

**UFRRJ  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**DISSERTAÇÃO**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Rickettsia* spp.  
EM CARRAPATOS (ACARI: IXODIDAE)  
PARASITANDO HUMANOS, ANIMAIS  
DOMÉSTICOS E SILVESTRES CIRCULANTES DE  
ÁREAS PERTENCENTES A ACADEMIA DAS  
AGULHAS NEGRAS, RESENDE, RJ, BRASIL**

**Isadora dos Santos Dias**

**2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
VETERINÁRIAS**

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Rickettsia* spp. EM  
CARRAPATOS (ACARI: IXODIDAE) PARASITANDO  
HUMANOS, ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES  
CIRCULANTES DE ÁREAS PERTENCENTES A ACADEMIA DAS  
AGULHAS NEGRAS, RESENDE, RJ, BRASIL**

**ISADORA DOS SANTOS DIAS**

*Sob a orientação do Professor Doutor*  
**Adivaldo Henrique da Fonseca**

*E coorientação de*  
**Matheus Dias Cordeiro**  
**Bruna de Azevedo Baêta**

Dissertação submetida como requisito  
parcial para obtenção do grau de **Mestre**  
**em Ciências Veterinárias**, no  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de  
2023

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D536d      Dias, Isadora dos Santos, 1998-  
              DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE *Rickettsia* spp. EM  
CARRAPATOS (ACARI: IXODIDAE) PARASITANDO HUMANOS,  
ANIMAIS DOMÉSTICOS E SILVESTRES CIRCULANTES DE ÁREAS  
PERTENCENTES A ACADEMIA DAS AGULHAS NEGRAS, RESENDE,  
RJ, BRASIL / Isadora dos Santos Dias. - Juiz de Fora,  
2023.  
              51 f.

              Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.  
              Coorientador: Matheus Dias Cordeiro.  
              Coorientadora: Bruna de Azevedo Baêta.  
              Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em  
Ciências Veterinárias, 2023.

              1. *Rickettsia* sp.. 2. bactérias. 3. sentinelas. 4.  
*Hydrochoerus hydrochaeris*. I. Fonseca, Adivaldo  
Henrique da, 1953-, orient. II. Cordeiro, Matheus  
Dias, 1983-, coorient. III. Baêta, Bruna de Azevedo,  
1984-, coorient. IV Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências  
Veterinárias. V. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA N° 4366/2024 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

N° do Protocolo: 23083.052056/2024-58

Seropédica-RJ, 24 de setembro de 2024.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ISADORA DOS SANTOS DIAS

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestra** em Ciências,  
no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 01/03/2023

*(Assinado digitalmente em 24/09/2024 10:54)*

ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA  
PROFESSOR DO MAGISTÉRIO SUPERIOR  
DESP (12.28.01.00.00.00.52)  
Matrícula: 0005597

*(Assinado digitalmente em 02/10/2024 21:31)*

RENATA FERNANDES FERREIRA DE MORAES  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 000.000.847-00

*(Assinado digitalmente em 25/09/2024 19:53)*

IZABELA MESQUITA ARAUJO  
ASSINANTE EXTERNO  
CPF: 000.000.642-00

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: 4366, ano: 2024,  
tipo: ATA, data de emissão: 24/09/2024 e o código de verificação: 9787aad2c0

Dedico à minha família, principalmente meus pais, Sandra e Jonas, por serem a minha base, razão e força. Seus esforços me motivaram e me proporcionaram chegar até aqui, onde nem eu mesma acreditava que era capaz de chegar um dia.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente à Deus, por proporcionar oportunidade de lutar pelos meus sonhos, e me tornar Médica Veterinária. À minha mãe Sandra, por sempre ter acreditado, impulsionado e incentivado cada passo da minha jornada. Ao meu pai Jonas por sempre ter cedido meios para me manter durante este período. À minha família no geral, pelo amor e apoio incondicionais.

Agradeço aos meus amigos presenciais, que sempre estiveram ao meu lado dando força, acolhimento e enfrentando obstáculos. Aos meus amigos virtuais por noites em claro acalmando, proporcionando momentos de muita diversão e transmitindo energia positiva durante todo o percurso.

Para finalizar, agradeço a toda família do Laboratório de Cultivo de Células e Hemoparasitos da UFRRJ, em especial aos meus amigos Jônathan Chagas, Maiara Vasconcelos, Gilliard Nascimento, Aline Furtado, Eduardo Sena, Olivia Zen e Ellen Meireles, pelo convívio diário, paciência, ajuda e amor. Ao meu orientador Adivaldo Fonseca por ter me aceito, meus co-orientadores Bruna Baêta e Matheus Cordeiro, pela paciência, orientações valiosas, carinho e principalmente por acreditarem em mim e no meu progresso como profissional.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## **BIOGRAFIA**

Isadora dos Santos Dias, filha de Jonas Luís dos Santos Dias e Sandra Coelho dos Santos nasceu a 10 de julho de 1998 no município de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais.

Finalizou os estudos no ensino médio no Colégio Santo Antônio - Três Rios/RJ em 2016, ingressando no ano seguinte no curso de Medicina Veterinária no início de 2017 na Universidade de Vassouras – Vassouras/RJ. Formada em 2021, passou aquele ano trabalhando na área de clínica de pequenos animais.

Em março de 2022, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, no nível de Mestrado e nesta data, apresenta e defende esta dissertação como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

## RESUMO

**DIAS, I.S. Diagnóstico molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos (Acari: Ixodidae) parasitando humanos, animais domésticos e silvestres circulantes de áreas pertencentes a Academia das Agulhas Negras, Resende, RJ, Brasil. 2023. 51p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.**

Inúmeras espécies de animais domésticos e silvestres atuam como reservatórios de hemoparasitos transmitidos por carrapatos, causando hemoparasitoses de grande importância para a saúde pública, como por exemplo, a Febre Maculosa Brasileira. Conhecida por causar febre alta e até a morte, esta doença é uma zoonose com distribuição mundial e é causada por bactérias do gênero *Rickettsia*, apresentando um complexo diagnóstico. A detecção do agente tem sido facilitada devido ao acesso às técnicas moleculares, como a reação em cadeia da polimerase (PCR). Os militares em treinamentos ou operações, em função das atividades frequentes e período de exposição prolongado, estão mais predispostos a infestações e sob maior risco de infecção por bactérias da família Rickettsiaceae. Logo, o objetivo do presente estudo foi realizar pesquisa molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos parasitando humanos, animais domésticos e silvestres circulantes de áreas pertencentes a Academia das Agulhas Negras, Resende, Rio de Janeiro, Brasil. Foram utilizadas uma amostragem de carrapatos infestando diferentes espécies de hospedeiros vertebrados (humanos, animais silvestres e domésticos) coletados e identificados por Prado (2022) durante os anos de 2019 a 2021. Uma amostragem aleatória estratificada de 494 carrapatos foi selecionada para ser testada molecularmente para a presença de *Rickettsia* spp. correspondendo a 52 amostras de carrapatos em animais domésticos, 375 amostras de carrapatos em animais silvestres e 67 amostras de carrapatos em militares. As amostras foram submetidas à extração de DNA, em seguida à uma amplificação prévia da sequência parcial do gene ITS-2 nuclear de carrapatos (família Ixodidae) para controle de qualidade da extração e PCR convencional para a detecção de DNA alvo correspondente ao gene *gltA* de *Rickettsia* spp. Uma amostra de *Amblyomma dubitatum* foi positiva durante as reações moleculares, amplificando o fragmento do gene *gltA* de *Rickettsia* spp.. A amostra correspondente pertence a uma capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Este achado revela que animais silvestres podem albergar agentes rickettsiais, e faz um alerta sobre animais como sentinelas e até mesmo para humanos que se encontram em áreas de vulnerabilidade. Sendo necessário aprofundamento do estudo, além da realização do sequenciamento.

**Palavras-chave:** *Rickettsia* sp., bactérias, sentinelas, *Hydrochoerus hydrochaeris*

## ABSTRACT

**DIAS, I. S. Molecular diagnosis of *Rickettsia* spp. in ticks parasitizing humans, domestic and wild animals circulating in areas belonging to Academia das Agulhas Negras, Resende, RJ, Brazil.** 2023. 51p. Dissertation (Master of Science). Graduate Program in Veterinary Sciences. Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

Numerous species of domestic and wild animals act as reservoirs of blood parasites transmitted by ticks, causing blood parasites of great importance to public health, such as Brazilian Spotted Fever. Known for causing high fever and even death, this disease is a zoonosis with worldwide distribution and is caused by bacteria of the genus *Rickettsia*, presenting a complex diagnosis. Detection of the agent has been facilitated due to access to molecular techniques, such as polymerase chain reaction (PCR). Military personnel undergoing training or operations, due to frequent activities and prolonged periods of exposure, are more predisposed to infestations and at greater risk of infection by bacteria from the Rickettsiaceae family. Therefore, the objective of the present study was to carry out molecular research on *Rickettsia* spp. in ticks parasitizing humans, domestic and wild animals circulating in areas belonging to Academia das Agulhas Negras, Resende, Rio de Janeiro, Brazil. We used a sampling of ticks infesting different species of vertebrate hosts (humans, wild and domestic animals) collected and identified by Prado (2022) during the years 2019 to 2021. A stratified random sampling of 494 ticks was selected to be molecularly tested for the presence of *Rickettsia* spp. corresponding to 52 tick samples from domestic animals, 375 tick samples from wild animals and 67 tick samples from military personnel. The samples were subjected to DNA extraction, followed by prior amplification of the partial sequence of the nuclear ITS-2 gene of ticks (family Ixodidae) to control the quality of the extraction and conventional PCR for the detection of target DNA corresponding to the *gltA* gene of ticks. *Rickettsia* spp. A sample of *Amblyomma dubitatum* was positive during molecular reactions, amplifying the fragment of the *gltA* gene from *Rickettsia* spp.. The corresponding sample belongs to a capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*). This finding reveals that wild animals can harbor rickettsial agents, and raises awareness about animals as sentinels and even for humans who are in vulnerable areas. Further study is necessary, in addition to sequencing.

**Key words:** *Rickettsia* sp., bacteria, sentries, *Hydrochoerus hydrochaeris*.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Contagem e classificação de carrapatos coletados de diferentes espécies de animais domésticos na área militar. ....	12
<b>Tabela 2.</b> Contagem e classificação de carrapatos coletados de diferentes espécies de animais silvestres na área militar. ....	13
<b>Tabela 3.</b> Distribuição de carrapatos coletados de <i>Didelphis aurita</i> e <i>Euryoryzomys russatus</i> para análise molecular. ....	13
<b>Tabela 4.</b> Distribuição das Amostras de Carrapatos em Catetos ( <i>Dicotyles tajacu</i> ). ....	14
<b>Tabela 5.</b> Análise Molecular de Carrapatos em Militares. ....	14

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação dos produtos da PCR para o gene ITS-2 (400pb), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DStain nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1: ladder . Poço 2-28: amostras positivas. Poço 30: controle negativo.....17

**Figura 2.** Produtos de PCR de fragmento de gene *gltA* (aproximadamente 834 pb) de *Rickettsia* spp., aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Locus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb. Destacado em vermelho a amostra positiva de *A. dubitatum* oriunda de *Hydrochaeris hydrochaeris* e destacado em amarelo, controle positivo de *Rickettsia* sp.....18

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1	Febre Maculosa Brasileira .....	2
2.1.1	Aspectos ocupacionais.....	2
2.1.1.1	Academia das Agulhas Negras (AMAN) .....	3
2.2	Gênero <i>Rickettsia</i> .....	4
2.2.1	Vetores de riquétsias no Brasil .....	5
2.2.2	Diagnóstico de riquétsias.....	6
2.2.3	Animais domésticos como sentinelas de riquétsias .....	7
2.2.4	Animais silvestres como amplificadores de riquétsias .....	9
3.1	Descrição da área do estudo.....	11
3.2	Amostragem de carrapatos.....	11
3.3	Carrapatos separados para análise molecular encontrados em animais domésticos .....	12
3.4	Carrapatos separados para análise molecular encontrados em animais silvestres capturados na área militar .....	13
3.5	Carrapatos separados para análise molecular encontrados em animais silvestres capturados em armadilhas .....	13
3.5.1	Carrapatos encontrados em pequenos mamíferos .....	13
3.5.2	Carrapatos encontrados em catetos.....	14
3.6	Carrapatos separados para análise molecular encontrados em militares.....	14
3.7	Extração de DNA.....	14
3.8	Análise molecular.....	15
4	RESULTADOS .....	17
5	DISCUSSÃO .....	19
6	CONCLUSÃO.....	22
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	23

## 1 INTRODUÇÃO

Algumas espécies de mamíferos são classificadas como sinantrópicas porque se adaptaram ao ambiente domiciliar devido às alterações causadas pelo homem em seus habitats naturais. Por outro lado, existem espécies sinantrópicas não-comensais, que são principalmente silvestres e tendem a formar colônias em áreas distantes do contato direto com o homem, adaptando-se a ambientes menos perturbados pela atividade humana (MATIAS et al., 2002), estando sujeitas a diferentes pressões ecológicas e parasitárias em comparação com espécies sinantrópicas que vivem em ambientes urbanos, com uma probabilidade maior de serem infestadas por carrapatos (GUGLIELMONE et al., 2010).

Dentre os artrópodes carreadores de hemoparasitos, os carrapatos (classe Arachnida, subclasse Acari e ordem Ixodida) são agentes de extrema relevância, pois necessitam, obrigatoriamente, de sangue para seu desenvolvimento em, pelo menos, um estágio de seu ciclo de vida. O longo período de íntima associação com seu hospedeiro os caracterizam como excelentes transmissores de muitos patógenos virais, bacterianos e parasitários (CHOMEL, 2001).

Os hemoparasitos transmitidos por artrópodes são agentes de grande importância dentro da Medicina Veterinária, assim como na Medicina Humana. A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é um exemplo de doença, conhecida por causar febre alta, com variações na gravidade, que na grande maioria das vezes se expande em caráter endêmico, é uma zoonose com distribuição mundial e é causada por bactérias da família Rickettsiaceae e gênero *Rickettsia*, conhecidas como *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e *Rickettsia parkeri*, com difícil diagnóstico (DANTAS-TORRES, 2007).

Os militares em treinamentos ou operações, em função do comportamento, atividades típicas que desenvolvem e tempo de exposição prolongado, muitas vezes em locais densamente infestados por carrapatos, estão mais predispostos a infestações e sob maior risco de infecção por diversas doenças vetoriadas por carrapatos (FAULDE et al., 2014; JIANG et al., 2015; KEBISEK et al., 2020).

Portanto, este trabalho tem como objetivo realizar a pesquisa molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos parasitando humanos, animais domésticos e silvestres circulantes de áreas pertencentes a Academia das Agulhas Negras, Resende, Rio de Janeiro, Brasil.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Febre Maculosa Brasileira

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é considerada a principal zoonose disseminada por carrapatos no Brasil, especialmente por carrapatos da família Ixodidae, do gênero *Amblyomma* spp., esses carrapatos atuam como vetores do agente patogênico causador da doença, facilitando a transmissão vertical da bactéria através das vias transovariana, transestadial e interestadial (MENDER et al., 2019; COSTA et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020).

A mesma atinge praticamente todos os tipos de animais vertebrados, englobando os seres humanos. Sendo uma problemática comum dentro da saúde pública, visto que é uma doença com caráter reemergente e emergente, apresentando altos índices de morbidade e mortalidade, em virtude do seu potencial zoonótico (LABRUNA; OGRZEWALSKA, 2012). Pode apresentar sintomas inespecíficos ou graves. Sendo descrita com presença de febre alta, erupções avermelhadas na pele, dores de cabeça, dores musculares, vermelhidão ocular, vômitos, diarreia, sinais neurológicos e dor abdominal, com altas taxa de letalidade em humanos. O mesmo acaba agindo como hospedeiro acidental na cadeia epidemiológica da zoonose (SOUZA et al., 2015; MENDER et al., 2019).

Os sintomas ainda podem ser observados em mamíferos e aves silvestres, havendo variações na gravidade da doença. Animais domésticos e silvestres são correlacionados como significativos reservatórios, hospedeiros intermediários e amplificadores. É importante destacar capivaras, gambás e equinos na cadeia epidemiológica da doença, pois além de levarem os vetores a regiões de alta disseminação, apresentam função grandiosa na validação da virulência do agente (JOANNITTI et al., 2014; ARAÚJO et al., 2019).

#### 2.1.1 Aspectos ocupacionais

A FMB é relatada como uma zoonose encontrada em ambientes rurais e silvestres, ademais áreas periurbanas e urbanas vêm sendo apontadas com registros de novos casos, esse fator pode ser justificado através do aumento no número de humanos residindo em moradias próximas a regiões com predomínio de matas e pequenas florestas (SOUZA et al., 2020).

A doença é caracterizada com maior porcentagem de casos localizados e descritos nas regiões Sudeste e Sul, onde de modo geral acontece de forma esporádica. Atinge principalmente a população economicamente ativa (20 – 49 anos), com maior destaque para os homens, tal fator pode ser explicado através da exposição que os mesmos sofrem a carrapatos, animais domésticos e silvestres, muita das vezes, pela localização de seus serviços em ambientes de matas, rios, riachos, cachoeiras ou lagos (ARAÚJO et al., 2016; BRASIL, 2019b).

Importante destacar que 10% dos registros da doença são em crianças menores de 9 anos de idade, tal fator pode ser justificado pela estreita relação com animais domésticos, como o cão (possível hospedeiro da FMB), no peridomicílio e maior contato com o solo, tornam-se um grupo vulnerável (ARAÚJO et al., 2016; BRASIL, 2019b).

Quanto à sazonalidade, conclui-se que a época com maior caso de incidência é outubro, período onde ninfas de *Amblyomma sculptum* apresentam maior distribuição, podendo mudar de local para local (OGRZEWALSKA; LABRUNA, 2009). A zoonose é relatada em regiões como: São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Santa Catarina, Paraná, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Goiás, Ceará e Mato Grosso do Sul. *Rickettsia rickettsii* destaca-se como principal agente etiológico, por gerar casos letais, embora existam outras espécies de riquetsias interligadas à enfermidade (SZABÓ et al., 2013b; ARAÚJO et al., 2016).

### 2.1.1.1 Academia das Agulhas Negras (AMAN)

O Exército Brasileiro apresenta como principal objetivo a garantia da soberania nacional, dos poderes constitucionais, da lei e da ordem, salvaguardando os interesses nacionais e cooperando com o desenvolvimento nacional e o bem-estar social. Logo, a Força Terrestre deve ser adestrada, mantendo-se em permanente estado de prontidão (BRASIL, 2022).

Militares fazem parte do grupo principal de profissionais que sofrem com o risco de adoecerem pela possível infecção de doenças transmitidas por vetores. O risco em questão é atribuído à maior exposição a animais reservatórios e aos vetores de agentes patogênicos enquanto realizam suas missões e operações (OLIVEIRA, 2016). As missões operativas, colaboram para situações de risco e exposição de patologias em regiões exclusivas. Casos de doenças transmitidas por vetores são diagnosticadas em militares que participam dessas missões (LORENZI, 2014).

O Brasil, país composto de uma variedade de biomas, tem demonstrado extensa porcentagem de casos de febre maculosa principalmente na região sul e sudeste do país, com altas taxas de letalidade, chegando a 85% (ARAÚJO et al., 2016); os militares são relacionados às características epidemiológicas dessa doença, sobretudo pelos locais que frequentam em suas missões e treinamentos, como matas, campos e rios, que acarretam na possibilidade de infestação por carrapatos, e pelo provável contato com animais silvestres, domésticos ou de emprego militar em tais ambientes (BRASIL, 2019a).

Estudos moleculares validam essas informações, comprovando a presença de carrapatos infectados com *Rickettsia* spp.. Uma pesquisa realizada em áreas de treinamento da Marinha do Brasil, no Rio de Janeiro, identificou *R. rickettsii* em carrapatos *A. cajennense*. A detecção dessas bactérias em carrapatos nessas áreas representa um risco significativo de transmissão para humanos, devido à alta virulência da *R. rickettsii* e à interação frequente entre os militares e o ambiente natural durante os treinamentos (CUNHA et al., 2018). Além disso, outros trabalhos também abordam a presença de *Rickettsia* spp. em regiões do Rio de Janeiro (CAMPOS et al., 2008; SILVEIRA, 2010).

Já pesquisas conduzidas em áreas de treinamento do Exército Brasileiro na região Amazônica encontraram *R. amblyommii* em carrapatos coletados de animais silvestres. Embora essa espécie de *Rickettsia* seja menos patogênica que *R. rickettsii*, ela ainda representa um potencial risco para a saúde humana e animal nas áreas de treinamento militar, devido à sua capacidade de infectar diversos hospedeiros vertebrados (OLIVEIRA et al., 2013).

Em áreas de treinamento militar no estado de São Paulo, foram identificados carrapatos *A. dubitatum* infectados com *R. bellii*. Apesar de ser considerada de baixa patogenicidade para humanos, a presença dessa espécie em áreas militares destaca a diversidade de patógenos riquetsiais nessas regiões e a importância de uma vigilância constante (ANGERAMI et al., 2012b).

A Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN), localizada na região sudeste do Rio de Janeiro, mais especificamente no município de Resende, é a instituição de ensino superior responsável pela formação dos oficiais combatentes de carreira do Exército Brasileiro. Sua missão é a formação ética e moral dos Cadetes, no intuito de entregar ao Exército oficiais que se destaquem pela integridade, honradez, honestidade, lealdade, senso de justiça, disciplina, patriotismo e camaradagem. Servindo à Nação Brasileira para defender a Pátria.

De frente com as informações apresentadas, agentes zoonóticos transmitidos por carrapatos simbolizam um risco ocupacional para os militares durante suas atividades no Brasil, comprovando a importância de profissionais que proporcionem cuidados necessários para esses militares, além de necessária formulação de estudos e pesquisas para informar tal grupo sobre riscos diários de infestação por esses artrópodes.

## 2.2 Gênero *Rickettsia*

Os membros do gênero *Rickettsia* (família Rickettsiaceae; ordem Rickettsiales) são microrganismos procarióticos, descritos como formas cocobacilares, pequenos bastonetes ou bacilos Gram-negativos. São agrupadas em pares, em cadeias ou isoladas. Com exclusão da *R. prowazekii*, causadora do tifo, não possuem flagelos. São encontradas nas glândulas salivares e ovários do artrópode hospedeiro (BILLINGS et al., 1998) e apresentam ampla distribuição, com inúmeras espécies dessa ordem ocasionando doenças no ser humano e em outros hospedeiros vertebrados e invertebrados (DUMLER et al., 2001).

Os primeiros casos de infecções por riquetsias datam do século 5 a.C em Atenas. Estudos mostram que *R. typhi*, causadora da doença tifo murino, pode ter sido a responsável por esses episódios. No século 16 d.C. ocorreram confirmação de casos do tifo na Europa e nos Estados Unidos onde após tal evento, novas alegações foram espalhadas por todo o mundo (SILVEIRA, 2006). O primeiro relato de febre maculosa procedeu na cidade de Idaho, EUA, em 1896 sendo que, em 1899, foram relatadas por Maxcy os primeiros sinais clínicos na literatura médica. Em 1907, Ricketts isolou o agente etiológico da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR). Seus estudos mostravam a similaridade dos agentes responsáveis da FMMR e do tifo exantemático, passando o gênero, a partir de 1916, a ser chamado *Rickettsia* em sua homenagem (WEISS; STRAUSS, 1991).

Com o início da filogenética molecular a revolução da sistemática do gênero *Rickettsia* vem sendo cada vez maior. Em pesquisas realizadas por todo o mundo novas espécies vêm sendo descobertas. Desta forma, atualmente as espécies de *Rickettsia* patogênicas ou com potenciais patogênicos, estão distribuídas em diferentes grupos filogenéticos, tais como: Grupo da Febre Maculosa (GFM); Grupo Tifo (GT), Grupo Canadense (GC); Grupo de Transição (GTr) (PAROLA et al., 2013a; MERHEJ et al., 2014).

No GFM, *R. conorii*, é o agente etiológico da Febre Maculosa do Mediterrâneo; *R. rickettsii*, agente da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas e da Febre Maculosa Brasileira e *R. africae*, responsável pela Febre Africana por picada de carrapato, ainda assim existem outras espécies descritas como, *R. helvetica*, *R. montanensis*, *R. massiliae*, *R. japonica*, *R. peacockii* e *R. sibirica*. O GT, compreende às espécies *R. prowazekii* e *R. typhi*, respectivamente associadas a piolhos e pulgas. Já o GC, as espécies *R. canadenses* e *R. tarasevichiae*. E o GTr envolvendo a *R. australis*, *R. akari* e *R. felis*, disseminadas, nesta ordem, por pequenos ácaros e pulgas.

Ademais é possível observar que as bactérias do gênero *Rickettsia* apresentam outros cinco grandes clados divididos da seguinte forma: Hydra, que engloba riquetsia relacionada com protistas e outros hospedeiros não identificados; Torix contendo riquetsias presentes em amebas, sanguessugas e alguns artrópodes; Rhizobius em que as riquetsias parasitam três tipos de besouros; Malloidae que demonstra só um tipo de besouro; e Bellii que engloba 11 linhagens de artrópodes e a espécie *R. bellii* (WEINERT, 2009).

De maneira clássica, desde o início do século passado, *R. rickettsii* é identificada como causadora das altas porcentagens dos casos clínicos em humanos que não receberam tratamento (DIAS; MARTINS, 1939; ZAVALA-VELASQUEZ et al., 2000). Casos humanos de febre maculosa, causado por *R. felis*, foram notificados em outros locais além dos Estados Unidos, como por exemplo no México (ZAVALA-VELASQUEZ et al., 2000), Brasil, França (RAOULT et al., 2001), Alemanha (RICHTER et al., 2002), Itália e Tailândia (PAROLA et al., 2003).

Mediante informações de Paddock et al. (2004), a *R. parkeri*, no passado denominada como não patogênica, apresentou seu primeiro registro de infecção humana nos Estados Unidos em 2004, ano esse em que foi descoberta em artrópodes da espécie *A. triste* no Uruguai, logo ganhando a classificação de agente patogênico causador da doença naquele país (VENZAL et

al., 2004). Nos Estados Unidos, ultimamente, novos registros de riquetsioses causados por esta espécie, estão sendo noticiados em humanos (RAOULT; PADDOCK, 2005; FINLEY et al., 2006; SUMNER et al., 2007; WHITMAN et al., 2007).

*Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica foi identificada em carrapatos *A. aureolatum* coletados em áreas da mata atlântica no estado de São Paulo. Esta cepa tem sido associada a casos humanos de febre maculosa e representa uma preocupação significativa para a saúde pública na região (LABRUNA; OGRZEWSKA, 2012). Szabó et al. (2013b) relataram a presença da cepa *Rickettsia* sp. Mata Atlântica em áreas endêmicas da mata atlântica, com casos relatados em humanos que desenvolveram febre maculosa após picadas de carrapatos; estudos moleculares confirmam a presença dessa cepa em várias regiões do sudeste do Brasil.

*R. bellii* foi detectada em carrapatos *A. dubitatum* em áreas de mata ciliar no estado de São Paulo. Embora seja considerada de baixa patogenicidade para humanos, a presença de *R. bellii* indica a diversidade de patógenos riquetsiais na região (ANGERAMI et al., 2012b). Pesquisas no Pantanal brasileiro identificaram *R. bellii* em carrapatos coletados de capivaras e outros animais silvestres. Embora não esteja associada a casos graves em humanos, a presença de *R. bellii* na fauna local demonstra sua ampla distribuição no Brasil (PACHECO et al., 2011b).

### **2.2.1 Vetores de riquetsias no Brasil**

O gênero *Amblyomma* apresenta, por volta, de 139 espécies descritas, sendo 32 destas achadas no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2019). Muitas espécies de *Amblyomma* apresentam baixa especificidade, especialmente nas fases imaturas, parasitando uma ampla variedade de animais silvestres e até mesmo seres humanos. No entanto, é comum encontrar esses carrapatos em equinos e, em menor escala, em bovinos e caninos (ARAGÃO; FONSECA, 1961; LABRUNA; OGRZEWSKA, 2012).

Esses carrapatos infectam-se com o agente patogênico ao ingerir sangue de animais silvestres infectados. Contudo, o agente não necessita apenas desse mecanismo, visto que existe a transmissão transovariana, sendo os artrópodes além de transmissores, reservatórios desses agentes no meio ambiente (BURGDORFER; VARNA, 1967; BALASHOV, 1984).

Monteiro e Fonseca (1932) descrevem a transmissão transovariana da riquetsia por fêmeas como transestadial entre todos os estágios da espécie *A. sculptum*, logo sendo uma grande influência para permanência da *R. rickettsii* no meio ambiente, possibilitando os artrópodes permanecerem infectados durante toda sua vida e também por inúmeras gerações após uma primeira infecção. Tanto o aparecimento como a superpopulação dessa espécie de carrapato (*A. sculptum*) está fortemente associada à presença de áreas com média a densa cobertura vegetal, onde muitos dos seus hospedeiros têm acesso (equinos, bovinos, canídeos), como exemplo pastos sujos, gramíneas e arbustos esparsos e matas (LABRUNA et al., 2001).

No Brasil, a *R. parkeri* cepa Mata Atlântica e a *R. rickettsii*, tem sido registrada acometendo humanos. Os carrapatos *A. sculptum* e *A. aureolatum* são os principais vetores da mais letal riquetsiose do mundo, a Febre Maculosa Brasileira ocasionada pela bactéria *R. rickettsii*, responsável pelos casos mais graves (ANGERAMI et al., 2009; BRASIL, 2019a). O carrapato *A. ovale* é o principal vetor da *R. parkeri*, causador da forma mais branda da doença (ANGERAMI et al., 2009; SZABÓ et al., 2013a; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018).

O carrapato *A. sculptum* é o principal vetor responsável pela porcentagem de casos de *R. rickettsii* na região Sudeste (LABRUNA, 2009; SZABÓ et al., 2013a), e também na região Centro-Oeste, contudo com distribuição reduzida nas demais regiões (LABRUNA et al., 2001). Já em áreas das regiões Sul e Sudeste, destaca-se o *A. aureolatum* o vetor principal dos casos de febre maculosa brasileira na região metropolitana de São Paulo, uma possível maior virulência está sendo associada a tal *Rickettsia*, mediante maiores relatos de letalidade.

Ademais, a associação de cães domésticos a doença é um fator que proporciona para o vetor facilidade na disseminação da *R. rickettsii* aos humanos, sendo uma justificativa para tal fato (LABRUNA et al., 2011; ANGERAMI et al., 2012a; SZABÓ et al., 2013a; SARAIVA et al., 2014).

Já *R. parkeri* cepa Mata Atlântica é descrita sendo transmitida pelo *A. ovale* (relatado em áreas de Mata Atlântica das regiões Sudeste, Sul e nordeste do Brasil) (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; DA PAIXÃO SEVÁ et al., 2019), ainda assim, existem relatos de que *A. aureolatum* também possa carrear o agente rickettsial no nosso país (SZABÓ et al., 2013a; BARBIERI et al., 2014). A forma branda da doença, é relatada com a formação de enxaquecas, dores musculares, temperaturas altas, “rash” cutâneo, linfadenopatia regional e escara de inoculação (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018).

Em relação a outros gêneros de carrapatos sendo vetores de riquetsioses no Brasil, podemos citar os: *Rhipicephalus*, *Ixodes* e *Dermacentor*.

*R. sanguineus*, conhecido como carrapato marrom do cão, é um vetor significativo de *R. rickettsii*. Estudos indicaram a presença da bactéria em carrapatos coletados de cães em estados como São Paulo e Minas Gerais, áreas reconhecidas pela endemia da doença (LABRUNA; SOUZA, 2006). Já *R. massiliae* foi identificada em carrapatos do gênero *Rhipicephalus* em regiões do Sudeste do Brasil, sugerindo a possibilidade de transmissão desse agente para seres humanos (HORTA et al., 2007).

A presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos do gênero *Ixodes* foi documentada em várias áreas do Brasil, especialmente na região Sul. Pesquisas mostraram a ocorrência de *R. parkeri* em *I. loricatus* encontrados em pequenos mamíferos (SILVA; FONSECA, 2012). Infecções por *Rickettsia* spp. foram detectadas em carrapatos *Ixodes* em áreas de Mata Atlântica no Sudeste do Brasil, o que sugere um papel importante desses carrapatos na disseminação local das riquetsioses (SABATINI et al., 2010a).

*D. nitens* é um vetor conhecido de *R. rickettsii* no Brasil. Pesquisas na região Sudeste, particularmente em Minas Gerais, confirmaram a presença da bactéria em populações de *D. nitens* (ANGERAMI; LEMOS, 2005). A detecção de *R. bellii* em carrapatos do gênero *Dermacentor* foi reportada na região norte do Brasil (Pará), expandindo o conhecimento sobre a diversidade de riquetsias associadas a esses vetores no país (PACHECO et al., 2011a).

### 2.2.2 Diagnóstico de riquetsias

O método sorológico é quase sempre a confirmação da doença rickettsial. Existem inúmeras opções de métodos de diagnóstico sorológico para rickettsias, dentre eles é possível citar teste Weil-Felix, imunofluorescência, fixação de complemento, testes de aglutinação, ELISA e imunoblot (LA SCOLA; RAOULT, 1997; KRAUSE et al., 2017). É a partir da segunda semana da doença que a comprovação sorológica pode ser realizada, quando são analisados em amostras pareadas. Sendo assim, é com frequência que o diagnóstico específico se encontra disponível após a recuperação ou óbito do paciente (LA SCOLA; RAOULT, 1997; DASH; EREMEEVA, 2006; VÁSQUEZ et al., 2019). Contudo, um exemplo de limitação na sorologia é a reação cruzada que em muitas das vezes existe entre os antígenos dos patógenos dentro de um mesmo gênero e, ocasionalmente em diferentes gêneros (PAROLA; RAOULT, 2001; PAROLA et al., 2013b).

O teste Weil-Felix apurado na detecção de anticorpos, baseia-se na aglutinação de cepas de *Proteus*, as quais possuem antígenos comuns às riquetsias, que consequentemente permitem a reação cruzada com organismos do gênero *Rickettsia*, apresentando assim, baixa sensibilidade e especificidade (LA SCOLA; RAOULT, 1997; ISAAC et al., 2004; KINNEY et al., 2017).

A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é considerada por muitos profissionais o padrão-ouro para diagnóstico, utilizada em laboratórios para diagnóstico de casos agudos,

estudos soroepidemiológicos e testes de triagem. Apresenta alta sensibilidade e relativa rapidez, contudo apresenta limitações de ser uma técnica subjetiva, propensa a erros de leitura por parte do profissional. A utilização de reagentes de boa qualidade e detalhes nos protocolos e equipamentos entre diferentes laboratórios e operadores pode causar discordância nos resultados (LA SCOLA; RAOULT, 1997; DASH; EREMEEVA, 2006; HARRUS et al., 2020; PEREIRA et al., 2022).

Outras técnicas laboratoriais vêm sendo inseridas e utilizadas, como imunohistoquímica, isolamento em cultivo de células e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (LA SCOLA; RAOULT, 1997). O isolamento a partir do cultivo é o método de diagnóstico mais confiável, apesar disso necessita de laboratórios com estrutura de biossegurança para manterem de forma ideal o material biológico, como os animais e linhagens de células (PAROLA et al., 2005). Permite o aumento substancial na quantidade de riquetsias e levam ao alcance de amplas quantidades das bactérias, propiciando seu uso em outras técnicas laboratoriais, como a confecção de antígenos para utilização em técnicas de diagnóstico indireto (NIGG; LANDSTEINER, 1932; LABRUNA, 2006a). A técnica “Shell vial” (frasco de concha) é citada como o padrão ouro para isolamento e cultura de *Rickettsia* devido à sua versatilidade e eficiência. Nessa técnica um pequeno volume de células e inóculos são usados, e colocados em contato por meio de centrifugação, permitindo aumentar a penetração das bactérias nas células, podendo ser utilizada para o diagnóstico de casos agudos (MARRERO; RAOUL, 1989; KELLY et al., 1991; MARTIN et al., 2018).

A técnica de imunohistoquímica possibilita visualização ampla das *Rickettsias* do grupo da febre maculosa, quando associadas com métodos diretos. Ademais, é um método que impossibilita a determinação da espécie de *Rickettsia*. É através de tecidos obtidos de necropsias ou biópsias que a técnica é colocada em prática (PADDOCK et al., 1999; PAROLA et al., 2005, ROZENTAL, 2006; STEPHEN et al., 2018).

A técnica de PCR convencional e o sequenciamento, hoje em dia são os métodos mais rápidos e sensíveis para detectar e identificar *Rickettsia* em sangue, biópsia de pele e artrópodes. Consiste na síntese enzimática *in vitro* de cópias de fragmentos específicos de ácidos nucleicos, onde a partir de uma única molécula de DNA molde, é possível gerar até cem bilhões de moléculas similares em uma reação, utilizando a eletroforese em gel de agarose para visualização do seu resultado através da coloração com o brometo de etídio (MULLIS et al., 1987; SAIKI et al., 1988; MULLIS, 1990; JANG et al., 2021). Os principais marcadores usados são para os genes *ompA*, *ompB*, os quais codificam proteínas de membrana externa; para o gene que codifica a proteína de 17kDa (*htrA*); para o fragmento que amplifica o gene citrato sintase (*gltA*) e para o gene D (*SCA4*) (TZIANABOS et al., 1989; REGNERY et al., 1991; EREMEEVA et al., 1994; PAROLA; RAOULT, 2001; PAROLA et al., 2005). A PCR em tempo real é uma técnica mais avançada que permite a detecção e quantificação em tempo real de ácidos nucleicos durante a amplificação. Diferente da PCR convencional, onde a análise é feita após a amplificação, oferecendo dados quantitativos mais precisos e rápidos (MOLL, 2020).

Para a identificação de *Rickettsia* em artrópodes métodos como o de diagnóstico direto podem ser usados, são exemplos, teste de hemolinfa, imunofluorescência direta para triagem, seguintes de métodos de análise genética (LA SCOLA; RAOULT, 1997; TAYLOR et al., 2015).

### **2.2.3 Animais domésticos como sentinelas de riquetsias**

O conceito de sentinela pode ser definido como o animal mais susceptível e ou com mesma via de infecção para outras espécies ou até a sua própria. O mesmo passa a ser considerado um controle de determinada doença e um modelo para manipulação de um plano

de medidas que pretende eliminar animais atingidos, vacinação ou acompanhamento (VALADARES, 2015)

Os animais sentinelas são grupos de indivíduos, de mesma espécie ou não, que estão expostos a pressão do ambiente e de patógenos, podendo servir para doenças com acometimento humano ou de animais silvestres (NAVA, 2008), alguns podendo ser achados em ambientes militares, como caninos e equinos. Desenvolvem uma resposta adequada e detectável a um patógeno. Contudo, ainda existe muitas aberturas dentro do assunto, visto que cada doença apresenta uma variação tanto entre espécies atingidas, quanto de clima favorável para sua evolução (MCCLUSKEY, 2003).

O encargo dos cães domésticos na epidemiologia da febre maculosa tem sido citado desde os primeiros relatos no Brasil. Dias e Martins (1939) sugeriram que o cão é um possível reservatório natural do agente da febre maculosa e culpado pela disseminação de vetores em volta das moradias. Magalhães (1957) revelou através do método de Weil-Felix a ocorrência de um cão positivo encontrado em uma área de caso positivo para febre maculosa. Já Sexton et al. (1993) descreveram dois cães positivos à microimunofluorescência em local que apresentou caso no Espírito Santo.

Nos Estados Unidos (EUA) a sintomatologia da doença causada por *R. rickettsii* em caninos, é descrita com possível necrose dos tecidos da pele, andar cambaleante, febre, mal estar, vômito com sangue e diarreia (NICHOLSON et al., 2006). Além disso, em nível molecular, *R. rickettsii*, naturalmente encontrada em cães na Carolina do Norte, é altamente homóloga à *R. rickettsii* que causa a doença em pessoas na mesma região (KIDD et al., 2006). No Brasil, de forma experimental a doença foi observada em caninos com sintomatologia similar a dos casos dos EUA. Existindo a provável chance da doença ser confundida e comparada com outras enfermidades que apresentem sintomas parecidos, como por exemplo a ehrlichiose (PIRANDA et al., 2008).

Um trabalho realizado em área endêmica e área não endêmica de São Paulo, foi possível observar que 12 (36,4%) dos 33 cães da área endêmica demonstraram resultados positivos na RIFI e apenas 4 (12,9%) dos 31 cães de área não endêmica apresentaram resultados positivos na RIFI para *Rickettsia* do grupo da febre maculosa (RGFM). Já quanto os equinos, sete (77,8%) dos nove em uma área endêmica e 3 (27,3%) dos 11 de área não endêmica mostraram resultados positivos. Com os resultados é possível concluir que o predomínio de anticorpos anti-RGFM foi significativamente maior em caninos e equinos de áreas endêmicas quando relacionados com os de área não endêmica. Fortalecendo que a epidemiologia da febre maculosa está correlacionada com as espécies de carrapatos e seus hospedeiros vertebrados (LE MOS et al., 1996).

Horta et al. (2004) descreveram anticorpos contra *R. rickettsii* em 17 (77,3%) equinos e em 5 (31,3%) caninos em área endêmica de São Paulo. Destes, dois caninos e sete equinos demonstraram anticorpos específicos contra *R. rickettsii*, pois exibiram títulos pelo menos quatro vezes maior que as outras *Rickettsia* testadas. Além de *R. rickettsii* também foram achados anticorpos contra *R. felis*, *R. bellii* e anticorpos com grande proporção correlacionados contra *R. africae* e *R. parkeri*, demonstrando a probabilidade de que outras espécies de *Rickettsia* podem infectar animais domésticos. Os resultados em questão levam para a conclusão que equinos podem ser sentinelas de febre maculosa mesmo antes de episódios de relatos em humanos.

Em estudo com objetivo de verificar a infecção em animais por *Rickettsia* em cinco áreas do estado de São Paulo foram encontrados soros positivos tanto para *R. rickettsii* como para *R. parkeri*. Foi visto que alguns cães e equinos produziram anticorpos contra *R. rickettsii* por terem apresentado título pelo menos quatro vezes maior. Ainda existe a probabilidade de que além de *R. rickettsii*, outras *Riquetsias* podem estar envolvidas na FM, como *R. parkeri* e *R. felis*. Foram positivos sorologicamente, pela RIFI, 60% de cães, 72,9% de equinos e 68,1%

de marsupiais com título a 1:64 para pelo menos um dos antígenos testados (*R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. felis* e *R. bellii*). Nesta pesquisa em questão, conclui-se que alguns casos de febre maculosa diagnosticados no estado de São Paulo possam ter sido ocasionados por outras RGFM como *R. parkeri* ou *R. felis* (HORTA et al., 2007).

Na microrregião do Vale do Paraíba, no Rio de Janeiro, tem sido registrados casos de Febre Maculosa (CUNHA, 2009; CUNHA et al., 2014; SINAN, 2021), e pesquisas de soroprevalência em animais sentinelas revelaram até 58,7% dos caninos e 44,1% dos equinos reativos com anticorpos anti-*R. rickettsii* chamando atenção para a movimentação do agente e a aparição de casos de febre maculosa brasileira (GAZETA et al., 2009). Apresentando maior destaque, no município de Resende, onde existem registros de ocorrências, com óbitos e surtos, a soroprevalência em cães revelou 28,1% deles reativos com anticorpos anti-*R. rickettsii* (CUNHA et al., 2014).

#### **2.2.4 Animais silvestres como amplificadores de riquetsias**

Animais silvestres localizados em áreas silvestres ou ambientes militares podem agir como hospedeiros de artrópodes, reservatórios ou amplificadores de infecções de agentes patogênicos, colaborando para o ciclo de diversas zoonoses que podem consequentemente acometer a saúde pública (KIM et al., 2007; DANTAS-TORRES et al., 2012; FINO, 2017). Logo, indivíduos e militares que frequentem esses locais ou são espalhados nestes ambientes podem se infestar com carrapatos contaminados, correndo risco de contraírem doenças (STROMDAHL et al., 2001; STROMDAHL et al., 2003; FAULDE et al., 2014; DAHANAYAKA et al., 2017; RECK et al., 2018).

No Brasil, animais silvestres são correlacionados com a epidemiologia de inúmeras doenças transmitidas por carrapatos (LABRUNA, 2009; SZABÓ et al., 2013a), áreas com alta prevalências de matas, são locais ideais para a propagação de algumas espécies de carrapatos e seus hospedeiros, levando a expansão de regiões como moradia para os vetores, maior exposição a bactérias do gênero *Rickettsia*, e consequentemente, a propagação para indivíduos, colaborando com aumento nos números de casos dessas doenças (DANTAS-TORRES et al., 2012; LABRUNA, 2013; POLO et al., 2018; RECK et al., 2018; LUZ et al., 2019).

Muitos são os hospedeiros silvestres dos agentes rickettsiais englobando animais como roedores, aves, répteis e marsupiais (DIAS; MARTINS, 1939; LEMOS, 2002; MILAGRES, 2010; ARAÚJO et al., 2016).

São cinco os principais quesitos para um vertebrado ser caracterizado como um excelente amplificador de *R. rickettsii* no meio ambiente: 1) ser abundante nas áreas endêmicas; 2) ser um bom hospedeiro para o carrapato vetor no meio ambiente; 3) ser susceptível à infecção pela *R. rickettsii*; 4) Possibilitar que a *R. rickettsii* permaneça circulante, para garantir a introdução de animais susceptíveis na população de vertebrados e 5) Manifestar bacteremia considerável para contaminar carrapatos (SPIELMAN; HODGSON, 2000; LABRUNA, 2006b).

Os roedores e marsupiais ganham alto destaque por estarem presente em áreas urbanas e rurais levando a danos na economia e nas questões sanitárias de importância ao homem, estando presentes na cadeia epidemiológica de no mínimo trinta doenças propagadas para o homem, servindo como reservatórios naturais do agente etiológico causador da doença. Dentre essas podemos citar a febre maculosa, doença de grande valor epidemiológico no Brasil (MATIAS et al., 2002).

No Brasil, duas espécies destacam-se como hospedeiros amplificadores para *A. sculptum* (= *A. cajennense*): os gambás e as capivaras.

É possível analisar que a contaminação experimental possibilita resultados significativos quando associados as capivaras. Travassos e Vallejo (1942), realizaram tal feito

com *R. rickettsii* e concluíram que as capivaras são propensas a infecção, além de não apresentarem sintomatologia. Realizando outro experimento no mesmo período de tempo (1942), informaram que os carrapatos que ingeriram o sangue dessas capivaras, contraíram o agente, levantando a hipótese que a participação das capivaras no ciclo da febre maculosa brasileira é de crítica importância, informação essa, também citada por Souza et al. (2009), em estudo realizado. Conduzindo a conclusão de que as capivaras se encaixam nos quesitos citados por Labruna (2006b) são prevalentes em regiões onde existem casos de febre maculosa; são excelentes hospedeiras para o vetor; são propensas a infecção; e procriam com facilidade; e tem uma taxa de bacteremia necessária para infectar outros vetores (carrapatos).

Mediante estudo de Boostrom et al. (2002), é de extrema importância a necessidade de pesquisas para investigação de animais não domesticados que vivem pelas redondezas, como por exemplo os gambás, que apresentam relevante função na cadeia epidemiológica das riquetsioses, gerando uma ligação entre os ciclos silvestre e peridomiciliar de determinadas enfermidades transmitidas por carrapatos. Essa particularidade é justificada pelo elevado grau de sinantropia, corroborando para uma excelente acomodação ao ambiente feito ou modificado pelo ser humano (HORTA et al., 2009).

Os gambás são vistos em grande parcela das áreas com casos confirmados para a febre maculosa brasileira, apresentando a característica de serem facilmente infestados por larvas e ninfas de *A. sculptum* (= *A. cajennense*) (HORTA et al., 2009) e propensos à infecção pela bactéria *R. rickettsii* (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; HORTA et al., 2009). Isolamentos de *R. rickettsii* vindos de animais localizados no Brasil foram achados em gambás naturalmente contaminados nos Estados de Minas Gerais e São Paulo, ainda no período de 1930 (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935).

Para que a propagação e permanência das riquetsias sejam estabelecidas em determinado habitat, é importante, analisar qual espécie e quantidade de possíveis vetores estão presentes no ambiente, acompanhado pela fauna de vertebrados domésticos e silvestres (TRAUB; JELLINSON, 1981). Logo, é possível concluir que quanto maior a densidade populacional de hospedeiros, maior será a população de carrapatos.

Por consequência, profissionais da área militar estão propensos a maior infecção visto que realizam missões e treinamentos em ambientes com a presença de roedores como capivaras e marsupiais como gambás, animais presentes no ciclo silvestre das riquetsias por formarem um elo entre os ciclos enzoóticos e zoonóticos das bactérias referentes ao grupo da febre maculosa.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo foi utilizada uma amostragem de carrapatos infestando diferentes espécies de hospedeiros vertebrados (humanos, animais silvestres e domésticos) circulantes nas áreas militares pertencentes à Academia Militar das Agulhas Negras (AMAN), localizada no município de Resende, estado do Rio Janeiro.

Os carrapatos foram coletados e identificados por Prado (2022) durante os anos de 2019 a 2021. A pesquisa de Prado (2022) foi realizada após ter a captura dos animais e o transporte de amostras biológicas autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob o nº 68991-1; e pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, sob o nº 9302140819 CEUA-IV/UFRRJ.

A realização da pesquisa na instituição do Exército Brasileiro foi autorizada e aprovada pelo Comitê de Governança e Ética em Pesquisa da Academia Militar das Agulhas Negras, através da Ata de Reunião do Comitê de Governança e Ética em Pesquisa na AMAN Nº 001/2019. A pesquisa relacionada com a coleta de carrapatos em humanos voluntários foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da Plataforma Brasil, através do Parecer Consubstanciado Nr 3.754.459.

#### 3.1 Descrição da área do estudo

A AMAN fica localizada no município de Resende, microrregião do Vale do Paraíba Fluminense, Região Sul Fluminense, estado do Rio de Janeiro (Latitude: -22.4783; Longitude: -44.4559). O bioma predominante é a Mata Atlântica, ainda podendo observar disjunções de vegetação de Savana em contato com a Floresta Ombrófila (FONSECA et al., 2019).

#### 3.2 Amostragem de carrapatos

O estudo desenvolvido por Prado (2022) analisou um total de 111 hospedeiros animais (29 domésticos e 82 silvestres) pertencentes a 14 espécies e, adicionalmente 31 militares que voluntariamente cederam carrapatos que fixaram em seus corpos durante o os treinamentos na instituição AMAN. Dessa forma, um total de 1398 carrapatos foram coletados.

Para realizar as análises moleculares dos carrapatos do presente estudo foi retirada uma amostragem desse total de carrapatos. Tal amostragem foi calculada baseando-se na prevalência estimada de 50% de carrapatos infectados por *Rickettsia* spp. no local de estudo, conforme a fórmula a seguir proposta por Agranonik e Hirakata (2011):

$$n = \frac{p(1-p)Z^2}{\varepsilon^2}$$

Onde: n = tamanho da amostra; p = prevalência esperada; Z = valor da distribuição normal para o nível de confiança (95% = 1,96); e  $\varepsilon^2$  = margem de erro amostral (6%).

Levando em conta uma margem de erro de 6%, e um nível de confiança de 95%, chegou-se à amostra calculada mínima de 267 carrapatos.

Deste quantitativo, foi calculado uma amostra estratificada, baseado na porcentagem que cada espécie e estágio de carrapatos em cada hospedeiro representavam do total.

Desta forma, foi calculado a quantidade mínima de carrapatos a ser retirado, para os

testes moleculares, da quantia total de carrapatos coletados. Por fim, este valor amostral de cada estrato, foi distribuído proporcionalmente em função do percentual representante de cada gênero e/ou espécie e estágios de vida dos carrapatos coletados no local.

Assim, se chegou à quantidade final da amostra a ser retirada de cada estágio, gênero e espécie. Larvas capturadas em “aglomerados de larvas” foram consideradas como somente um indivíduo, para fins de cálculo de amostra. Ademais, tal cálculo foi realizado apenas para os animais, e os carrapatos diferentes de *A. sculptum*, *A. dubitatum* e *A. brasiliense* foram todos propositalmente inseridos, visando a pesquisa de *Rickettsia* spp. em diferentes gêneros e espécies, aumentando o número final de carrapatos a serem testados. Todos os carrapatos coletados em humanos, não foram usados com amostragem, porém todos foram inseridos.

As diferenças nas quantidades de amostras de carrapatos testados devem-se à arredondamentos matemáticos ocorridos no cálculo da amostra estratificada, onde todos os resultados abaixo de 01 (um) foram arredondados para tal valor, e pelas inserções de todos os carrapatos de espécies diferentes das *A. sculptum*, *A. dubitatum*, *A. brasiliense*, e todos carrapatos em humanos.

Desta forma, foi selecionada, inicialmente, uma amostra aleatória estratificada de 508 carrapatos coletados do ambiente da área da AMAN. Contudo, durante o processo de transporte das amostras, 14 carrapatos foram perdidos, diminuindo a quantidade final para 494 carrapatos sendo eles: larvas de *Amblyomma* sp. (n=127 larva “pool”); ninfas de *A. sculptum* (n=49), *A. ovale* (n=4), *A. brasiliense* (n=67), *A. incisum* (n=8), *A. auricularium* (n=1), *A. calcaratum* (n=3) e *Rhipicephalus sanguineus* (n=1). E adultos *A. sculptum* (n=147), *A. ovale* (n=5), *A. dubitatum* (n=27), *A. brasiliense* (n=37), *A. aureolatum* (n=1), *A. incisum* (n=4), *Dermacentor nitens* (n=2), *Rhipicephalus sanguineus* (n=7), *Ixodes loricatus* (n=3) e *Ixodes schulzei* (n=1).

### 3.3 Carrapatos separados para análise molecular encontrados em animais domésticos

ANIMAIS	CARRAPATOS	ESTÁDIO	Nº
1 Felino ( <i>Felis catus</i> )	<i>Amblyomma ovale</i>	Adulto	1
	<i>Amblyomma sculptum</i>	Ninfa	1
13 Cães ( <i>Canis familiaris</i> )	<i>Amblyomma ovale</i>	Ninfas	4
	<i>Amblyomma sculptum</i>	Adultos	21
	<i>Dermacentor nitens</i>	Adulto	1
	<i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i>	Adultos/ninfa	7/1
15 Equinos ( <i>Equus caballus</i> )	<i>Amblyomma sculptum</i>	Adultos/ninfas	13/2
	<i>Dermacentor nitens</i>	Adulto	1

**Tabela 1.** Contagem e classificação de carrapatos coletados de diferentes espécies de animais domésticos na área militar.

A tabela 1 apresenta a contagem de carrapatos coletados de um felino (*Felis catus*), 13 cães (*Canis familiaris*) e 15 equinos (*Equus caballus*) na área militar. As amostras foram separadas por espécie de carrapato e estágio de desenvolvimento (adulto ou ninfa), totalizando 52 carrapatos coletados para análise molecular.

### 3.4 Carrapatos separados para análise molecular encontrados em animais silvestres capturados na área militar

ANIMAIS	CARRAPATOS	ESTÁDIO	Nº
3 Gambás ( <i>Didelphis aurita</i> )	<i>Amblyomma calcaratum</i>	Ninfa	3
	<i>Amblyomma sculptum</i>	Ninfa	1
	<i>Ixodes schulzei</i>	Ninfa	1
1 Jacu ( <i>Penelope ochrogaster</i> )	<i>Amblyomma sculptum</i>	Ninfas	3
1 Paca ( <i>Cuniculus paca</i> )	<i>Amblyomma incisum</i>	Adultos/ninfas	4/4
1 Capivara ( <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> )	<i>Amblyomma dubitatum</i>	Adultos	27
	<i>Amblyomma sculptum</i>	Adultos	95

**Tabela 2.** Contagem e classificação de carrapatos coletados de diferentes espécies de animais silvestres na área militar.

A tabela 2 apresenta a distribuição das amostras de carrapatos coletados de diferentes espécies de animais silvestres durante a pesquisa. Foram analisados um total de 138 carrapatos de diversas espécies de hospedeiros. Amostras de carrapatos de um ouriço (*Coendou spinosus*) foram coletadas, mas perdidas antes da análise molecular.

### 3.5 Carrapatos separados para análise molecular encontrados em animais silvestres capturados em armadilhas

#### 3.5.1 Carrapatos encontrados em pequenos mamíferos

ANIMAIS	CARRAPATOS	ESTÁDIO	Nº
3 Gambás ( <i>Didelphis aurita</i> )	<i>Amblyomma auricularium</i>	Ninfa	1
	<i>Amblyomma incisum</i>	Ninfas	4
	<i>Amblyomma ovale</i>	Ninfas	3
	<i>Amblyomma sculptum</i>	Ninfas	5
	<i>Amblyomma</i> spp.	Larvas	20
	<i>Ixodes loricatus</i>	Adultos	3
1 (Rato-do-mato <i>Euryoryzomys russatus</i> )	<i>Amblyomma ovale</i>	Ninfa	1

**Tabela 3.** Distribuição de carrapatos coletados de *Didelphis aurita* e *Euryoryzomys russatus* para análise molecular.

Ao final da pesquisa, 37 carrapatos foram separados para análise molecular e estudo de pequenos mamíferos (Tabela 3).

### 3.5.2 Carrapatos encontrados em catetos

ANIMAIS	CARRAPATOS	ESTÁDIO	Nº
5 Catetos ( <i>Dicotyles tajacu</i> )	<i>Amblyomma</i> spp.	Larvas	107
	<i>Amblyomma brasiliense</i>	Ninfas/adultos	57/35
	<i>Amblyomma sculptum</i>	Adulto	1

**Tabela 4.** Distribuição das Amostras de Carrapatos em Catetos (*Dicotyles tajacu*).

A tabela 4 apresenta a distribuição das amostras de carrapatos coletadas em cinco catetos (*Dicotyles tajacu*) para análise molecular. As amostras incluem 107 larvas de *Amblyomma* spp., 57 ninfas e 35 adultos de *A. brasiliense*, além de 1 adulto de *A. sculptum*, totalizando 200 carrapatos analisados.

### 3.6 Carrapatos separados para análise molecular encontrados em militares.

ANIMAIS	CARRAPATOS	ESTÁDIO	Nº
31 Militares	<i>Amblyomma sculptum</i>	Adultos/ninfas/ninfa parcialmente ingurgitada	38/15/1
	<i>Amblyomma brasiliense</i>	Adultos/ninfas/ninfas parcialmente ingurgitadas	2/3/7
	<i>Amblyomma aureolatum</i>	Adulto	1

**Tabela 5.** Análise Molecular de Carrapatos em Militares.

A tabela 5 resume o número de carrapatos de diferentes espécies e estágios coletados para análise molecular dos 31 militares envolvidos no estudo. Totalizando 67 carrapatos.

### 3.7 Extração de DNA

A extração de DNA dos carrapatos foi realizada pelo método “HotSHOT” e pelo método de fenol-clorofórmio. Larvas e ninfas foram prioritariamente extraídas pelo método “HotSHOT”, por ser uma técnica mais simples, de único tubo, de fácil implantação e que aumenta a eficiência da extração ao se processar várias amostras ao mesmo tempo, com mínimo risco de contaminação cruzada, e sucesso na produção de amostras de DNA para preservação por longos períodos (MONTERO-PAU et al., 2008).

O método “HotSHOT” foi realizado conforme descrito por Truett et al. (2000). Uma solução tampão de lise alcalina 25 mM de NaOH e 0,2 mM EDTA dissódico a um pH de 12 foi preparada dissolvendo os sais em água destilada sem ajustar o pH. Uma solução tampão neutralizante com 40 mM de TrisHCl e um pH de 5 foi preparada dissolvendo Tris-HCl em água destilada sem ajustar o pH.

A amostras de carrapatos foram colocados individualmente em blocos de banho seco de 35 poços. Foram adicionados 50 µl de reagente de lise alcalina a cada microtubo contendo a amostra de carrapato, então as amostras foram aquecidas a 95°C por 30 minutos. Após o aquecimento, as amostras foram resfriadas a 4°C por cinco minutos, e 50 µl de

reagente neutralizante foram adicionados a cada amostra. O tampão resultante da combinação dos dois reagentes resulta em 20 mM de Tris-HCl (pH 8,1) e 0,1 mM de EDTA, que é semelhante ao tampão de armazenamento de DNA tradicional.

O método fenol-clorofórmio foi realizado conforme descrito por Sambrook et al. (2001) com modificações próprias. Os carrapatos foram cortados pela metade com uma lâmina estéril. Em seguida, foi acrescentando 180 µL de PBS + 200 µL de Digest buffer 2X + 20 µL de Proteinase K a cada amostra. Deixados à temperatura de 56°C por over night (12 horas) em blocos de banho seco de 35 poços. No dia seguinte, foi realizado um “spin” e adicionado mais 100 µL de PBS ou água destilada ou ultrapura estéril. Em seguida 550 µL de fenol saturado foi inserido na amostra dentro da capela de exaustão. Após tal procedimento é realizada homogeneização no vortéx. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à 16000 xg. 500 µL da amostra foi alíquotado do sobrenadante para outro tubo, já identificado e adicionado 500 µL de fenol-clorofórmio-isoamílico dentro da capela de exaustão, passando novamente pelo processo de homogeneização no vórtex e pela centrifugação por 10 minutos a 16000 xg. 450 µL do sobrenadante foi alíquotado para outro tubo, já identificado e retirado com cuidado para não transferir o fenol e nem sujidades.

Foi adicionado 700 µL de isopropanol as amostras e as mesmas foram centrifugadas por 4 minutos a 16000 xg. Nesse estágio foi possível observar a formação do “pellet”. Em seguida o sobrenadante foi descartado e foi realizada a primeira lavagem com 1000 µL de etanol P.A. gelado; as amostras foram centrifugas por 2 minutos a 16000 xg e o sobrenadante foi descartado novamente. 1000 µL de etanol 70% gelado foi adicionado para uma segunda lavagem. As amostras passaram por mais uma centrifugação de 2min a 16000x g e em seguida o sobrenadante foi descartado. A última gota de cada tubo foi seca em papel toalha (individual por tubo de amostra) e colocado a 56°C por 15 minutos para secar o álcool. Por fim, foi adicionado 100 µL de TE 1X e levadas em blocos de banho seco de 35 poços a 56°C por 15 minutos, em seguida, as amostras foram armazenadas em ambiente com temperatura entre -20 ou -80°C até o momento do uso.

### 3.8 Análise molecular

Como controle da qualidade da técnica de extração de DNA, todas as amostras foram submetidas a uma amplificação prévia de sequência parcial do gene ITS-2 nuclear de carrapatos (família Ixodidae), seguindo o protocolo estabelecido por LV et al. (2014), com a seguinte sequência de *primers* (5’-3’): ACATTGCGGCCTTGGGTCTT (ITS2F) TCGCCTGATCTGAGGTCGAC (ITS2R); e com um fragmento amplificado de ~1200 pares de base.

Os ensaios de PCR foram realizados para a pesquisa de *Rickettsia* spp. A presença de DNA de *Rickettsia* spp. foi detectada usando-se os oligonucleotídeos iniciadores (“*primers*”) de sequência do gene *gltA* (LABRUNA et al., 2004a) com a seguinte sequência (5’-3’): GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT (CS239F) CAGGGTCTTCGTGCATTCTT (CS1069R); e com um fragmento amplificado de 834 pares de base.

Para PCR convencional para ITS-2 foi obtido um produto de volume final de 12,5µL, sendo 1 µL de DNA extraído acrescido de 11,5 µL de *Master Mix* [2,5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®), 0,875 µL de 25mM MgCl<sub>2</sub> (Promega® MgCl<sub>2</sub> Solution), 1 µL de 200mM DNTP’s, 1,25 µL de 0,8 pmoles de cada iniciador; 0,1 µL de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e 4,525 µL de água]. E as condições de PCR para família Ixodidae foram as seguintes: 95°C por 2 minutos e 30

segundos, seguidos de 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 1 minutos e 15 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Como controle positivo das reações foi utilizado DNA de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* previamente testado.

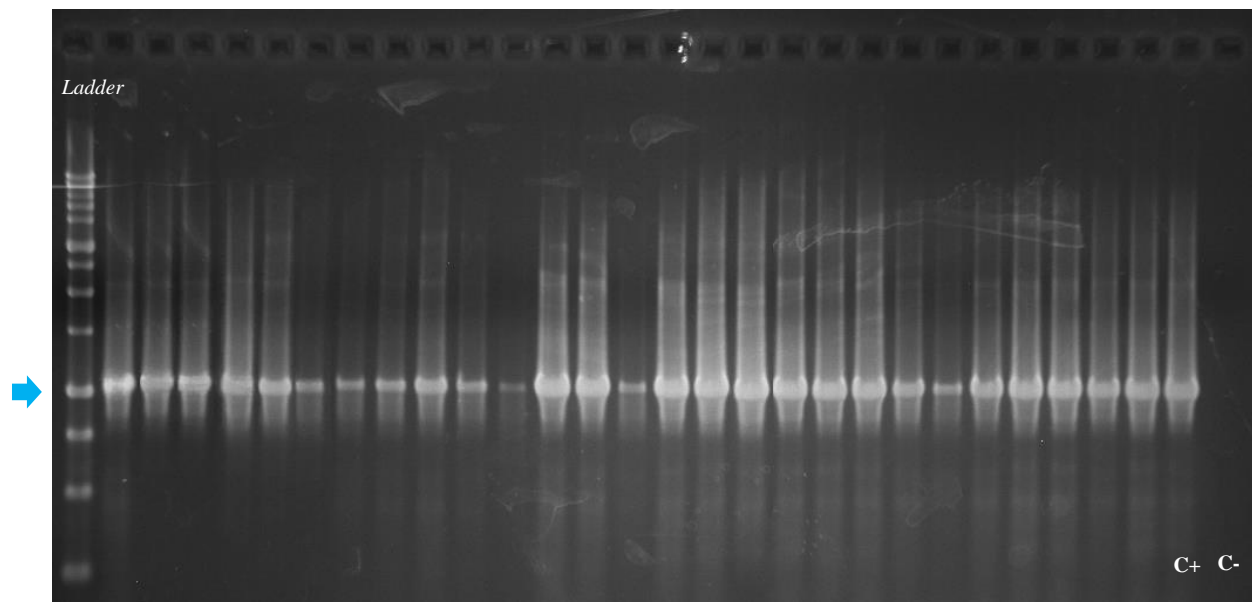
Já para *Rickettsia* spp. foi obtido um produto de volume final de 12,5µL, sendo 1, µL de DNA extraído acrescido de 11,5 µL de *Master Mix* [2,5 µL de tampão 5X (Colorless GoTaq®, Promega®), 1,25 µL de 25mM MgCl<sub>2</sub> (Promega® MgCl<sub>2</sub> Solution), 1 µL de 200mM DNTP's, 1 µL de 0,8 pmoles de cada iniciador, 0,075 µL de 0,75U de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e 4,675 µL de água]. E as condições de PCR foram as seguintes: 95°C por 2 minutos e 30 segundos, 39 ciclos de 95°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 40 segundos e uma extensão final de 72°C por 5 minutos. Como controle positivo foi usado DNA de *Rickettsia parkeri* cepa at24.

Para os controles negativos e de contaminação das reações foi utilizado água ultrapura. Um termociclador modelo T100 (Bio-rad®) foi utilizado para as reações de PCR.

Um volume de 10 µL dos produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100bases DNA Ladder, product #SM024, Thermo Scientific).

## 4 RESULTADOS

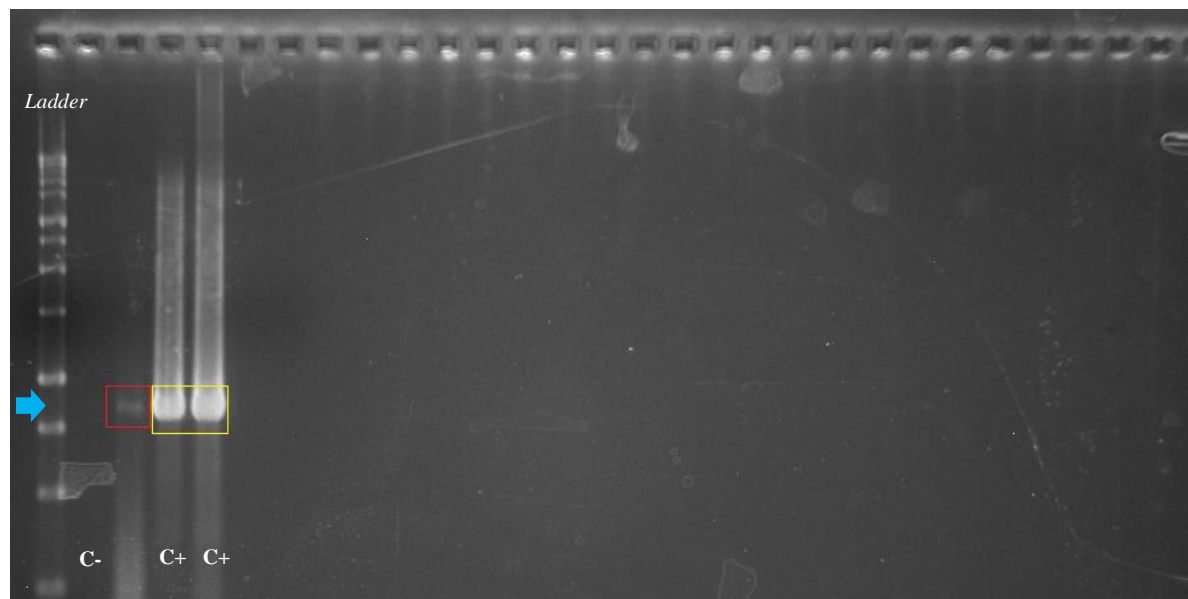
Na análise molecular, a qualidade da extração foi confirmada com a amplificação do gene ITS-2 em todas as amostras utilizadas para o estudo (figura 1).



**Figura 1.** Representação dos produtos da PCR para o gene ITS-2 (seta azul: 400pb), aplicados em gel de agarose a 2% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®) corado com DView nucleic stain 20.000X (Sinapse Inc®) e separados por eletroforese (5V/cm), visualizados em transiluminador UV. Poço 1: ladder . Poço 2-28: amostras positivas. Poço 29: controle positivo. Poço 30: controle negativo.

De todas as amostras de DNA dos carrapatos analisadas por PCR, somente uma amplificou para o gene *gltA* de *Rickettsia* spp, que consiste em uma carrapato da espécie *A. dubitatum* coletada em uma capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*).

A figura 2 representa os produtos amplificados dos controles positivos utilizados, bem como da amostra de *A. dubitatum* que amplificou para a PCR do gene *gltA* de *Rickettsia* spp..



**Figura 2.** Produtos de PCR de fragmento de gene *gltA* de *Rickettsia* spp. (834pb - seta azul), aplicados em gel de agarose a 2% separados por eletroforese, corados com brometo de etídio e visualizados em transiluminador de luz UV. Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 10000pb. Destacado em vermelho a amostra positiva de *A. dubitatum* oriunda de *H. hydrochaeris* e destacados em amarelo, controles positivos de *Rickettsia* sp..

## 5 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo a analisar a detecção molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos parasitando humanos, animais domésticos e silvestres circulantes de áreas pertencentes a Academia das Agulhas Negras, Resende, RJ, Brasil.

Os escassos estudos conduzidos em zonas militares no Brasil identificaram carrapatos infectados com *Rickettsia* spp. (DANTAS-TORRES et al., 2021; PRADO, 2022), indicando um risco potencial de riquetsiose entre os militares que frequentam essas regiões.

O resultado da detecção molecular de *Rickettsia* spp. em um carrapato da espécie *A. dubitatum* parasitando *H. hydrochaeris*, confirmam os achados previamente mencionados, destacando a importância da vigilância epidemiológica e acarológica em áreas de treinamento militar (DANTAS-TORRES et al., 2021; PRADO, 2022).

Como observado por Prado et al. (2022), a região estudada apresenta fatores que aumentam a vulnerabilidade para a ocorrência de casos de febre maculosa brasileira, sendo categorizadas como "área propensa" à incidência de casos humanos.

Em pesquisa realizada por Cunha et al. (2014) na região do município de Resende, estado do Rio de Janeiro, Brasil, com objetivo de avaliar o potencial de cães e equinos como sentinelas para FMB, observou-se que das 107 amostras de cães analisadas, 30 (28,0%) foram reativas. Embora, *R. rickettsii* não tenha sido detectada nas amostras coletadas de carrapatos, os resultados levantam um alerta para animais da área de Resende, local onde o estudo foi realizado, visto que os mesmos agem como sentinelas para a doença e consequentemente, estão propensos ao parasitismo por carrapatos.

Outros carrapatos identificados em diversos hospedeiros deste estudo também apresentam relatos de parasitismo em seres humanos, como: *A. auricularium* (SZABÓ et al., 2020), *A. calcaratum* (VALENTE et al., 2020), *A. incisum* (SZABÓ et al., 2006; RECK et al., 2018; VALENTE et al., 2020), *A. longirostre* (RECK et al., 2018; VALENTE et al., 2020), *D. nitens* (SZABÓ et al., 2020), *Ixodes loricatus* (SERRA-FREIRE, 2010). Já o *Ixodes schulzei* é descrito parasitando roedores (ONOFRIO et al., 2013). Contudo, ainda são necessários estudos explicando o verdadeiro potencial que estes vetores apresentam como carreadores de agentes zoonóticos.

Já *A. sculptum* e *A. aureolatum* são os principais vetores na transmissão da *R. rickettsii* (LABRUNA, 2009; SZABÓ et al., 2013a). Enquanto *A. ovale* é o vetor de uma riquetsia conhecida como *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, menos virulenta que a *R. rickettsii* (KRAWCZAK et al., 2016; MORAES-FILHO, 2017; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018). Embora os carrapatos coletados dessas espécies no presente estudo, parasitando animais e humanos, não tenham amplificado o fragmento do gene *gltA* de *Rickettsia* spp., esses achados alertam para a ampla distribuição dos vetores da febre maculosa brasileira. Portanto, é essencial implementar medidas de biossegurança para os profissionais da área e os animais utilizados em trabalhos militares.

No Brasil, *A. dubitatum* está distribuído por toda região brasileira, entre elas: Paraná (TOLEDO et al., 2011), Santa Catarina (QUADROS et al., 2013); Rio Grande do Sul (NAVA et al., 2010); São Paulo (SOUZA et al., 2006; PACHECO et al. 2009), Rio de Janeiro (SERRA-FREIRE et al., 2011), Espírito Santo (NAVA et al., 2010); Minas Gerais (GUEDES; LEITE, 2008; GUEDES et al., 2011) além de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal (ONOFRIO, 2007; NAVA et al., 2010). Sendo descrito parasitando principalmente capivaras, ademais é comum encontrar casos desta espécie parasitando outros animais, e até mesmo o ser humano (RECK et al., 2018;

VALENTE et al., 2020), contudo a patogenicidade ainda é desconhecida (ALMEIDA et al., 2001).

Souza et al. (2004) observaram uma maior ocorrência de *A. dubitatum* (59%) parasitando capivaras em comparação com *A. cajennense* (41%) no município de Campinas. Capivaras e gambás possuem uma alta capacidade de abrigar grandes populações de *Amblyomma* spp., o que os torna potenciais dispersores e amplificadores para a manutenção do ciclo vital da *R. rickettsii* na natureza (LABRUNA, 2006b; HORTA, 2006). Gambás abrigam formas imaturas, enquanto capivaras hospedam adultos e, secundariamente, ninfas. Dentre as espécies que contribuem para a manutenção do ciclo de *R. rickettsii*, capivaras e gambás são as mais importantes, conforme apontado por Labruna (2006), devido à sua alta suscetibilidade ao parasitismo por *Amblyomma* spp. Além de serem prolíferos, esses hospedeiros apresentam uma alta taxa de renovação populacional, segundo Ojasti (1973) e Emmons e Feer (1997), introduzindo regularmente novos animais susceptíveis na população. A espécie *H. hydrochaeris* foi o hospedeiro da amostra de *A. dubitatum* que testou positivo para *Rickettsia* spp., corroborando estudos que indicam a alta prevalência de parasitismo nesse animal.

Prado (2022) realizou um estudo com objetivo de detectar, por meio da técnica de PCR, *Rickettsia* spp. em carrapatos coletados do ambiente em áreas de instrução militar. O mesmo encontrou a bactéria *R. bellii* infectando carrapatos das espécies *A. sculptum* e *A. dubitatum* oriundos do Campo de Instrução de Juiz de Fora / Centro de Educação Ambiental e Cultura, no município de Juiz de Fora – MG; mostrando o perigo que profissionais da área correm por serem um grupo de risco presente em regiões com a possibilidade de ocorrência de casos de Febre Maculosa em humanos. Informações citadas pelo autor importantes para pesquisa realizada, visto que uma amostra de *A. dubitatum* foi positiva durante as reações moleculares amplificando o fragmento do gene *gltA* de *Rickettsia* spp., logo os militares do estudo por frequentarem áreas propensas a ocorrência de casos da doença, também correm risco similar.

Labruna et al. (2004b) realizaram um estudo onde adultos de *A. dubitatum*, foram coletados numa área endêmica de FMB em São Paulo, onde através da PCR observou-se que 40% estavam infectados com *R. bellii*. Neste trabalho, os pesquisadores detectaram uma espécie de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa em *A. dubitatum*, filogeneticamente muito próxima a *R. parkeri*, *R. africae*, *R. sibirica*. Sendo um alerta principalmente para militares por frequentarem regiões propensas a ocorrência da Febre Maculosa.

Sakai et al. (2014) realizaram estudo com objetivo de avaliar a capacidade do *A. dubitatum* naturalmente infectado com *R. bellii*, de se infectar com *R. rickettsii* quando alimentado em cobaias infectadas experimentalmente, além de verificar se é possível ocorrer transmissão transtadial e transovariana. Assim como, avaliar se *A. dubitatum* infectados com *R. rickettsii* serão capazes de transmitir a doença para cobaias livres de infecção, considerando que esta espécie é comum nas áreas endêmicas de FMB. Observou-se através do estudo que *A. dubitatum* podem obter e manter por transmissão transtadial, e transmitir *R. rickettsii* a um hospedeiro suscetível. Criando a hipótese de que o *A. dubitatum* possa ser um vetor de *R. rickettsii* para os seres humanos principalmente os que estão em área de risco, logo sendo necessário mais estudos para avaliar se o *A. dubitatum* é de fato importante na disseminação da FMB.

É imprescindível conduzir mais estudos, como testes sorológicos e moleculares em animais sentinelas, além de manter o monitoramento constante e o controle de ectoparasitas nessa área militar. A prevenção e a mitigação de riscos biológicos ocupacionais são elementos estratégicos para a proteção da saúde das tropas (STROMDAHL et al., 2001; FAULDE et al., 2014; PETERSEN et al., 2015). Esses

levantamentos permitirão uma compreensão e mensuração mais precisa desses riscos, ajudando a definir a classificação da área e contribuindo para a gestão adequada dos riscos sanitários.

## 6 CONCLUSÃO

Através do presente estudo, foi possível afirmar que houve amplificação de um fragmento do gene *gltA* em uma amostra de carrapato da espécie *A. dubitatum* encontrado parasitando uma capivara (*H. hydrochaeris*) oriunda da Academia das Agulhas Negras, Resende, RJ. Este achado reafirma a circulação de bactérias do gênero *Rickettsia* na região e revela que animais silvestres podem albergar agentes rickettsiais, alertando sobre o papel de animais como sentinelas e a vulnerabilidade de humanos que se encontram em áreas de risco.

A vigilância deve ser constante, pois há circulação de animais e humanos na academia e na mata, seja por serem sinantrópicos ou sentinelas no caso dos animais selvagens, ou no caso dos animais domésticos e do homem, por executarem treinamentos na área de mata e residirem na academia. Ainda assim, é necessário aprofundar o estudo, incluindo a realização do sequenciamento da amostra para determinar qual agente, a nível de espécie, está presente no carrapato vetor *A. dubitatum* na área estudada, e definir se trata-se de um agente patogênico.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGRANONIK, M.; HIRAKATA, V. N. Cálculo de tamanho de amostra: proporções. **Clinical & Biomedical Research**, v. 31, n. 3, 2011.
- ALMEIDA, A. T. S.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Life cycle of female ticks *Amblyomma cooperi* Nuttal & Warbuton, 1908 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, p. 316-320, 2001.
- ANGERAMI, R. N.; CÂMARA, M.; PACOLA, M. R.; REZENDE, R. C.; DUARTE, R. M.; NASCIMENTO, E. M.; COLOMBO, S.; SANTOS, F. C.; LEITE, R. M.; KATZ, G.; SILVA, L. J. 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, 2012a.
- ANGERAMI, R. N.; DA SILVA, A. M.; NASCIMENTO, E. M.; COLOMBO, S.; WADA, M. Y.; DOS SANTOS, F. C.; MANCINI, D. M.; DE OLIVEIRA, R. C.; KATZ, G.; MARTINS, E. C.; DA SILVA, L. J. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 207-208, 2009.
- ANGERAMI, R. N.; LEMOS, E. R. S. *Rickettsia rickettsii* em *Dermacentor nitens* e a febre maculosa nas regiões de Minas Gerais e São Paulo. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 21, n. 2, p. 575-578, 2005.
- ANGERAMI, R. N.; SILVA, A. M. R.; NASCIMENTO, E. M. *Rickettsia bellii* in *Amblyomma dubitatum* ticks from military training areas in São Paulo, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 2, p. 360-362, 2012b.
- ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, p. 115-129, 1961.
- ARAÚJO, I. M.; CORDEIRO, M. D.; SOARES, R. F. P.; GUTERRES, A.; SANAVRIA, A.; DE AZEVEDO BAETA, B.; DA FONSECA, A. H. Survey of bacterial and protozoan agents in ticks and fleas found on wild animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 13, n. 6, p. 102037, 2022.
- ARAÚJO, R. P.; NAVARRO, M. B. M. A.; CARDOSO, T. A. O. Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. **Cadernos de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 3, p. 339-346, 2016.
- ARAUJO, S. B.; ANJOS, K. A.; DUARTE, F. C.; FIORINI, L. C.; GODOI, F. E. M.; SAMPAIO, P. H. S.; MENDES, M. C. Integrated tick control on a farm with the presence of capybaras in a Brazilian spotted fever endemic region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 671-676, 2019.
- ARZUA, M.; NAVARRO DA SILVA, M. A.; FAMADAS, K. M.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. **Experimental & applied acarology**, v. 31,

p. 283-296, 2003.

BALASHOV, Y. S. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. **Annual Review of Entomology**, v. 29, p. 137-156, 1984.

BARBIERI, A. R.; JONAS FILHO, M.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOUZA JR, J. C.; SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 6, p. 848-853, 2014.

BILLINGS, A. N.; YU, X. J.; P. D., T.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **Journal of Medical Entomology**, n. 35, p. 474-478, 1998.

BOOSTROM, A.; BEIER, M. S.; MACALUSO, J. A. Geographic association of *Rickettsia felis*-infected opossums with human murine typhus, Texas. **Emerging Infectious Disease**, v.8, p.549-554, 2002.

BORSOI, A. B. P. **Investigação sobre espécies de Ixodida em interação trófica com humanos no Município de Belford Roxo, Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade e Saúde), Fundação Oswaldo Cruz, 2015.

BORSOI, A. B. P.; SERRA-FREIRE, N. M. Relações parasitárias entre humanos e carrapatos no município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro. **Revista UNIABEU**, v. 5, n. 11, p. 306-317, 2012.

BRASIL. **Exército Brasileiro. Missão e visão do futuro**. Sítio eletrônico: eb.mil.br. Disponível em: <<http://www.eb.mil.br/missao-e-visao-de-futuro>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. 3ª Edição. Brasília, DF: Ministério da Saúde Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços, 2019a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde (SVS). **Boletim epidemiológico - manejo de capivaras em áreas com casos de febre maculosa brasileira**. Brasília: Ministério da Saúde. 2019b.

BURGDORFER, W.; VARNA, M. G. R. Trans-stadial and transovarial development of diseases agents in arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 12, p. 347-376, 1967.

CAMPOS, C. H. C.; FONSECA, A. H.; MAFRA, C. L.; OLIVEIRA, K. A.; SILVA, W. G.; MOURÃO, L. C.; STUDART, A. G. *Rickettsia* em carrapatos capturados em área de treinamento militar no estado do Rio de Janeiro. In: **Anais do XV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária**, Curitiba, 2008.

CHOMEL, B. Tick-borne infections in dogs – An emerging infectious threat. **Veterinary Parasitology**, v.179, p.294 – 301, 2011.

COSTA, F. B.; GERARDI, M.; BINDER, L. C.; BENATTI, H. R.; SERPA, M. C. A.; LOPES, B. *Rickettsia rickettsii* (*Rickettsiales*: *Rickettsiaceae*) infectando carrapatos e

capivaras *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) em uma área endêmica de febre maculosa brasileira no Brasil. **Journal of Medical Entomology**, v. 57, n. 1, p. 308-311, 2020.

CUNHA, N. C. D.; DE LEMOS, E. R.; TOZENTAL, T.; TEIXEIRA, R. C.; CORDEIRO, M. D.; LISBÔA, R. S.; FAVACHO, R. S.; BARREIRA, A. R.; REZENDE, J. D.; FONSECA, J.; FONSECA, A. H. D. Rickettsiae of the Spotted Fever group in dogs, horses and ticks: an epidemiological study in an endemic region of the State of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 36, n. 3, p. 294 – 300, 2014.

CUNHA, N. C. **Estudo epidemiológico de rickettsias do grupo da febre maculosa em caninos, equinos e seus carrapatos no Município de Resende, Estado do Rio de Janeiro, Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2009.

CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma cajennense* ticks in military training areas of the Brazilian Navy. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 55, n. 4, p. 445-450, 2018.

DA PAIXÃO SEVÁ, A.; MARTINS, T. F.; MUÑOZ-LEAL, S.; RODRIGUES, A. C.; PINTER, A.; LUZ, H. R.; ANGERAMI, R. N.; LABRUNA, M. B. A human case of spotted fever caused by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest and its association to the tick *Amblyomma ovale*. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2019.

DAHANAYAKA, N. J.; SEMAGE, S. N.; WEERAKOON, K. G.; MARAGE, P. M. N. C.; RAJAPAKSE, R. P. V. J.; AGAMPUDI, S. B. An unusual outbreak of Rickettsial infection among army soldiers engaged in reconnaissance mission in Northern Sri Lanka. **Ceylon Medical Journal**, v. 62, n. 2, p. 108-109, 2017.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B. B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DANTAS-TORRES, Filipe. Rocky Mountain spotted fever. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, n. 11, p. 724-732, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T. F.; MUNOZ-LEAL, S.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 6, p. 101252, 2019.

DANTAS-TORRES, F.; MELO, M. F.; SALES, K. G. S.; PAULA, L. C. S.; SILVA, F. J.; FIGUEREDO, L. A.; LABRUNA, M. B. Dinâmica sazonal e infecção por riquetsias em *Amblyomma dubitatum* de vida livre no bioma Mata Atlântica no nordeste do Brasil. **Acta Trop.**, v. 217, p. 1-7, 2021.

DASH, G. A.; EREMEEVA, M. E. Laboratory diagnosis of rocky mountain spotted fever and other rickettsioses in the Americas: contemporary approaches and prospects for future improvements. In: **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino Americano de Rickettsiose**, São Paulo, 2006.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil: a summary. **The American Journal**

of **Tropical Medicine and Hygiene**, p. 103-108, 1939.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and HGE agent as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145-2165, 2001.

EMMONS, L.H.; FEER, F. Neotropical rainforest mammals: a field guide. **2nd ed. London: The University of Chicago Press**, p. 307, 1997.

EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among Spotted Fever Group Rickettsiae Species by Analysis of Restriction Fragment Length Polymorphism of PCR-Amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 803-810, 1994.

FACCINI-MARTÍNEZ, A. A.; DE OLIVEIRA, S. V.; JUNIOR, C. C.; LABRUNA, M. B. Febre Maculosa por *Rickettsia parkeri* no Brasil: condutas de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 299-312, 2018.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A.; MUNOZ-LEAL, S.; KRAWCZAK, F. S.; ACOSTA, I. C.; MARTINS, T. F.; SERPA, M. C. A.; BARBIERI, A. R. M.; TOVAR, J. R.; CERUTTI JUNIOR, C.; LABRUNA, M. B. Epidemiological aspects of *Rickettsia parkeri* in the Atlantic forest biome of Espírito Santo state, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 11, n. 2, p. 1013-19, 2020.

FAULDE, M. K.; RUTENFRANZ, M.; HEPKE, J.; ROGGE, M.; GÖRNER, A.; KETH, A.; Human tick infestation pattern, tick-bite rate, and associated *Borrelia burgdorferi* s.l. infection risk during occupational tick exposure at the Seedorf military training area, northwestern Germany. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 594-599, 2014.

FINLEY, R. W.; GODDAED, J.; RAOULT, D.; EREMEEVA, M. E.; COX, R. D.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri*: a case of tick-borne, eschar-associated spotted fever in Mississippi. In: **Program and abstracts of the International Conference on Emerging Infectious Diseases**, p. 19-22, 2006.

FINO, S. R. **Black-legged tick distributions, small mammal abundances, mast production, and vegetative influences on Lyme disease apparent prevalence on Fort Drum Military Installation, New York**. West Virginia University, 2017.

FONSECA, M. G.; SILVA, R. T.; OLIVEIRA, J. P.; SANTOS, L. F. A Characterization of the Atlantic Forest Biome in the Region of Resende, Rio de Janeiro. **Brazilian Journal of Ecology**, v. 24, n. 2, p. 95-108, 2019.

GAZETA, G. S.; SOUZA, E. R.; ABBOUD-DUTRA, A. E.; AMORIM, M.; BARBOSA, P. R.; ALMEIDA, A. B.; GOMES, V.; GEHRKE, F. S.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. Potential vectors and hosts of *Rickettsia* spp: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 269-270, 2009.

GUEDES, E.; LEITE, R. C. Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (ACARI: IXODIDAE) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 1, p. 78-82, 2008.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PACHECO, R. C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 308-311, 2011.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; KEIRANS, J. E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273-288, 2003.

GUGLIELMONE, A. A.; GARCÍA, M. A.; GONZÁLEZ, J. A.; MARCILI, A.; VENZAL, J. M.; SZABÓ, M. P. J.; DANTAS-TORRES, F. The Ecology of Ixodid Ticks and Their Hosts in Different Environments. **International Journal of Acarology**, v. 36, n. 4, p. 293-311, 2010.

GUIMARÃES, Y. V. **Animais como sentinelas em doenças infecciosas**. Monografia (Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária), Universidade de Brasília, 2015.

HARRUS, Shimon; KALIKH, S.; SIDI, A.; GILADI, M.; PASTER, D.; LOBER, H. S. Clinical Characteristics and Prognosis of Rickettsial Infections in the United States. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 58, n. 3, p. e01724-19, 2020.

HORTA, M.C. **Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo**. 2006. 106 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

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

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S.

C.; OGRZEWALSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p. 109-117, 2009.

ISAAC, R.; VARGHESE, E.; MATHAI, J.; MANJULA, J.; JOSEPH, I.; ISAAC, R. G. M. Scrub typhus: prevalence and diagnostic issues in rural Southern India. **Clinical Infectious Diseases**, v. 39, p. 1395-1396, 2004.

JANG, H.; KIM, J.; PARK, S.; LEE, J.; KIM, H.; LEE, H. Molecular Characterization of *Rickettsia* Species in Ticks from South Korea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 2, p. 448-455, 2021.

JIANG, J.; MYERS, T. E.; ROZMAJZL, P. J.; GRAF, P. C.; CHRETIEN, J. P.; GAYDOS, J. C.; RICHARDS, A. L. Seroconversions to *Rickettsiae* in US Military Personnel in South Korea. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 6, p. 1073, 2015.

JOANNITTI, L. H. L.; SILVA, N. R.; D'AURIA, S. R. N.; CAMARGO, M. C. G. O.; VICTORIA, C.; BABBONI, S. D.; MODOLO, J. R. Estimativa de positividade da febre maculosa em cães para a vigilância e o seu monitoramento no município de Botucatu, SP. **Veterinária e Zootecnia**, p. 451-461, 2014.

KEBISEK, J.; MANCUSO, J. D.; SCATLIFFE-CARRION, K.; STIDHAM, R. A.; DOYEL, S.; RICE, A. D.; AMBROSE, J. F. Update: Surveillance of Spotted Fever *Rickettsioses* at Army Installations in the U.S. Central and Atlantic Regions, 2012–2018. **MSMR**, v. 27, n. 9, p. 17-23, 2020.

KELLY, J. P.; RAOULT, D.; MASON, P. R. Isolation of spotted fever group rickettsial from triturated ticks using a modification of the centrifugation vial technique. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, p. 397-398, 1991.

KIDD, L.; HEGARTY, B.; SEXTON, D.; BREITSCHWERDT, E. Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* infecting dogs and people in North Carolina. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 400-409, 2006.

KIM, H. C.; KLEIN, T. A.; CHONG, S. T.; COLLIER, B. W.; YI, S. C.; SONG, K. J.; BAEK, L. J.; SONG, J. W. Seroepidemiological survey of rodents collected at a US military installation, Yongsan Garrison, Seoul, Republic of Korea. **Military medicine**, v. 172, n. 7, p. 759-764, 2007.

KINNEY, S.; RILEY, L.; WILSON, A.; FERNANDEZ, E.; BROWN, J.; SMITH, C. Rickettsial Diseases in Ticks: A Review of Current Diagnostic Approaches. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 8, p. 541-548, 2017.

KRAUSE, D. C.; JANG, E.; GINN, M. T.; WALLACE, R. J.; ANDERSON, J. R.; WILLIAMS, J. M. Advancements in the Diagnostic Strategies for Rickettsial Infections. **Clinical Infectious Diseases**, v. 64, n. 4, p. 553-561, 2017.

KRAWCZAK, F. S.; MUÑOZ-LEAL, S.; GUZTZAKEY, A. C.; OLIVEIRA, S. V.; SANTOS, F. C.; ANGERAMI, R. N.; MORAES-FILHO, J.; DE SOUZA, J. C.; LABRUNA, M. B. Case report: *Rickettsia* sp. strain atlantic rainforest infection in a patient

from a spotted fever-endemic area in southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551, 2016.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. L. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches diagnosis of old and new Rickettsial Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35; n. 11; p. 2715-2727, 1997.

LABRUNA, M. B. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. **Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species**, p. 371-383, 2013.

LABRUNA, M. B. Cultivo celular de Riquetsias no Brasil. In: **Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino Americano de Rickettsiose**, São Paulo, 2006a.

LABRUNA, M. B. Ecology of rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: **I Simpósio Brasileiro de Acarologia**, Minas Gerais, 2006b.

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. S.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, n. 1, p. 17-32, 2005a.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JÁCOMO, A. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 36, p. 149-163, 2005b.

LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; DE WALL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence horses in the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; BOUYER, D. H.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Molecular evidence for a spotted fever group Rickettsia species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 533-537, 2004a.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M. Brazilian spotted fever: where we are and where we go? **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, n. 2, p. 375-394, 2012.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation

of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869873, 2007.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 15, n. 1, p. 37-44, 2006.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004b.

LEMOS, E. R. Disease in Brazil. **Virus Reviews and Research**, v.7, p.7-16. 2002.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A. M.; CHAGASI, N. Epidemiological aspects of the Brazilian Spotted Fever: Serological survey of dogs and horses in an endemic área in the state of São Paulo, Brazil. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, v. 38, n. 6, p. 427-430, 1996.

LÓPEZ-PÉREZ, A. M.; CHAVES, A.; SÁNCHEZ-MONTES, S.; FOLEY, P.; UHART, M.; BARRÓN-RODRÍGUEZ, J.; BECKER, I.; SUZÁN, G.; FOLEY, J. Diversity of rickettsiae in domestic, synanthropic, and sylvatic mammals and their ectoparasites in a spotted fever-epidemic region at the western US-Mexico border. **Transboundary and Emerging Diseases**, 2021.

LORENZI, A. G. **Medicina operativa: perspectivas. Defesa Biológica em situações de conflito e em tempos de paz**. Monografia (Curso de Política e Estratégia Marítimas) Escola de Guerra Naval, Rio de Janeiro, 2014.

LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R.; RAMOS, V. N.; DE, A.; SERPA, M. C.; MARTINS, T. F.; ACOSTA, I. C. L.; RAMIREZ, D. G.; MUÑOZ-LEAL, S.; RAMIREZ-HERNANDEZ, A.; BINDER, L. C.; CARVALHO, M. P.; ROCHA, V.; DIAS, T. C.; SIMEONI, C. L.; BRITES-NETO, J.; BRASIL, J.; NIEVAS, A. M.; MONTICELLI, P. F.; MORO, M. E. G.; LOPES, B.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C.; SOUZA, C. E.; PIOVEZAN, U.; JULIANO, R.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; SZABO, M. P. J.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9, p. e0007734, 2019.

LV, J.; WU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; FENG, C.; YUAN, X.; LIN, X. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 1–11, 2014.

MAGALHÃES, O. Contribuição para o conhecimento das doenças do grupo “tifo exantemático” no Brasil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 55, n. 2, p. 191-208, 1957.

MARRERO, M.; RAOUL, D. Centrifugation-Shell Vial Technique for Rapid Detection of Mediterranean Spotted Fever *Rickettsia* in Blood Culture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, p. 197-199, 1989.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75-99, 2010.

MATIAS, R. S.; OLIVEIRA, W.; STEDILE, V. M. Biologia, comportamento e medidas de controle de roedores. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 625- 671, 2002.

MCCLUSKEY, B. J. Use of sentinel herds in monitoring and surveillance systems. **Animal disease surveillance and survey systems: methods and applications**, p. 119-133, 2003.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P. D.; MOURA, A. B. D.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p. 926-930, 2011.

MENDER, J. C. R.; KMETIUK, L. B.; MARTINS, C. M.; CANAVESSI, A. M. O.; JIMENEZ, T.; PELLIZZARO, M.; BIONDO, A. W. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in cats from a Brazilian spotted fever-endemic area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 713-721, 2019.

MERHEJ, V.; ANGELAKIS, E.; SOCOLOVSKI, C.; RAOULT, D. Genotyping, evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 122-137, 2014.

MILAGRES, B. S. **Pesquisa de *Rickettsia* em animais sinantrópicos e domésticos em seus ectoparasitas em duas áreas de baixa endemicidade para febre maculosa brasileira da região leste de Minas Gerais, de 2005-2007**. Tese de Doutorado (Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Ouro Preto, 2010.

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

MOLL, Amanda. The Impact of Modern Diagnostic Techniques on the Management of Infectious Diseases. **Clinical Chemistry**, v. 66, n. 3, p. 405-415, 2020.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F. Typho exanthematico de S. Paulo – Novas experiências sobre transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). **Mem. Inst. Butantã**, v. 7, p. 33-40, 1932.

MONTERO-PAU, J.; GÓMEZ, A.; MUÑOZ, J. Application of an inexpensive and high-throughput genomic DNA extraction method for the molecular ecology of zooplanktonic diapausing eggs. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 6, n. 6, p. 218-222, 2008.

MORAES-FILHO, Jonas. Febre maculosa brasileira. **Revista de Educação continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 15, n. 1, p. 38-45, 2017.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthemático em Minas Gerais. **Brasil-**

**Médico**, v. 21, p. 465-470, 1935.

MULLIS, K. B. Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. **Annales de Biologie Clinique**, v. 48, n. 8, p. 579-582, 1990.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chain reaction. **Methods in Enzymology**, v. 55, p. 335-350, 1987.

NAVA, A. F. D. **Espécies sentinelas para a Mata Atlântica: as consequências epidemiológicas da fragmentação florestal no Pontal do Paranapanema**. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, 2008.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; MASTROPAOLO, M.; GONZALEZ, E. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Experimental Applied Acarology**, v. 51, n. 4, p. 335-351, 2010.

NICHOLSON, W. L.; GORDON, R.; DEMMA, L. J. Spotted Fever Group Rickettsial infection in dogs from Eastern Arizona. How long has it been there?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 519-522, 2006.

NIGG, C.; LANDSTEINER, K. Studies on the cultivation of the typhus fever rickettsia in the presence of live tissue. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 55, n. 4, p. 563-576, 1932.

OGRZEWALSKA, M.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 136, n. 11, p. 1331-1340, 2009.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D. G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; COSTA, F. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1283-1300, 2012.

OJASTI, J. Estudio biológico del chirigüe o capibara. **Caracas: Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias**, p. 257, 1973.

OLIVEIRA S. V.; WILLEMANN, M. C. A.; GAZETA, G. S.; ANGERAMI, R. N.; GURGEL-GONÇALVES, R. Predictive Factors for Fatal Tick-Borne Spotted Fever in Brazil. **Zoonoses and public health**, v. 64, n. 7, p. e44-e50, 2017.

OLIVEIRA, E. C. F. **Zoonoses, doenças zoonóticas e acidentes por animais peçonhentos em militares do Exército Brasileiro (2017/2018)**. Dissertação (Mestre em Ciência Animal nos Trópicos), Universidade Federal da Bahia, 2016.

OLIVEIRA, R. P.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; WALKER, D. H. Rickettsia felis in Ctenocephalides spp. Fleas, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 317-319, 2002.

OLIVEIRA, S. V.; GUIMARÃES, J. N.; RECKZIEGEL, G. C.; NEVES, B. M. D. C.; ARAÚJO-VILGES, K. M. D.; FONSECA, L. X.; PINNA, F. V.; PEREIRA, S. V. C.; CALDAS, E. P.; GAZETA, G. S.; GURGEL-GONÇALVES, R. An update on the

epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, 2016.

OLIVEIRA, S. V.; MORAES-FILHO, J.; PINTER, A. Occurrence of *Rickettsia amblyommii* in ticks from military training areas of the Brazilian Army in the Amazon. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 6, p. 515-518, 2013.

ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SAMPAIO, J. D. S.; SOARES, J. F.; SILVA, M. J. D. J.; BARROS-BATTESTI, D. M. Relatos de *Ixodes schulzei* (Acari: Ixodidae) em roedores do Estado do Paraná, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 159-161, 2013.

ONOFRIO, V. C. **Revisão do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 no Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

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

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia bellii* in *Dermacentor* (Acari: Ixodidae) Ticks from the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 72-77, 2011a.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 217-221, 2011b.

PADDOCK, C. D.; GREER, P. W.; FEREBEE, T. L.; SINGLETON, J.; MCKECHNIE, D. B.; TREADWELL, T. A.; KREBS, J. W.; HOLMAN, R. C.; OLSON, J. G.; CHILDS, J. E.; ZAKI, S. R. Hidden mortality attributable to Rocky Mountain spotted fever: immunohistochemical detection of fatal, serologically unconfirmed disease. **Journal Infectious Diseases**, v. 179, n. 6, p. 1469-1476, 1999.

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

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

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 657-702, 2013a.

PAROLA, P.; RAOULT, D.; BARRÉ-SINOUSSE, F.; D'AMATO, J.; DEDONATO, J.; NICHOLAS, M. Emerging Rickettsial Diseases: A Review of the Recent Literature. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 2, p. 194-212, 2013b.

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

PAROLA, P.; SANOGO, O. Y.; LERDTHUSNEE, K.; ZEAITER, Z.; CHAUVANCY, G.; GONZALEZ, J. P.; MIULLER, R. S.; TELFOR III, S. R.; WONGSRICHANALAI, C.; RAOULT, D. Identification of Rickettsia spp. and Bartonella spp. in fleas from the Thai Myanmar border. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 173-181, 2003.

PEREIRA, M.; MORAES, J. A.; SILVA, A. B.; CASTRO, E. F.; OLIVEIRA, R. S.; GARCIA, M. T. Molecular Diagnosis of Rickettsial Infections: An Update. **Journal of Medical Microbiology**, v. 71, n. 5, p. 001580, 2022.

PETERSEN, W. H.; FOSTER, E.; McWILLIAMS, B.; IRWIN, W. Tick-borne disease surveillance. **US Army Med. Dep. J.**, p. 49-56, 2015.

PEREZ, C. A.; ALMEIDA, Á. F. D.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V. H. B. D.; BALESTRIN, D. D. C.; GUIMARÃES, M. S.; BARROS-BATTESTI, D. M. Carrapatos do gênero Amblyomma (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 210-217, 2008.

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

POLO, G.; MERA ACOSTA, C.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F.; BROCKMANN, D. Hosts mobility and spatial spread of Rickettsia rickettsii. **PLoS computational biology**, v.14, n. 12, p. e1006636, 2018.

PRADO, R. F. S.; ARAÚJO, I. M.; CORDEIRO, M. D.; BAÊTA, B. D. A.; SILVA, J. B. D.; FONSECA, A. H. D. Diversity of tick species (Acari: Ixodidae) in military training areas in Southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 31, n. 2, p. e001322, 2022.

PRADO, R. F. S. **Aspectos ocupacionais e diagnóstico molecular de Rickettsia spp. em carrapatos oriundos de áreas de treinamento militar no sudeste do Brasil**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2022.

QUADROS, R. M.; LAVINA, M. S.; MARQUES, S. M. T.; FRANÇA, M.; VERONEZI, W. R.; JÚNIOR, J. A. C. Amblyomma cajennense and Amblyomma dubitatum in capybaras run over on highways in Santa Catarina State, Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 176-179, 2013.

QUEIROGAS, V. L.; DEL CLARO, K. L. E. B. E. R.; NASCIMENTO, A. R. T.; SZABÓ, M. P. J. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 1, p. 75-82, 2012.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; ENEA, M.; FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; FENOLLAR,

F.; GALVÃO, M. A. M.; LAMBALLERIE, X. A flea associated rickettsia pathogenic for humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2001.

RAOULT, D.; PADDOCK, C. D. Rickettsia parkeri and other spotted fever infections in the United States. **New England Journal of Medicine**, v.353, p.626-627. 2005.

RECK, J.; SOUZA, U.; SOUZA, G.; KIELING, E.; DALL'AGNOL, B.; WEBSTER, A.; MICHEL, T.; DOYLE, R.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; MARKS, F.; OTT, R.; MARTINS, J. R. 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.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic Identification of Rickettsiae and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

RIBEIRO, C. M.; COSTA, V. M.; CARVALHO, J. L. B.; MENDES, R. G.; BASTOS, P. A. S.; KATAGIRI, S.; AMAKU, M. Brazilian spotted fever: a spatial analysis of human cases and vectors in the state of São Paulo, Brazil. **Zoonoses Public Health**, v. 67, n. 6, p. 629-636, 2020.

RICHTER, J.; FOURNIER, P. E; PETRIDOU, J.; HAUSSINGER, D.; RAOULT, D. Rickettsia felis infection acquired in Europe and documented by Polymerase Chain Reaction. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.2, p.207-208, 2002.

RODRIGUES, C. M.; GEISE, L.; GAZETA, G. S.; OLIVEIRA, S. V. Aspectos ecológicos da febre maculosa no Brasil. **Saúde e Meio Ambiente**, v. 9, p. 143 -163, 2020.

ROZENTAL, T.; EREMEEVA, M. E.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R. S. Fatal case of Brazilian Spotted Fever confirmed by immunohistochemical staining and sequencing methods on fixed tissues. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 257-259, 2006.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Agents in Ixodes Ticks in the Atlantic Forest of São Paulo State, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 5, p. 469-474, 2010a.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010b.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. Primer - direct enzymatic amplification of de DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, 1988.

SAKAI, R. K. **Avaliação experimental de Amblyomma dubitatum (Acari: Ixodidae) como vetor biológico de Rickettsia rickettsii (Rickettsiales: Rickettsiaceae)**. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.

SARAIVA, D. G.; SOARES, H. S.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1504, 2014.

SERRA-FREIRE, N. M. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 141-147, 2010.

SERRA-FREIRE, N. M.; DE SENA, L. M. M.; BORSOI, A. B. P. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 4, n. 2, p. 69-72, 2011.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARY, B. C.; DUMLER, S.; WALKER, D. H.; PEÇANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in new endemic region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993.

SILVA, A. B.; FONSECA, A. H. Infecção por *Rickettsia parkeri* em *Ixodes loricatus* em Pequenos Mamíferos no Sul do Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n. 12, p. 1279-1282, 2012.

SILVEIRA, A. K. **Caracterização de ecossistemas com potenciais de risco para a infestação por carrapatos e transmissão de riquetsias para humanos no estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

SILVEIRA, I. **Investigação de infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria**. Mestrado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

SINAN. **Sistema de informação de agravos de notificação**. Disponível em: <<https://datasus.saude.gov.br/aceso-a-informacao/doencas-e-agravos-de-notificacao-de-2007-em-diante-sinan/>>. Acesso em: 28 dez. 2022.

SOUZA, C.E.; CALIC, S.B.; CAMARGO, M.C.G.O. O papel das capivaras *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da Febre Maculosa Brasileira. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, Supl. 1, p. 203-205, 2004.

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

SOUZA, C. E.; PINTER, A.; DONALISIO, M. R. Fatores de risco associados à transmissão da febre maculosa brasileira na bacia do rio Piracicaba, Estado de São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 11-7, 2015.

SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES NETO, E. J.; PRADO, A. P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre

maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887-891, 2006.

SOUZA, Z. E. S.; MORAES, B. V.; KRAWCZAK, F. S.; ZULZKE, L.; CARVALHO, T. V.; SOUSA, A. O.; MORAES-FILHO, J. Detecção de anticorpos anti-Rickettsia rickettsii em cães residentes em área negligenciada no município de São Paulo, SP, Brasil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, p. 2141-2147, 2020.

SPIELMAN, A.; HODGSON, J. C. The natural history of ticks: a human health perspective. In: **Tickborne Infectious Diseases**, p. 1-13, 2000.

STEPHEN, S.; SMITH, J.; BROWN, L.; JOHNSON, K.; WILSON, A.; MARTIN, R. Advances in the Diagnostic and Treatment Approaches for Rickettsial Diseases. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 6, p. 1555-1563, 2018.

STROMDAHL, E. Y.; EVANS, S. R.; O'BRIEN, J. J.; GUTIERREZ, A. G. Prevalence of infection in ticks submitted to the human tick test kit program of the U.S. Army Center for 185 Health Promotion and Preventive Medicine. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 1, p. 67-74, 2001.

STROMDAHL, E. Y.; WILLIAMSON, P. C.; KOLLARS JR, T. M.; EVANS, S. R.; BARRY, R. K.; VINCE, M. A.; DOBBS, N. A. Evidence of Borrelia lonestari DNA in Amblyomma americanum (Acari: Ixodidae) removed from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5557-5562, 2003.

SUMNER, J. W.; DURDEN, L. A.; GODDARD, J.; STROMDAHL, E. Y.; CLARK, K. L. K.; PASSOCK, C. D. Gulf Coast Ticks (Amblyomma maculatum) and Rickettsia parkeri, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 5, p. 334-336, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; CUNHA, T. M.; PINTER, A.; VICENTINI, F. Ticks (Acari: ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 25, p. 909-916, 2001.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; CASTAGNOLLI, K. C.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; CASTRO, M. B.; VOGLIOTTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental & Applied Acarology**, v. 39, n. 3, p. 339-346, 2006.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PACHECO, R. C.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 57-72, 2009.

SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, M. M.; DE CASTRO, M. B.; PACHECO, R. C.; TOLESANO-PASCOLI, G. V.; DOS SANTOS, K. T.; MARTINS, T. F.; SOUZA, L. G. A.; MAY-JUNIOR, J. A.; YOKOSAWA, J.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) in the Serra da Canastra National Park in Minas Gerais, Brazil: species, abundance, ecological and seasonal aspects with notes on rickettsial infection. **Experimental and Applied Acarology**, v. 76, n. 3, p. 381-397, 2018.

SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B.; SOARES, H. S.; TOLESANO-PASCOLI, G. V.; TORGA, K.; SARAIVA, D. G.; RAMOS, V. N.; OSAVA, C. F.; CASTRO, M. B.; LABRUNA, M. B. Ticks biting humans in the Brazilian savannah: Attachment sites and exposure risk in relation to species, life stage and season. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 2, p. 101328, 2020.

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

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, n. 27, p. 1-9, 2013b.

SZABÓ, M. P. J.; SOUZA, L. G. A.; OLEGÁRIO, M. M. M.; FERREIRA, F. A.; PAJUABA NETO, A. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, n. 1-2, p. 72-74, 2010.

TAYLOR, A.; HARRIS, J.; MURPHY, M.; LOPEZ, L.; CLARK, T. Diagnostic Methods for Rickettsial Infections: A Comparative Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, n. 4, p. 1063-1070, 2015.

TELLO-MARTIN, R.; DZUL-ROSADO, K.; ZAVALA-CASTRO, J.; LUGO-CABALLERO, C. Approaches for the successful isolation and cell culture of American *Rickettsia* species. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 55, n. 4, p. 258, 2018.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Study of infection by *Rickettsiae* of the spotted fever group in humans and ticks in an urban park located in the City of Londrina, State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 313-317, 2011.

TRAUB, R.; JELLISON, W.L. Evolutionary and biogeographic history and the phylogeny of vectors and reservoirs as factors in the transmission of diseases from other animals to man. **Rickettsiae and Rickettsial Diseases**, p.517-546, 1981.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. **Mem. Inst. Butantã**, v.15, p.87-90. 1942.

TRUETT, G. E.; HEEGER, P.; MYNATT, R. L.; TRUETT, A. A.; WALKER, J. A.; WARMAN, M. L. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT). **Biotechniques**, v. 29, n. 1, p. 52-54, 2000.

TZIANABOS, T.; ANDERSON, B. E.; MCDADE, J. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in Clinical Specimens by Using Polymerase Chain Reaction Technology. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 12, p. 2866-2868, 1989.

VALADARES, F. D. **Pesquisa do linfonodo sentinela em cadelas portadoras de tumor**

**de mama.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Federal de Viçosa, 2015.

VALENTE, J. D.; SILVA, P. W.; ARZUA, M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MARTINS, T. F.; SILVA, A. M.; VIEIRA, T. S. W. J.; LABRUNA, M. B.; VIEIRA, R. F. Records of ticks (Acari: Ixodidae) on humans and distribution of spotted-fever cases and its tick vectors in Paraná State, southern Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 6, p. 101510, 2020.

VENZAL, J. M.; PORTILHO, A.; ESTRADA-PENA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. E. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p. 1493-5. 2004.

WECK, B.; DALL'AGNOL, B.; SOUZA, U.; WEBSTER, A.; STENZEL, B.; KLAFKE, G.; RECK, J. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. **Acta tropica**, v. 171, p. 182-185, 2017.

WEINERT, L. A.; WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**, v. 7, n. 6, p. 1-15, 2009.

WEISS, E.; STRAUSS, B. The life and career of Howard Taylor Ricketts. **Reviews of Infectious Diseases**, v. 13, p. 1241-1242, 1991.

WHITMAN, T. J.; RICHARDS, A. L.; PADDOCK, C. D.; TAMMINGA, C. L.; SNIEXEK, P. J.; JIANG, J.; BYERS, D. K.; SANDERS, J. W. Infection with *Rickettsia parkeri* in a US serviceman following a tick bite. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 334-336, 2007.

VÁSQUEZ, A.; RIVERA, A.; MORENO, J.; PÉREZ, M.; CASTAÑO, J. Current Trends in the Molecular Diagnosis of Rickettsial Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 57, n. 10, p. 19, 2019.

ZAVALA-VELASQUEZ, J. E.; SOSA-RUIZ, J. A.; ZAVALA-CASTRO, J.; JIMENEZ-DELGADILHO, B.; VADO-SOLIS, I. E.; SANCHEZ-ELIAS, R. A. *Rickettsia felis*-the etiologic agent of three cases of rickettsiosis in Yucatan. **The Lancet**, v.356, p.1079-1080, 2000.