição, identificação e alinhamento das sequências de DNA**

As sequências obtidas foram editadas manualmente e as sequências consenso geradas no programa ChromasPro 1.5 (Tebhnelysium, Queensland, Australia). Inicialmente essas sequências foram identificadas, por avaliação de similaridade, através de análise comparativa com as sequências depositadas no “GenBank”, com auxílio do BLASTN (“Basic Local Alignment Search Tool- Nucleotide”).

As sequências obtidas e sequências disponíveis no “GenBank”, para cada gene analisado, foram automaticamente alinhadas através do algoritmo de alinhamento múltiplo ClustalW (THOMPSON et al., 1994), disponível no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente e os genes codificantes de proteínas foram traduzidos para aminoácidos para verificar a presença de pseudogenes e confirmar a existência de homologia, onde nenhum códon de parada foi observado.

### **3.8 Análises Filogenéticas**

Para investigar as relações evolutivas entre as amostras de carrapatos identificadas molecularmente, bem como entre as riquétsias detectadas, foram realizadas análises filogenéticas, separadamente, para as sequências dos marcadores obtidos dos carrapatos e das riquétsias. Para isso, foram utilizadas sequências geradas no atual trabalho e sequências disponíveis no “GenBank”.

Nas análises concatenadas, o programa SeaView (GOUY et al., 2010) foi utilizado para concatenar os alinhamentos dos genes investigados de cada organismo estudado. As inferências filogenéticas, através de análise de máxima verossimilhança, foram realizadas no programa PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010) utilizando o modelo evolutivo (através do “Bayesian Information Criterion”) indicado pelo programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) que melhor se ajustava ao conjunto de dados analisados (para o alinhamento dos genes 16S rDNA + 12S rDNA + ITS2 dos carrapatos e para o alinhamento dos marcadores *gltA*+ *htrA*+ *ompA*+ *ompB* das riquétsias foi utilizado o modelo evolutivo GTR+G). Valores de apoio estatístico dos ramos internos foram estimados com o teste aLRT (“approximate likelihood ratio test”) com 1000 réplicas (ANISIMOVA & GASCUEL, 2006).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Identificação dos ectoparasitos coletados

Foram identificados 2550 ectoparasitos, sendo 2511 carrapatos, 36 pulgas e três ácaros. A espécie mais assinalada foi *R. sanguineus s.l.* com 1034 espécimes coletados, seguida por *R. microplus* com 675 exemplares, *D. nitens* com 655 exemplares, e *Amblyomma* sp. com 108 exemplares. As espécies de carrapatos assinaladas com menor quantidade de espécimes foram *Amblyomma pacaie* ARAGÃO, 1911 com 10 espécimes, *Amblyomma oblongoguttatum* KOCH, 1844 com sete espécimes, *Amblyomma naponense* (PACKARD, 1869) com seis espécimes, *Amblyomma scalpturatum* NEUMANN, 1906 com cinco espécimes, *Amblyomma latepunctatum* TONELLI-RONDELLI, 1939 com quatro espécimes, *Amblyomma calcaratum* NEUMANN, 1899 com dois espécimes, e *Amblyomma coelebs* NEUMANN, 1906, *Amblyomma dissimile* KOCH, 1844, *Amblyomma dubitatum* NEUMANN, 1899, *Amblyomma longirostre* (KOCH, 1844) e *A. ovale* com um espécime cada, respectivamente. Com relação às pulgas, a mais assinalada foi *C. felis* com 33 espécimes, também foram coletadas dois exemplares de *X. cheopis* e um de *Polygenis* sp.. Uma única espécie de ácaro, *Tur turki* FONSECA, 1959, três fêmeas, foi assinalada nas áreas de coleta do estado de Rondônia (Tabelas 3 e 4).

A maior parte dos ectoparasitos coletados nos municípios de Rondônia correspondeu ao estágio de larva (56,90% -1451 espécimes), seguido por adultos fêmeas (17,92%- 457 exemplares), adultos machos (12,75%- 325 indivíduos) e ninfas (12,43%- 317 representantes) (Tabela 3). Considerando exclusivamente os carrapatos (2511), observou-se que 57,78% (1451) dos espécimes identificados eram representados por larvas, 17,09% (429) por fêmeas, 12,63% (317) por ninfas e 12,50% (314) por machos nas áreas estudadas. Entretanto, para as pulgas (11 machos e 25 fêmeas identificados) e ácaros (três fêmeas diagnosticadas) só foram coletados espécimes adultos (Tabelas 3 e 4).

Com relação aos carrapatos, a maior parte das larvas 36,30% (527) eram de *R. microplus*, 41,00% (130) das ninfas corresponderam a *D. nitens*, e a maioria dos adultos foram identificados como *R. sanguineus s.l.* [68,30% (222 exemplares) dos machos, e 36,80% (168 espécimes) das fêmeas] (Tabela 3).

Dentre os municípios estudados, os que apresentaram maior quantidade de ectoparasitos coletados foram Ariquemes (24,23%, 618 espécimes), seguido por Ji-Paraná (20,55%, 524 indivíduos), Cacoal (20,23%, 516 exemplares), Alto Paraíso (19,

**Tabela 3.** Espécies e quantidade de espécimes de ectoparasitos, por estádios, coletados nos municípios do estado de Rondônia/ Brasil no período de 2014-2017 durante investigação e/ ou vigilância de casos de Febre Maculosa.

Espécies de ectoparasitos	Nº de espécimes por estágio				Municípios
	L	N	M	F	
<i>Amblyomma calcaratum</i>			1 (0,30%)	1 (0,20%)	Ariquemes
<i>Amblyomma coelebs</i>		1 (0,30%)			Ariquemes
<i>Amblyomma dissimile</i>			1 (0,30%)		Cocoal
<i>Amblyomma dubitatum</i>				1 (0,20%)	Alto Paraíso
<i>Amblyomma longirostre</i>			1 (0,30%)		Alta Floresta D'Oeste
<i>Amblyomma latepunctatum</i>			1 (0,30%)	3 (0,70%)	Candeias do Jamari
<i>Amblyomma naponense</i>		3 (0,90%)		3 (0,70%)	Ariquemes, Porto Velho
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	3 (0,20%)	2 (0,60%)	1 (0,30%)	1 (0,20%)	Ariquemes, Porto Velho
<i>Amblyomma ovale</i>				1 (0,20%)	Vilhena
<i>Amblyomma pacaе</i>	10 (0,70%)				Alto Paraíso
<i>Amblyomma sculpturatum</i>		2 (0,60%)	2 (0,60%)	1 (0,20%)	Ariquemes, Porto Velho, Candeias do Jamari
<i>Amblyomma sp.</i>	90 (6,20%)	18 (5,70%)			Ariquemes, Cocoal, Ji Paraná, Porto Velho, Ouro Preto do Oeste, Vilhena
<i>Dermacentor nitens</i>	303 (20,90%)	130 (41,00%)	66 (20,30%)	156 (34,00%)	Alto Paraíso, Ariquemes, Cocoal, Ji Paraná, Porto Velho, Ouro Preto do Oeste
<i>Rhipicephalus microplus</i>	527 (36,30%)	35 (11,00%)	19 (5,80%)	94 (20,60%)	Alto Paraíso, Ariquemes, Porto Velho
<i>Rhipicephalus sanguineus sensu lato</i>	518 (35,70%)	126 (39,70%)	222 (68,30%)	168 (36,80%)	Alto Paraíso, Ariquemes, Cocoal, Ji Paraná, Porto Velho
<i>Ctenocephalides felis</i>			9 (2,80%)	24 (5,30%)	Cocoal, Ji Paraná, Porto Velho
<i>Polygenis spp.</i>				1 (0,20%)	Cocoal
<i>Xenopsylla cheopis</i>			2 (0,60%)		Ariquemes
<i>Tur turki</i>				3 (0,70%)	Porto Velho
<b>Total</b>	<b>1451 (100%)</b>	<b>317 (100%)</b>	<b>325 (100%)</b>	<b>457 (100%)</b>	

Legenda: L- larva, N- ninfa, M- macho, e F- fêmea.

**Tabela 4.** Total de ectoparasitos coletados no período de 2014-2017, por municípios do estado de Rondônia/ Brasil, durante investigação e/ ou vigilância de casos de Febre Maculosa.

ECTOPARASITOS	MUNICÍPIOS DE RONDÔNIA																								TOTAL																		
	Alta Floresta D'Oeste				Alto Paraiso				Ariquemes				Cacoal				Ji-Paraná				Porto Velho					Ouro Preto do Oeste				Vilhena				Candeias do Jamari									
	L	N	M	F	L	N	M	F	L	N	M	F	L	N	M	F	L	N	M	F	L	N	M	F		L	N	M	F	L	N	M	F	L	N	M	F	L	N	M	F		
<i>Amblyomma sp.</i>									14				2				44				20				24				4												108		
<i>Amblyomma calcaratum</i>									1		1																														2		
<i>Amblyomma coelebs</i>									1																																1		
<i>Amblyomma dissimile</i>															1																										1		
<i>Amblyomma dubitatum</i>								1																																	1		
<i>Amblyomma latepunctatum</i>																																			1	3					4		
<i>Amblyomma longirostre</i>			1																																						1		
<i>Amblyomma naponense</i>									2												1			3																	6		
<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>									2												3			1	1																7		
<i>Amblyomma ovale</i>																																				1					1		
<i>Amblyomma pacaе</i>							10																																		10		
<i>Amblyomma scalpturatum</i>									2															1												1	1				5		
<i>Dermacentor nitens</i>							70		204	16	30	32	1				8	21	85		28	102	15	36					4		3										655		
<i>Rhipicephalus microplus</i>							367	10	5	22	160	16	12	56									9	2	16																675		
<i>Rhipicephalus sanguineus sensu lato</i>							2	5	8		6	24	37	466	15	22			112	160	80		52	6	18	21																	1034
<i>Ctenocephalides felis</i>															2	6					14				7	4																	33
<i>Polygenis spp.</i>																	1																										1
<i>Xenopsylla cheopis</i>									2																																		2
<i>Tur turki</i>																																											3
<b>Total por estádio</b>	0	0	1	0	447	12	10	31	364	59	69	126	469	0	18	29	44	120	181	179	103	118	44	84	24	4	0	3	0	4	0	4	0	1	0	0	0	2	4	4	2550		
<b>Total por município</b>	<b>1 (0,04%)</b>				<b>500 (19,60%)</b>				<b>618 (24,23%)</b>				<b>516 (20,23%)</b>				<b>524 (20,55%)</b>				<b>349 (13,69%)</b>				<b>31 (1,22%)</b>				<b>5 (0,20%)</b>				<b>6 (0,24%)</b>				<b>(100,00%)</b>						

60%, 500 espécimes) e Porto Velho (13,69%, 349 representantes). Por outro lado, os municípios de Ouro Preto do Oeste (31 carrapatos, 1,22%), Candeias do Jamari (seis espécimes, 0,24%), Vilhena (cinco indivíduos, 0,20%,) e Alta Floresta D'Oeste (um exemplar, 0,04%,) foram menos representativos quanto ao número de espécimes coletados (Tabelas 3 e 4).

O ácaro *T. turki*, por não estar relacionado como potencial vetor dos bioagentes da FM, não teve seus espécimes submetidos às análises moleculares. Todos os seus exemplares estão montados de forma permanente entre lâmina e lamínula. As larvas de carrapatos que foram montadas permanentemente entre lâminas e lamínulas também não foram submetidas às análises moleculares. Todas essas lâminas estão depositadas como amostras testemunho na Coleção de Artrópodes Vetores Ápteros de Importância em Saúde das Comunidades (CAVAISC), da Fundação Oswaldo Cruz, sob o acrônimo e número: CAVAISC-ACA-1773a-c, CAVAISC-IXO-2591a-b, CAVAISC-IXO-2670, CAVAISC-IXO-2671, CAVAISC-IXO-2672, CAVAISC-IXO-2673, CAVAISC-IXO-2674, CAVAISC-IXO-2710 e CAVAISC-IXO-2903.

#### **4.1.1 Identificação molecular e reconstrução filogenética dos espécimes de carrapatos**

No total, 30 espécimes de ixodídeos foram submetidos à identificação molecular (Tabela 5, Figura 3). Para algumas amostras (LIC 7824A-F, 8427B e 7906A), só foi possível concluir o diagnóstico específico através das análises moleculares. Para todas as outras amostras, a identificação molecular dos carrapatos corroborou a identificação morfológica desses espécimes. Já que na reconstrução filogenética (Figura 3), as sequências dessas amostras agruparam com as mesmas espécies de ixodídeos com as quais foram identificadas através da morfologia.

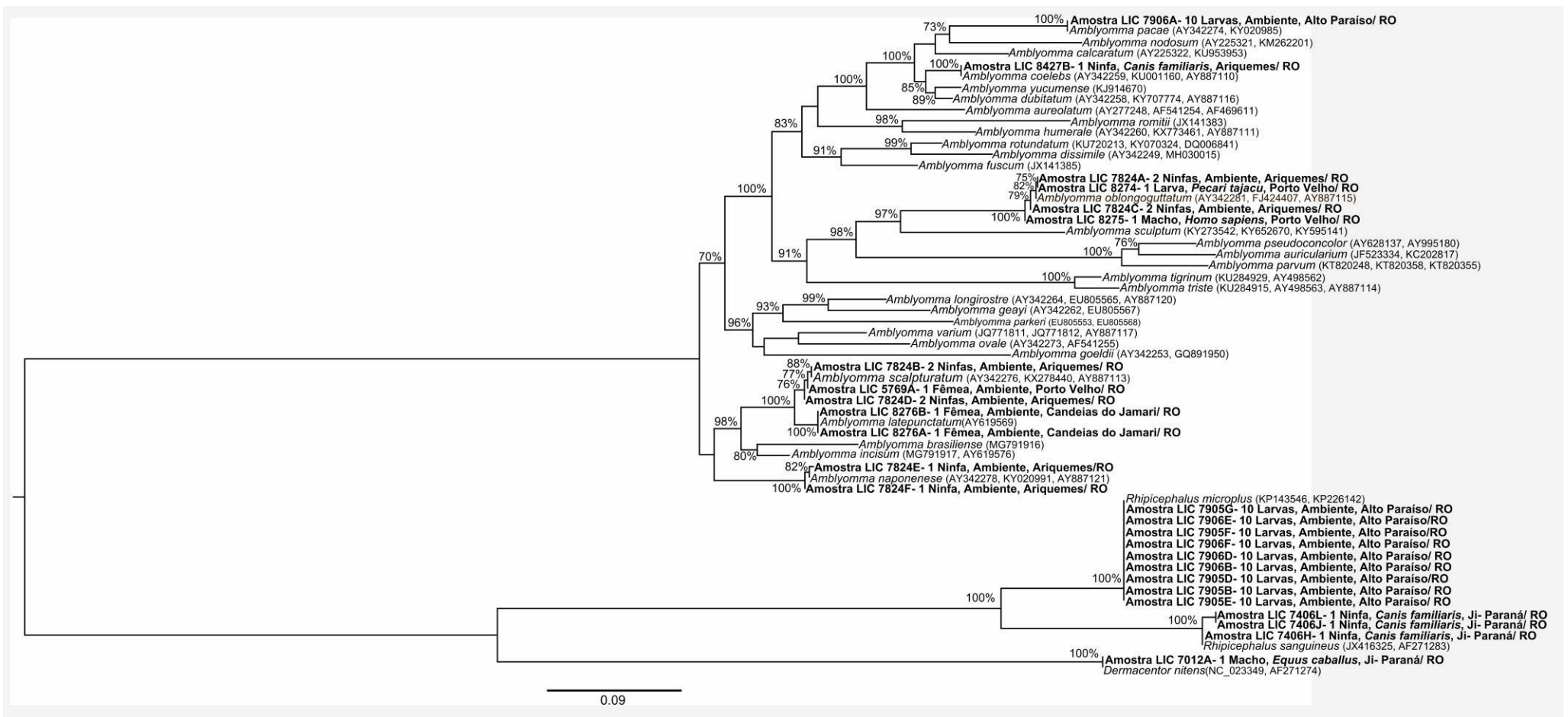
#### **4.2 Pesquisa, identificação e reconstrução filogenética das riquetsias detectadas nos carrapatos e pulgas em Rondônia**

Das 720 alíquotas (707 de carrapatos e 13 de pulgas) submetidas à pesquisa de riquetsias, foi detectada a presença de fragmento do gene *ompA* em três alíquotas (todas compostas por uma ninfa cada) de *R. sanguineus s.l.* que parasitavam *Canis familiaris* LINNAEUS, 1758 no município de Ji-Paraná. Essas amostras (LIC 7406H, LIC 7406J e LIC 7406L) apresentaram 99% de similaridade com amostras de *Candidatus Rickettsia andeanae* depositadas no “GenBank” (Tabela 6).

**Tabela 5.** Dados das amostras de carrapatos coletadas em Rondônia/ Brasil que foram submetidas à identificação molecular através do BLASTN (“Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide”).

Amostra analisada		Identificação Molecular utilizando o BLASTN para pesquisar no "GenBank"				
Amostras LIC	Nº de depósito "GenBank"	Gene	Espécie identificada	Identidade	Procedência da sequência	Número de acesso
7905B	MK031685	12S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (364/364)	Texas/ EUA Mato Grosso do Sul/ Brasil Cambodia	KP143546 KC503261 KC503260
7905D	MK031686	12S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (363/363)	Texas/ EUA Mato Grosso do Sul/ Brasil Cambodia	KP143546 KC503261 KC503260
7905E	MK031687	12S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (362/362)	Texas/ EUA Mato Grosso do Sul/ Brasil Cambodia	KP143546 KC503261 KC503260
7905F	MK031688	12S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (385/385)	Texas/ EUA Mato Grosso do Sul/ Brasil Cambodia	KP143546 KC503261 KC503260
7905G	MK031689	12S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (385/385)	Texas/ EUA Mato Grosso do Sul/ Brasil Cambodia	KP143546 KC503261 KC503260
5769A	MK031690	12S rDNA	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	98% (314/319)	Equador	AY342276
7406H	MK031691	12S rDNA	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	100% (379/379)	China	JX416325
7012	MK031693	12S rDNA	<i>Dermacentor nitens</i>	100% (357/357)	Mato Grosso do Sul/ Brasil	KC503258
7406L	MK031692	12S rDNA	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	99% (338/342)	França	KY676843
8276A	MK030076	ITS2	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	100% (930/930)	Rondônia/ Brasil	AY619569
8276B	MK030077	ITS2	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	100% (929/929)	Rondônia/ Brasil	AY619569
7824A	MK030074	ITS2	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	99% (972/974)	Monte Negro, Rondônia/ Brasil	AY887115
7824B	MK030075	ITS2	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	99% (937/938)	Monte Negro, Rondônia/ Brasil	AY887113
8274	MG783327	ITS2	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	99% (949/951)	Monte Negro, Rondônia/ Brasil	AY887115
7824E	MK030023	16S rDNA	<i>Amblyomma naponense</i>	99% (429/430)	Acre/ Brasil	KY020991
7824F	MK030024	16S rDNA	<i>Amblyomma naponense</i>	99% (426/427)	Acre/ Brasil	KY020991
7824C	MK030025	16S rDNA	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	99% (390/391)	São Paulo/ Brasil	FJ424407
7824D	MK030026	16S rDNA	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	99% (378/379)	Amazonas/ Brasil	KX278440
5769A	MK030019	16S rDNA	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	100% (379/379)	Amazonas/ Brasil	KX278440
8427B	MK030027	16S rDNA	<i>Amblyomma coelebs</i>	100% (410/410)	Belize	KU001160
7906A	MK030028	16S rDNA	<i>Amblyomma pacaе</i>	100% (426/426)	Acre/ Brasil	KY020985
7906F	MK030032	16S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (453/453)	Moçambique, Taiwan	EU918187, AY974232
7906E	MK030031	16S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (453/453)	Moçambique, Taiwan	EU918187, AY974232
7906B	MK030030	16S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (453/453)	Moçambique, Taiwan	EU918187, AY974232
7906D	MK030029	16S rDNA	<i>Rhipicephalus microplus</i>	100% (453/453)	Moçambique, Taiwan	EU918187, AY974232
8275	MK030033	16S rDNA	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	99% (389/391)	São Paulo/ Brasil	FJ424407
7406H	MK030020	16S rDNA	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	100% (435/435)	Taiwan e Ilhas Kinmen	AY883868
7406J	MK030022	16S rDNA	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	100% (453/453)	Taiwan e Ilhas Kinmen	AY883868
7406L	MK030021	16S rDNA	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	100% (435/435)	Taiwan e Ilhas Kinmen	AY883868

BLASTN- "Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide"



**Figura 3.** Filogenia concatenada, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo GTR+G, de seqüências parciais dos genes mitocondriais 12S rDNA, 16S rDNA e do marcador nuclear Segundo Espaçoador Interno Transcrito (ITS2) (338 + 357 + 1100 pb, respectivo) de carrapatos Ixodidae coletados em Rondônia (RO) durante vigilância e/ ou investigação de casos de Febre Maculosa. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% “cut-off”).

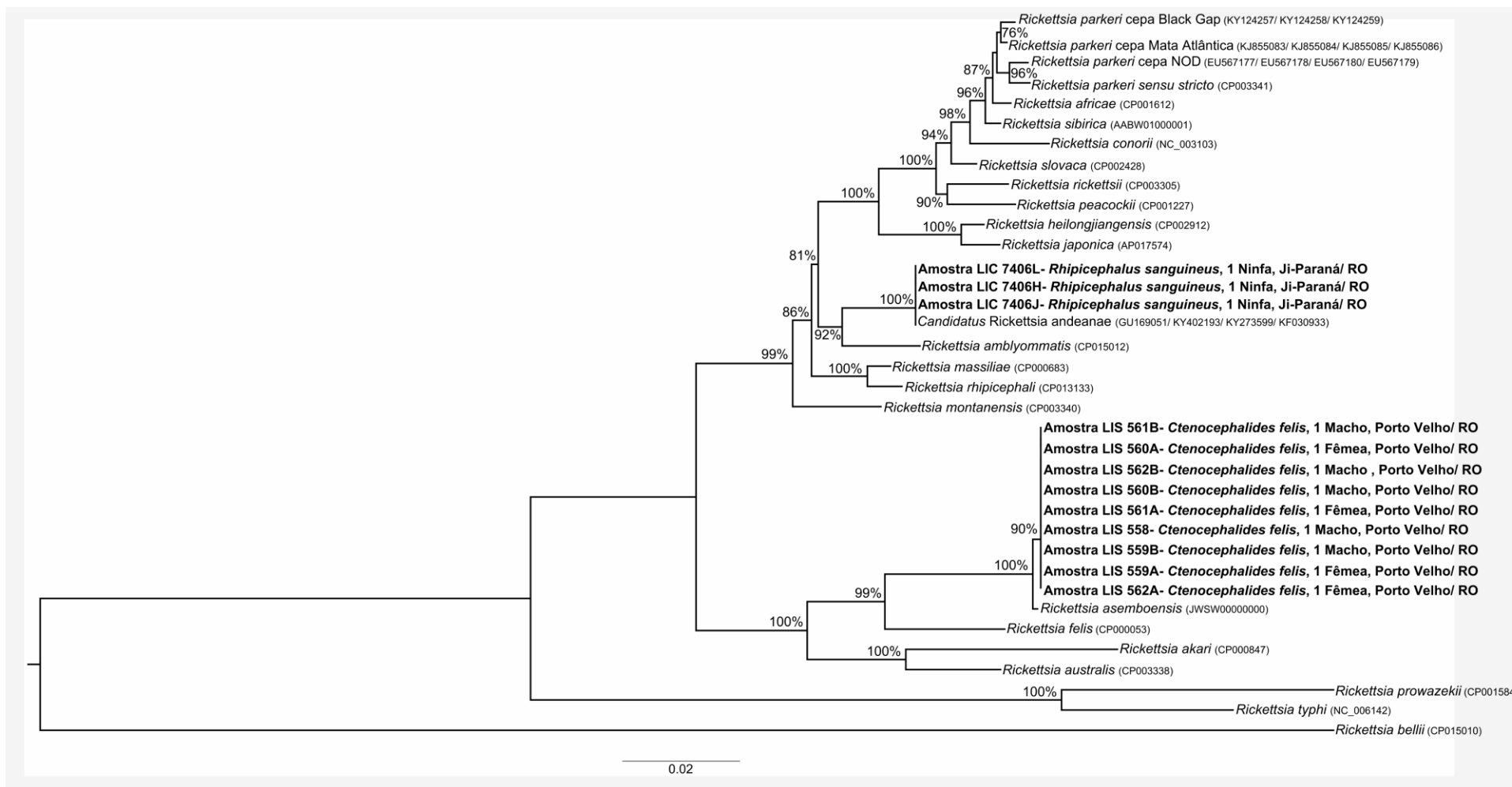
**Tabela 6.** Dados das amostras de carrapatos e pulgas coletadas em Rondônia/ Brasil que amplificaram fragmentos de genes de riquetsias e a identificação molecular dessas riquetsias através do BLASTN (“Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide”).

Amostra analisada		Identificação Molecular utilizando o BLASTN para pesquisar no "GenBank"				
Amostras LIC/ LIS	Nº de depósito "GenBank"	Gene	Espécie identificada	Identidade	Procedência da sequência	Número de acesso
7406H	MK031673	omp A	<i>Candidatus Rickettsia andeanae</i>	100% (488/488)	Goiás, Ceará/ Brasil	KY273599, KT153046
7406J	MK031674	omp A	<i>Candidatus Rickettsia andeanae</i>	100% (488/488)	Goiás, Ceará/ Brasil	KY273599, KT153046
7406L	MK031675	omp A	<i>Candidatus Rickettsia andeanae</i>	100% (394/394)	Goiás, Ceará/ Brasil	KY273599, KT153046
558	MK031664	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (407/407)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
559A	MK031665	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (409/409)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
559B	MK031666	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (411/411)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
560A	MK031667	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (410/410)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
560B	MK031668	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (409/409)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
561A	MK031669	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (410/410)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
561B	MK031670	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (410/410)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
562A	MK031671	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (410/410)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
562B	MK031672	htr A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (410/410)	Maranhão/ Brasil, Peru, EUA	KY445727-32, KY445735, KY445736, KY650696, AY953286
558	MK031676	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (772/772)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KU597066
559A	MK031677	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (786/786)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KU597066
559B	MK031678	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (786/786)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KU597066
560A	MK031679	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (762/762)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KY445741, KY445742, KU597066
560B	MK031680	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (769/769)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KU597066
561A	MK031681	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (772/772)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KU597066
561B	MK031682	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (763/763)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KY445741, KY445742, KU597066
562A	MK031683	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (786/786)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KU597066
562B	MK031684	omp B	<i>Rickettsia asemoensis</i>	100% (769/769)	Maranhão/ Brasil, EUA	KY445737, KU597066
558	MK031655	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697
559A	MK031656	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697
559B	MK031657	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697
560A	MK031658	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697
560B	MK031659	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697
561A	MK031660	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697
561B	MK031661	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697
562A	MK031662	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697
562B	MK031663	glt A	<i>Rickettsia asemoensis</i>	99% (1094/1095)	Rio Grande do Sul/ Brasil, Peru	KX196267, KY650697



Em nove amostras de *C. felis* (LIS 558, LIS 559A, LIS 559B, LIS 560A, LIS 560B, LIS 561A, LIS 561B, LIS 562A e LIS 562B) coletadas no município de Porto Velho infestando seu hospedeiro mais comum- *C. familiaris*, foram amplificados fragmento dos genes *gltA*, *ompB* e *htrA*. Essas amostras exibiram 99-100% de similaridade com sequências de *R. asemboensis* depositadas no “GenBank” (Tabela 6).

A reconstrução filogenética das sequências de riquetsias detectadas nas amostras de *R. sanguineus s.l.* e de *C. felis* corroborou a identificação molecular dessas bactérias através do BLASTN. As riquetsias detectadas nos carrapatos ficaram no mesmo clado de *Ca. R. andeanae*, e as identificadas nas pulgas agruparam com sequências de *R. asemboensis* do “GenBank”. Todos os clados citados apresentaram 100% de apoio estatístico (Figura 4).



**Figura 4.** Filogenia concatenada, de fragmento dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB* de riquetsias (1098 + 407 + 494 + 803 pb, respectivo) detectados nos carrapatos e pulgas estudados durante vigilância e/ ou investigação de casos de Febre Maculosa em Rondônia (RO), inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo GTR+G. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% “cut-off”).

## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo traz os primeiros registros de riquétsias em pulgas em áreas de interesse epidemiológico para FM em Rondônia, bem como a detecção de *R. asemboensis* e *Ca. R. andeanae* pela primeira vez para região norte do Brasil. Com relação a fauna de carrapatos, é a primeira identificação das seguintes espécies de ixodídeos nos municípios de Rondônia: *A. coelebs* em Ariquemes; *A. dissimile* em Cacoal; *A. dubitatum* em Alto Paraíso; *A. longirostre* em Alta Floresta D'Oeste; *A. naponense* em Porto Velho; *A. pacae* em Alto Paraíso; *D. nitens* em Alto Paraíso, Ariquemes, Cacoal, Ji-Paraná, Porto Velho e Ouro Preto do Oeste; *R. microplus* em Alto Paraíso e Porto Velho; e *R. sanguineus s.l.* em Alto Paraíso, Ariquemes, Cacoal, Ji-Paraná e Porto Velho. Adicionalmente, durante as investigações de potenciais vetores de bioagentes da FM em áreas com casos confirmados e/ ou suspeitos da doença, foi coletado o ácaro *T. turki* (até então sem relevância para os ciclos da FM) em roedor (*Euryoryzomys* sp.), que também configura o primeiro relato desse ectoparasito para o estado.

No presente estudo alguns ixodídeos, como o *A. naponense*, *A. coelebs*, *A. pacae*, *A. scalpturatum* e *A. oblongoguttatum*, tiveram somente o diagnóstico específico conclusivo através da metodologia molecular. Evidenciando a importância dessa ferramenta na diagnose específica para estádios imaturos e espécies de carrapatos que ainda não são bem caracterizadas morfológicamente.

Pesquisas anteriores já destacaram que o estado de Rondônia apresenta grande diversidade de carrapatos (LABRUNA et al., 2002; LABRUNA et al., 2004a,b; LABRUNA et al., 2005a,b; LABRUNA et al., 2010; MARTINS et al., 2014; AGUIRRE et al., 2018; ZIMMERMANN et al., 2018), o que pode estar associado a presença da Floresta Amazônica- e sua grande biodiversidade- em seu território. Entretanto, Rondônia é o terceiro estado com os maiores índices de desmatamento e degradação da Floresta Amazônica brasileira (INPE, 2018). Assim sendo, a perda de habitat na região pode levar a extinção de animais vertebrados e conseqüentemente de seus parasitos, incluindo os carrapatos (COLWELL et al., 2012), bem como o aumento de outros vertebrados (e seus carrapatos) que têm preferência por áreas degradadas. Esse cenário de grande diversidade específica de carrapatos, em um único estado, atrelado ao aumento das alterações ambientais (e.g. desmatamento, agronegócio e ocupação humana) faz de Rondônia um local potencial para ocorrência de doenças associadas a carrapatos (MARTINS et al., 2014).

Até o momento, foram registradas cerca de 28 espécies de ixodídeos em Rondônia (MARTINS et al., 2014; MARTINS et al., 2016; AGUIRRE et al., 2018). A

presente investigação identificou 14 espécies de carrapatos da família Ixodidae (correspondendo a 50% da fauna de ixodídeos conhecida para o estado) em nove municípios analisados durante investigação e/ ou vigilância de casos de FM em Rondônia. O fato da maior quantidade de exemplares coletados corresponderem a larvas pode está relacionado com o período e tipo de coleta, onde provavelmente o estágio mais abundante era esse. Essa variedade da fauna de carrapatos evidencia a complexidade para o entendimento do cenário relacionado à FM em Rondônia. Adicionalmente, as espécies que são reconhecidas no Brasil como principais vetores dos agentes da FM não são relatadas como tão abundantes (*e.g.* *A. sculptum*, *A. ovale* e *A. dubitatum*) ou ainda não foram identificadas (*A. aureolatum*) em Rondônia, principalmente nos locais com casos suspeitos ou confirmados de FM (LABRUNA et al., 2002; LABRUNA et al., 2004b; MARTINS et al., 2014; AGUIRRE et al., 2018; ZIMMERMANN et al., 2018).

Entretanto, é crescente o registro de *A. dubitatum* em diferentes municípios do estado (Ariquemes, Jaru e Alto Paraíso) (MARTINS et al., 2014; ZIMMERMANN et al., 2018), sugerindo que esse ixodídeo pode estar estabelecido em Rondônia, ou ainda, que a presença dessa espécie está associada a crescente substituição da Floresta Amazônica por vegetação característica do bioma Cerrado, devido ao intenso desmatamento na região (MARTINS et al., 2014; INPE, 2018).

Para entendimento do ciclo epidêmico da FM é fundamental conhecer as espécies de potenciais vetores ápteros que parasitam humanos. Na presente investigação, apenas um exemplar de macho de *A. oblongoguttatum*, no município de Porto Velho, foi coletado em interação trófica com humano. Estudos anteriores já relataram *A. cajennense* s. l., *A. coelebs*, *A. naponense*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. scalpturatum*, *Haemaphysalis juxtakochi* COOLEY, 1946 e *R. microplus* parasitando humanos no estado. Dessas espécies, *A. ovale*, *A. scalpturatum* e *A. oblongoguttatum* são as encontradas em maior frequência em humanos em Rondônia (LABRUNA et al., 2004b; LABRUNA et al., 2005a). Esse cenário difere do relatado para outros locais do país, onde outras espécies são mais frequentemente descritas infestando humanos (GUGLIELMONE et al., 2006; SZABÓ et al., 2013; RECK et al., 2018). Assim sendo, é possível que o cenário do ciclo epidêmico da FM em Rondônia seja distinto do que ocorre em outros locais do Brasil, com outras espécies de carrapatos envolvidas no ciclo de transmissão.

Durante estudo sorológico em cães do município de Monte Negro, os pesquisadores destacaram que esse hospedeiro era frequentemente observado infestado pela pulga *C. felis*, entretanto esses ectoparasitos não foram testados para a presença de

riquétsia (LABRUNA et al., 2007). Não há outros estudos relacionados a pulgas nesse estado. Dessa forma, o presente trabalho caracteriza a primeira investigação da fauna de pulgas e da presença de riquétsias nesses insetos em áreas de interesse epidemiológico para FM em Rondônia. Sendo, por Tanto, o primeiro relato de *Polygenis* sp. e *X. cheopis* para o estado. Todos os exemplares identificados de *C. felis* e *Polygenis* sp. foram coletados em *C. familiaris*, demonstrando a estreita relação parasitária entre esses animais. E ainda, por essas pulgas parasitarem um vertebrado doméstico, evidencia a possibilidade de contato desse ectoparasito e seus patógenos com o homem (PAROLA et al., 2005). Já *X. cheopis* foi encontrada no ambiente de pasto. Entretanto essa pulga tem como principal hospedeiro o rato doméstico. Na epidemiologia da FM, esse inseto se destaca por ser vetor de *R. typhi*, bioagente do tifo murino, cuja transmissão acontece através das fezes da pulga infectada (MARCONDES, 2001). O encontro dessa pulga indica a presença do rato doméstico no ambiente analisado, sendo necessárias medidas de higienização local para combate a esse vertebrado e seus ectoparasitos potenciais vetores de bioagentes de doenças em humanos.

Estudos prévios no estado de Rondônia demonstraram que diversos pacientes, residentes em áreas rurais do estado, relatavam febre de causa desconhecida. Entretanto, muitos deles descreviam histórico recente de picada de carrapato. Dessa forma, especulou-se que esse quadro poderia estar associado à riquétsias transmitidas por ectoparasitos aos quais esses indivíduos foram expostos (LABRUNA et al., 2004b; LABRUNA et al., 2007). Porém, nenhuma doença febril exantemática aguda mortal foi observada por médicos na área, excluindo a possibilidade de casos relacionados com *R. rickettsii* no estado (OLIVEIRA et al., 2016a,b).

A identificação de riquétsias em Rondônia começou em 2004, com a detecção de *Rickettsia* cepa ARANHA (geneticamente relacionada com *Rickettsia amblyommatis*) em *A. longirostre* no município de Ariquemes (LABRUNA et al., 2004a). Em seguida, *R. amblyommatis* foi relatada infectando *A. cajennense s.l.* e *A. coelebs*, nos municípios de Governador Jorge Teixeira e Monte Negro, respectivamente (LABRUNA et al., 2004b). Ainda nesse último município, estudo posterior identificou *Rickettsia rhipicephali* em *H. juxtakochi* (LABRUNA et al., 2005b). Entretanto, estudos publicados até 2005, indicavam que a *R. bellii* era a riquétsia mais frequentemente registrada infectando carrapatos (*A. ovale*, *A. scalpturatum*, *A. oblongoguttatum*, *Amblyomma rotundatum* KOCH, 1844 e *Amblyomma humerale* KOCH, 1844) em Rondônia (LABRUNA et al., 2004b). De acordo com esses estudos, poderia ser presumido que a exposição potencial de humanos à riquétsias patogênicas (e. g. *R. rickettsii*), transmitidas por carrapatos na

floresta Amazônica de Rondônia, poderia ser minimizada pela alta taxa de infecção com *R. bellii* nos três carrapatos mais antropofílicos dessa região (*A. ovale*, *A. sculpturatum* e *A. oblongoguttatum*) (LABRUNA et al., 2004b).

Adicionalmente, estudo sorológico em cães do município de Monte Negro indicou a circulação de *R. amblyommatis* e *R. rhipicephalii*, já identificadas por biologia molecular em carrapatos no município, porém, foi detectada a circulação de *Rickettsia parkeri sensu lato (s.l.)* em cães sem a identificação prévia dessa bactéria em ectoparasitos do município (LABRUNA et al., 2007). Como os cães em Monte Negro são comumente infestados pelas mesmas espécies de carrapatos que parasitam humanos, eles poderiam atuar como animais sentinelas para os bioagentes da FM em humano.

Posteriormente a esses estudos, não houve novos relatos de riquetsias em Rondônia até a confirmação do primeiro caso de FM, no município de Ariquemes, em 2015 (OLIVEIRA et al., 2016a,b). Em seguida, em 2016, casos da doença também foram confirmados nos municípios de Alvorada D'Oeste e Porto Velho. Em todos esses casos não houve a identificação dos bioagentes da FM em humanos.

Estudo mais recente, não identificou a presença de riquetsias nos carrapatos coletados nos municípios com casos confirmados de FM. Entretanto, foi detectada infecção por *R. amblyommatis* em larvas, ninfas e macho de *A. cajennense s. l.* (nos municípios de Cacoal e Vilhena), em macho de *A. oblongoguttatum* (no município de Pimenta Bueno) e em fêmea de *A. cajennense sensu stricto (s.s.)* (FABRICIUS, 1787) (também no município de Pimenta Bueno) (AGUIRRE et al., 2018). Adicionalmente, dois espécimes de *A. oblongoguttatum*, do município de Candeias do Jamari, apresentaram resultado positivo para riquetsia do GFM (gene *ompA*), no entanto, as amostras não tiveram êxito no sequenciamento do DNA. Ainda nesse estudo, foi relatado *A. oblongoguttatum* e *A. ovale* parasitando cães no município de Candeias do Jamari (AGUIRRE et al., 2018). O que é relevante, já que os cães podem desempenhar um papel importante no ciclo zoonótico das riquetsioses, como hospedeiro amplificador de riquetsias e ainda podem fazer o intercâmbio entre a fauna de carrapatos de animais silvestre para o domicílio, onde o parasitismo humano por esses ectoparasitos pode ocorrer (LABRUNA et al., 2007; MELO et al., 2011).

No presente trabalho, a análise de ectoparasitos provenientes de vigilância de ambiente e/ ou investigação de caso de FM, identificou pela primeira vez a *R. asemboensis* em *C. felis* no município de Porto Velho (município com caso confirmado de FM), e *Ca. R. andeanae* em *R. sanguineus s.l.* (coletado em cães) no município de Ji-Paraná (sem caso confirmado de FM) em Rondônia. Demonstrando um potencial cenário

epidemiológico da FM envolvendo a pulga, carrapato, cães e riquetsias do GFM e Grupo Transicional em Rondônia, o qual ainda não havia sido proposto para a região.

A *R. asemboensis*, recentemente descrita, foi relatada pela primeira vez em sifonápteros da espécie *C. felis* em Asembo no Quênia, situação em que foi isolada e cultivada *in vitro* (LUCE-FEDROW et al., 2015). É uma bactéria emergente transmitida por carrapatos e pulgas associados a animais domésticos e roedores. Esse patógeno já foi descrito em ectoparasitos na Ásia, África e nas Américas (JIANG et al., 2013; OTEO et al., 2014; RZOTKIEWICZ et al., 2015; BILLETER et al., 2016; DALL'AGNOL et al., 2017; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2016; KOLO et al., 2016; TROYO et al., 2016; SILVA et al., 2017), sendo encontrado principalmente em áreas endêmicas para FM associada a pulgas (JIANG et al., 2013). A *R. asemboensis* é geneticamente relacionada à *R. felis*, que é patogênica para humanos (RAOULT et al., 2001). Entretanto, o entendimento da FM relacionado à *R. felis* é escasso no Brasil (SZABÓ et al., 2013). Em nosso país os registros de *R. asemboensis* são recentes, com relatos em *R. sanguineus s.l.* (no Rio Grande do Sul) e em *C. felis* (no Maranhão) (DALL'AGNOL et al., 2017; SILVA et al., 2017). A pulga *C. felis* pode se alimentar ocasionalmente em humanos, porém, ainda não há comprovação da transmissão de *R. asemboensis* através desse ectoparasito para o homem (MAINA et al., 2012; JIANG et al., 2013). Além da possível vetoração de patógenos, as pulgas também podem provocar alergia à picada no hospedeiro (SOUSA, 1997). Das espécies de pulgas identificadas em Rondônia, a *C. felis* é incriminada como vetor de *R. felis* e *R. asemboensis*. Foi identificada a presença de *R. asemboensis* no estado, em nove amostras de *C. felis* coletadas durante vigilância de ambiente para FM em área com caso confirmado da doença. O presente estudo aumenta a área geográfica de ocorrência de *R. asemboensis* no Brasil.

A bactéria *Ca. R. andeanae*, apesar de pertencer ao GFM, é considerada de patogenicidade desconhecida, até então, para humanos. Entretanto, estudo demonstrou que essa riquetsia pode provocar a diminuição ou exclusão da riquetsiose associada a *R. parkeri s.s.* nos EUA (PADDOCK et al., 2015). O que torna *Ca. R. andeanae* de interesse para a prática em saúde pública. No Brasil, essa riquetsia já foi encontrada em *Amblyomma parvum* ARAGÃO, 1908 nos biomas Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica e na transição Amazônia- Cerrado (e. g. PACHECO et al., 2007; SOUSA et al., 2009; NIERI-BASTOS et al., 2014; COSTA et al., 2015; MOERBECK et al., 2016), além de identificação em *A. sculptum* no Cerrado (WITTER et al., 2016; BITENCOURTH et al., 2017). Há registros de *Ca. R. andeanae* em diversos países, como Argentina, Canadá, Chile, EUA, Paraguai e Peru, em diferentes espécies de carrapatos (e. g. *A. maculatum*, *A.*

*ovale*, *A. parvum*, *A. tigrinum*, *A. triste*, *Ixodes boliviensis* NEUMANN, 1904 e *R. sanguineus s.l.*), demonstrando a ampla distribuição dessa riquetsia em diferentes ecótopos (JIANG et al., 2005; ABARCA et al., 2012; OGRZEWALSKA et al., 2014; WOOD et al., 2016; ALLERDICE et al., 2017; SEBASTIAN et al., 2017; MONJE et al., 2018; RIVERA-PAEZ et al., 2018). Registros prévios de *Ca. R. andeanae* em *R. sanguineus s.l.* foram feitos para Peru e Colômbia, nesse último país também foi relatada em área de Floresta Amazônica assim como no presente estudo (FLORES-MENDOZA et al., 2013; RIVERA-PAEZ et al., 2018). A detecção de *R. sanguineus s.l.*, coletado em cão durante vigilância de ambiente para FM em Ji-Paraná/ Rondônia, infectado com *Ca. R. andeanae* configura o primeiro registro dessa riquetsia nesse ixodídeo para o Brasil.

O encontro de espécies de bactérias do GFM e do Grupo Transicional, cuja patogenicidade ainda não é conhecida para humanos, em *R. sanguineus s.l.* e *C. felis* coletados em cães evidencia a relevância desse vertebrado na manutenção de ciclos enzoóticos dessas riquetsias. E ainda, sabendo que esses ectoparasitos têm preferência por animais domésticos, o que possibilita maior contato desses potenciais vetores (e os bioagentes que veiculam) com os seres humanos (OLIVEIRA et al., 2008; ROZENTAL et al., 2009). Apesar da ausência de conhecimento relacionado à patogenicidade de *Ca. R. andeanae* e *R. asemboensis* para humanos, o potencial dessas riquetsias estarem associadas com casos de FM não pode ser descartado, visto que riquetsias inicialmente ditas como de patogenicidade desconhecida posteriormente foram reconhecidas como bioagentes de riquetsioses em humanos (e. g. *R. parkeri s.l.*) (PADDOCK et al., 2004; PAROLA et al., 2013). Porém, mais estudos são necessários para entender a participação de *R. asemboensis* e *Ca. R. andeanae* no cenário da FM em Rondônia, bem como conhecer a prevalência dessas bactérias, entender o envolvimento de *C. felis*, *R. sanguineus s.l.* e cães nessas infecções e na transmissão dessas riquetsias, além de esclarecer a relação entre esses microorganismos e os casos de FM no Brasil.

As investigações sobre riquetsias em Rondônia, posteriores a confirmação dos casos de FM, não detectaram *R. bellii* nos ectoparasitos. Essa riquetsia era apontada como a mais prevalente nos carrapatos do estado anteriormente a confirmação de caso da doença (LABRUNA et al., 2004b). Estudos apontam que a *R. bellii* pode ter importante papel na ecoepidemiologia das riquetsioses, através da inibição da infecção por outras riquetsias patogênicas quando o carrapato está previamente infectado com *R. bellii* (BURDDORFER et al., 1981; MACALUSO et al., 2002; PACHECO et al., 2009). Cenário esse que poderia estar ocorrendo em Rondônia, já que quando era relatada prevalência de *R. bellii* nos ectoparasitos não havia casos confirmados de FM.



Até o momento não houve registro das espécies do complexo *A. cajennense* nos municípios com casos confirmados de FM em Rondônia, o que sugere que outras espécies de carrapatos estão envolvidas no ciclo de transmissão dessa doença no estado (AGUIRRE et al., 2018). O comportamento dos cães de entrarem na mata e retornarem ao domicílio infestados, realizando o intercâmbio entre a fauna de carrapatos de animais silvestres e domésticos, pode propiciar o parasitismo humano por ectoparasitos que ocorrem nesses vertebrados (SZABÓ et al., 2013). O histórico de detecção de carrapatos e pulgas de cães infectados com riquetsias do GFM e do Grupo Transicional evidencia o importante papel que esse hospedeiro pode exercer na manutenção dos ciclos de riquetsias e, potencialmente, nos casos de FM. Os resultados sobre ectoparasitos e infecções por riquetsias em Rondônia contribuem com informações para auxiliar no entendimento da dinâmica de circulação dessas bactérias e na identificação dos seus potenciais vetores no estado. Entretanto, mais estudos são necessários para verificar a existência de cenários epidemiológicos da FM específicos para a região Amazônica do país que diferem dos relatados para as áreas de Mata Atlântica e Pampa no Brasil.

## 6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- Há diversidade de ectoparasitos potenciais vetores nos municípios estudados para o estado de Rondônia.
- A ixofauna de Rondônia em área de interesse epidemiológico para FM é composta de pelo menos 14 espécies. Em ordem decrescente de abundância *R. sanguineus s.l.*, *R. microplus*, *D. nitens*, *A. pacaе*, *A. oblongogutatum*, *A. naponense*, *A. scalpturatum*, *A. latepunctatum*, *A. calcaratum*, *A. dissimile*, *A. dubitatum*, *A. coelebs*, *A. longirostre* e *A. ovale*.
- Espécimes de *A. naponense*, *A. coelebs*, *A. pacaе*, *A. scalpturatum* e *A. oblongogutatum* só tiveram o diagnóstico específico conclusivo através das análises moleculares.
- Estádios imaturos de carrapatos foram os mais encontrados nos municípios estudados de Rondônia.
- As espécies *A. coelebs* (Ariquemes), *A. dissimile* (Cacoal), *A. dubitatum* (Alto Paraíso), *A. longirostre* (Alta Floresta D'Oeste), *A. naponense* (Porto Velho), *A. pacaе* (Alto Paraíso), *D. nitens* (Alto Paraíso, Ariquemes, Cacoal, Ji-Paraná, Porto Velho e Ouro Preto do Oeste), *R. microplus* (Alto Paraíso e Porto Velho) e *R. sanguineus s.l.* (Alto Paraíso, Ariquemes, Cacoal, Ji-Paraná e Porto Velho) foram identificadas pela primeira vez nos municípios de Rondônia.
- A diversidade de pulgas foi de pelo menos três espécies: *C. felis*, *Polygenis* sp. e *X. cheopis*, sendo as duas últimas assinaladas pela primeira vez no estado de Rondônia.
- Foram identificadas, pela primeira vez em Rondônia, a presença de *R. asemboensis* em *C. felis* e *Ca. R. andeanae* em *R. sanguineus s.l.*, sendo esse último o primeiro registro também para o Brasil. Caracterizando que há circulação de riquetsia do GFM (*Ca. R. andeanae*) e do Grupo Transicional (*R. asemboensis*) no estado.
- Mais estudos são necessários para o entendimento do cenário da FM que ocorre em Rondônia.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABARCA, K. et al. A Third *Amblyomma* species and the first tick-borne *Rickettsia* in Chile. **Journal of Medical Entomology**, v.49, n.1, p.219-222, 2012.

AGUIRRE, A.A.R. et al. New Records of Tick-associated Spotted Fever Group *Rickettsia* in an Amazon-Savannah Ecotone, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.9, n.4, p.1038-1044, 2018.

ALJANABI, S.M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of High Quality Genomic DNA for PCR- based Techniques. **Nucleic Acids Research**, v.25, n.22, p.4692- 4693, 1997.

ALLERDICE, M.E.J. et al. *Rickettsia parkeri* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Detected in Ticks of the *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) Group Collected from Multiple Locations in Southern Arizona. **Journal of Medical Entomology**, v.54, n.6, p.1743-1749, 2017.

ANGERAMI, R.N. et al. Features of Brazilian Spotted Fever in Two Different Endemic Areas in Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v.3 n.5-6, p.346-348, 2012.

ANISIMOVA, M.; GASCUEL, L. O. Approximate Likelihood-ratio Test for Branches: a Fast, Accurate, and Powerful Alternative. **Systematic Biology**, v.55, p.539-552, 2006.

AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M. Descrição Morfológica do Estádio de Larva de Carrapato (Acari: Ixodidae) 1. *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844. **Parasitologia Al Dia**, v.19, n.1-2, p.09-19, 1995.

AMORIM, M. et al. Morphological Description of Tick Larval Stage (Acari: Ixodidae). 5. *Anocentor nitens* (Neumann.1897). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.6, p.143-156, 1997.

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

BARROS-SILVA P. M. R. et al. Occupational risk of Spotted Fever: an Evaluation of Knowledge, Attitudes and Prevention Practices Among Veterinary Medicine Students. **Revista Patology Tropical**, p.389-397, 2014.

BICHO, C.L.; RIBEIRO, P.B. Chave Pictórica para as Principais Espécies de Siphonaptera de Importância Médica e Veterinária, no Brasil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.7, n.1, p.47-51, 1998.

BILLETER, S.A. et al. Detection of *Rickettsia* Species in Fleas Collected From Cats in Regions Endemic and Nonendemic for Flea-borne Rickettsioses in California. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.16, n.3, p.151-6, 2016.

BILLIGS, A.N. et al. Detection of a Spotted Fever Group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**, v.4, n.35, p. 474-478, 1998.

BITENCOURTH, K. et al. *Amblyomma sculptum*: Genetic Diversity and Rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. **Medical Veterinary Entomology**, v.31 n.4 p.427-437, 2017.

BROUQUI, P.F. et al. Guidelines for the Diagnosis of Tick-borne Bacterial Diseases in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.1108-1132, 2004.

BROWN, L.D.; MACALUSO, K.R. *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-borne Rickettsiosis. **Current Tropical Medicine Reports**, v.3, p.27-39, 2016.

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

BURGDORFER, W.; HAYES, S.F.; THOMAS, L.A. A new spotted fever group *Rickettsia* From the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum*. In *Rickettsiae and rickettsial Diseases*, Edited by Burgdorfer, W.; Anacker, R.L. **New York: academic Press Inc**, p. 595-602, 1981.

BURGER T.D. et al., Molecular Phylogeny of Soft Ticks (Ixodida: Argasidae) Inferred from Mitochondrial Genome and Nuclear rRNA Sequences. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, p.195-207, 2014.

CARDOSO, L.D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. Circulante em Foco Silencioso de Febre Maculosa Brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.22, n.3, p.495-501, 2006.

COLWELL, R.K. A. Models and Estimators Linking Individual-based and Sample-based Rarefaction, Extrapolation, and Comparison of Assemblages, **Journal of Plant Ecology**, v.5, p.3-21, 2012.

CONTI-DÍAS, E.A. et al. Rickettsiosis Cutaneo-ganglionar por *Rickettsia conorii* em el Uruguay. **Revista do Instituto de medicina tropical**, v 32, n5, p 313-318, 1990.

COSTA, A.P.D. et al. A Serological and Molecular Survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. Among Dogs in the State of Maranhão, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.24, n.1, p. 28-35, 2015.

DALL' AGNOL, B. et al. "Candidatus *Rickettsia aseboensis*" in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks, Brazil, **Acta Tropica**, v.167, p.18-20, 2017.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. The Ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v.14, n.1, p. 30-46, 2009.

EREMEEVA, M.E.; DASCH, G.A. **Rickettsiae**, In J. Lederberg (ed.), Vol. 4 Encyclopedia of Microbiology., Academic Press, New York, p.140-179, 2000.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A. et al. Molecular Evidence of Different *Rickettsia* Species in Villeta, Colombia. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.16, n.2, p.85-87, 2016.

FANG, R.; BLANTON, L.S.; WALKER, D.H. Rickettsiae as Emerging Infectious Agents. **Clinics in Laboratory Medicine**, v.37,n.2, p.383- 400, 2017.

FLORES –MENDOZA, C. et al. Detection of *Rickettsia parkeri* From Within Piura Peru. And the First Reported Presence Of 'Candidatus' *Rickettsia andeanae*' in the Tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.13, n.7, p.505-508, 2013.

GILLESPIE, J.J. et al. *Rickettsia* Phylogenomics: Unwinding the Intricacies of Obligate Intracellular Life. **Plos One**, v.3, n.4, p.1-34, 2008.

GIMENEZ, D.F. Staining Rickettsiae in Yolk-Sac Cultures. **Stain Technology**, v. 39, n.3, p.135-140, 1964.

GOUY, M.; GUINDON, S.; GASCUEL, O. Sea View Version 4: a Multiplatform Graphical user Interface for Sequence Alignment and Phylogenetic tree Building. **Molecular Biology and Evolution**, v.27, n.2, p.221-224, 2010.

GREENE , C.E.; BRETHERDT, E.B. **Rocky Mountain Spotted Fever, Murine Typhuslike Disease, Rickettsial pox, Typhus, and Q Fever.** In C.E. Greene (Ed.), *Infectious diseases of the dog and cat.*, Philadelphia: Saunders, 3rd ed. p. 232-245, 2006.

GUGLIELMONE, A.A. et al. Ticks (Ixodidae) on Humans in South America. **Experimental Applied Acarology**, v.40,n.2, p.83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A.A. et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (ACARI: IXODIDA) of the World: a List of Valid Species Names. **VETERINARY TROPICAL DISEASES**, p. 1-28, 2010.

GUINDON, S. et al. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. **Systematic Biology**, v.59, n.3, p.307- 21, 2010.

**Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE**, 2018  
<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/ro/panorama>.

**Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE**, 2018  
[http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod\\_Noticia=4778](http://www.inpe.br/noticias/noticia.php?Cod_Noticia=4778)

JIANG, J. et al. Detection of High-affinity and Sliding Clamp Modes For MSH2-MSH6by Single-Molecule **Unzipping Force Analysis Molecular Cell**, v. 20 n.5, p.771-781, 2005.

JIANG, J. et al. Molecular Detection of *Rickettsia felis* and Candidatus *Rickettsia asemboensis* in fleas From Human Habitats, Asembo, Kenya. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.13, n.8, p.550-8, 2013.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The Global Importance of Ticks. **Parasitology**, v.129 (Suppl.), v.129, n.1, p.3-14, 2004.

KOLO, A.O. et al. Molecular Detection of Zoonotic Rickettsiae and *Anaplasma* spp. in Domestic Dogs and Their Ectoparasites in Bushbuckridge, South Africa. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v.16, n.4, p.245-52, 2016.

LABRUNA, M.B. et al. Seasonal Dynamics of Ticks (Acari: Ixodidae) on Horses in the State of São Paulo, Brasil. **Veterinary Parasitology, Amsterdam**, v.105, n.1, p.65-77, 2002.

LABRUNA, M.B. et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia, Western Amazon. Brazil. **Journal Medical Entomology**, v.41, n.6, p.1073-1081, 2004a.

LABRUNA, M.B. et al. *Rickettsia* species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks From an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever is Endemic. **Journal Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.90-98, 2004b.

LABRUNA, M.B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) From the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v.10, n.1, p.17-32, 2005.

LABRUNA, A M.B. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v 7, n 2, 2007.

LABRUNA, M.B. et al. New Reports of *Antricola guielmonei* and *Antricola delacruzi* in Brazil, and a Description of a New Argasid Species (Acari). **Journal of Parasitology**, v.94, n. 4, p. 788-792, 2008.

LABRUNA, M.B. et al. New Tick Records in Rondônia, Western Brazilian Amazon **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, Jaboticabal, v. 19, n. 3, p. 192-194, 2010.

LABRUNA, M.B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista Medicina Veterinaria Zootecnia Córdoba**, v.16, n.2, p.2435–2457, 2011.

LINARDI, P.M.; GUIMARÃES, L.R. **Sifonápteros do Brasil**. Museu de Zoologia da USP, São Paulo, 2000.

LINARDI, P.M. Checklist de Siphonaptera ( Insecta) do Estado de São Paulo. **Biota neotropica** (Edição em Português. Oline), v.11,n.1, Campinas, 2011.

LUCE-FEDROW, A. et al. Isolation of *candidatus Rickettsia asemboenis* From *ctenoccephalides* Fleas. **Vetor Borne Zoonotic Diseases**, v. 15, p.268-277, 2015.

MACALUSO, K.R. Rickettsial Infection In *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Inhibits Transovarial Transmission of a Second Rickettsia. **Journal of Medical Entomology**, v.39, n.6, p.809-813, 2002.

- MAINA, A.N. *Rickettsia felis* Infection in Febrile Patients, Western Kenya, 2007-2010. **Emerging infectious diseases**, v.18, n.2, p. 328-231, 2012.
- MARCONDES, C.B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, p.432, 2001.
- MARTINS, T.F. et al. Nymphs of the Genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions, Redescriptions, and Identification Key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75-99, 2010.
- MARTINS, T.F. et al. Morphological Description of the Nymphal Stage of *Amblyomma geayi*, and New Nymphal Records of *Amblyomma parkeri*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.4, p.81-184, 2013.
- MARTINS, T.F. et al. New Tick Records From the State of Rondônia Western Amazon, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.62, n.1, p.121-128, 2014.
- MARTINS, T.F. et al. Geographical Distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) Ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, With Description of the Nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). **Parasites and Vectors**, v.9, p.186-99, 2016a.
- MELO, G.L.J. et al. Small-mammal Community Structure in South American Deciduous Atlantic Forest. **Community Ecology**, v.12, p.58-66, 2011.
- MINISTERIO DA SAÚDE, Brasil. **Sistema de Informação de Agravos de Notificação para Febre Maculosa** [acesso em 30 de out de 2018a]. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/febremaculosabr.def>
- MINISTERIO DA SAÚDE, Brasil. **Febre Maculosa: situação epidemiológica** [acesso em 31 de out de 2018b]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febremaculosa/situacao-epidemiologica>
- MOERBECK, L. et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) vector biodiversity in high altitude Atlantic forest fragments within a semiarid climate: a new endemic area of spotted-fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.53, n.6, p.1458-66, 2016.
- MONJE, A. et al. Diagnostic Accuracy of the Implant Stability Quotient in Monitoring Progressive Peri-implant Bone Loss: an Experimental Study in Dogs. **Clinical Oral Implants**, v. 29, n.10, p. 1016-1024, 2018.



NIERI-BASTOS, F.A. et al. Candidatus *Rickettsia andeanae*, a Spotted Fever Group Agent Infecting *Amblyomma parvum* Ticks in Two Brazilian Biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.109, n. 2, p.259-261, 2014.

OGRZEWALSKA, M. et al. Rickettsial Infections in Ticks From Wild Birds in Paraguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.5, n.2, p.83-89, 2014.

OLIVEIRA, K.A. et al. Molecular Identification of *Rickettsia felis* in Ticks and Flea From an Endemic Area for Brazilian Spotted Fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.2, p.191-194, 2008.

OLIVEIRA, L.S.V. et al. An Update on the Epidemiological Situation of Spotted Fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v.22, n.22, p.1-8, 2016.

OTEO, J.A. et al. VENZAL JM ABRACA K. Guías Latinoamericanas de la Riicer para el diagnóstico de las Rickettsiosis Transmitidas por Garrapatas. **Revista Chilena infectologia**, v.31, p.54-65, 2014.

PACHECO, R.C. et al. Detection of a Novel Spotted Fever Goup *Rickettsia* In *Amblyomma parvum* Ticks (Acari: Ixodidae) From Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v.43, n.1, p. 63-71, 2007.

PACHECO, R.C. et al. Pesquisa de *Rickettsia* spp em Carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v.42, n.3, p.351-353, 2009.

PADDOCK, C.D. et al. *Rickettsia parkeri*: a Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v.15, n.6, p.805-811, 2004.

PAROLA, P. et al. Update on Tick-borne Rickettsioses Around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v.26, n.4, p.657-702, 2013.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. Tick-borne Rickettsioses Around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.4, p.719-756, 2005.

PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture From the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1078, p.523-530, 2006.

RAOULT, D. et al. A Flea-associated *Rickettsia* Pathogenic for Humans. **Journal Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.1, p.73-81, 2001.

RAOULT, D.; PAROLA, P.; PADDOCK, C.D. Tick-bourne Rickettsioses Around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **American Society Microbiology**, v.18, n.4, p.719-756, 2005.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n.4, p.694-719, 1997.

RECK, J. et al. Records of Ticks on Humans in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.9, n.5, p.1296-1301, 2018.

RIPOLL, C.M. et al. Evidence of Rickettsial Spotter fever and Ehrlichial Infections in a Subtropical Territory of Jujuy, Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.61, n. 2, p.50-345, 1999.

RIVIERA- PÁEZ, F.A. Contribuições Para o Conhecimento de Carrapatos duros. (Acari: Ixodidae) na Colombia. **Tick borne diseases**, v.9, p.57-66, 2018.

ROMER, Y. et al. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis in Different Ecological Regions of Argentina and its Association With *Amblyomma tigrinum* as a Potential Vector. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.91, n.6, p.1156-1160, 2014.

ROUX, V. et al. Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic Analysis, and its Application for the Tickettsiae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.147, p.252-261, 1997.

ROUX, V.; RAOUL, T.D. Phylogenetic Analysis of Members of the Genus *Rickettsia* Using the Gene Encoding the Outer Membrane Protein rOmpB (ompB). **International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology**, v.50, n.4, p.1449-1455, 2000.

ROZENTAL T. et al. *Rickettsia* sp. Infection in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks in a Brazilian Spotted Fever Endemic Rural Area in Rio de Janeiro State Brazil. **Clinical Microbiology Infection**, v.15,n.2, p.245-246, 2009.

RZOTKIEWICZ, S. et al. Novel Evidence Suggests That a '*Rickettsia felis*-like' Organism is an Endosymbiont of the Desert Flea, *Xenopsylla ramesis*. **Molecular Ecology**, v.24, n.6, p.1364-73, 2015.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1-3, p.2344, 2001.

SEBASTIAN, D.; PALACIN, M.; ZORZANO, A. Mitochondrial Dynamics: Coupling Mitochondrial Fitness With healthy Aging, Trends. **Molecular Medicine**, v.23, n.3, p.201- 215, 2017.

SERRA-FREIRE, N M.; MELLO, R.P. Acari e Crustácea, Capítulo 3, in **Entomologia & acarologia na Medicina Veterinária**, p.31-84, 2006.

SILVA, A.B. et al. First Report of a *Rickettsia asembonensis* Related Infecting Fleas in Brazil. **Acta Tropica**, v.566, n.172, p.44-9, 2017.

SILVA, N. et al. Eschar-associated Spotted Fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.2, p.275-8, 2011.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO - SINAN, 2018. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/febremaculosaro.def> . acessado em 16 de novembro de 2018.

SOLIDORIO, M.G, et al. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, n.3, p.521-523, 2010.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. New York: Oxford University Press, v.84, n.4, p.590-591, 1993.

SOUSA, C.A. Fleas, Flea Allergy, and Flea Control: a Review. **Dermatology Online Journal**, v.3, n.2, 1997.

SOUZA, C.E. et al. Experimental Infection of Capybaras *Hydrochaeris hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology** , v.161, p.116-21, 2009.

STOTHARD, D.R.; CLARK, J.B.; FUERST, P.A. Ancestral Divergence of *Rickettsia bellii* From the Spotted Fever and Typhus Groups of *Rickettsia* and Antiquity of the Genus *Rickettsia*. **Intonal Journal Systematic Bacteriology**, v.44, n.4, p.798-804, 1994.

SZABÓ, M.P.; PINTER, J.A.; LABRUNA, M.B. Ecology, Biology and Distribution of Spotted-fever Tick Vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.27, n.3, p.1-9, 2013.

TAMURA, K. et al. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology Evolution**, v.30,n.12, p.2725-2729, 2013.

THOMPSON, J.; HIGGINS, D.; GIBSON, T. CLUSTAL W: Improving the Sensitivity of Progressive Multiple Sequence Alignment Through Sequence Weighting, Position-Specific Gap Penalties and Weight Matrix Choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p.4673-4690, 1994.

TROYO, A. et al. Detection of rickettsiae in Fleas and Ticks From Areas of Costa Rica With History of Spotted Fever Group Rickettsioses. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, n.6, p.1128-1134, 2016.

WALKER, D. H.; RAOULT, D. *Rickettsia rickettsii* and Other Spotted Fever Group rickettsiae (Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever). In: Mendel GL, Bennett JE, Dolin R. Mandell, Douglas, and Bennett's. **Principles and practices of infectious diseases**, Churchill Livingstone, Philadelphia, 2005.

WECK, B. et al. Spotted Fever Group Rickettsia in the Pampa Biome, Brazil, 2015-2016. **Emerging Infectious Diseases**, v.22, n.11, p.2014, 2016.

Wintter, R. et al. Infecção por Rickettsioses em Carrapatos de Animais Silvestres no Centro-oeste. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, p.415- 423, 2016.

WOO, D. C. et al. MYC activation and BCL2L11 silencing by a tumour virus through the large-scale reconfiguration of enhancer-promoter hubs. Vol. 5, p.182-70, 2016.

YU, X. J. WALKER, D.H. **The Order Rickettsiales**. in: DWORKIN, M. The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community. New York: Springer- Velag, 3 ed., 2003.

ZIMMERMANN, N.P. et al. Wildlife Species, Ixodidae Fauna and New Host Records for Ticks in an Amazon Forest Area, Rondônia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, Jaboticabal, v. 27, n. 2, p. 177-182, 2018.