



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS ANIMAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

KALIANE ALESSANDRA RODRIGUES DE PAIVA

***Rickettsia* sp. EM ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES DO RIO GRANDE DO
NORTE, BRASIL**

MOSSORÓ-RN
2016

KALIANE ALESSANDRA RODRIGUES DE PAIVA

***Rickettsia* sp. EM ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Maria Mendes Ahid - UFERSA

Co-orientador: Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira - UFERSA

MOSSORÓ-RN
2016

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

P14r Paiva, Kaliane Alessandra Rodrigues da.
Rickettsia sp. em roedores e marsupiais
silvestres do Rio Grande do Norte, Brasil / Kaliane
Alessandra Rodrigues da Paiva. - 2016.
60 f. : il.

Orientadora: Sílvia Maria Mendes Ahid.
Coorientador: Moacir Franco de Oliveira.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2016.

1. Animais silvestres. 2. Marsupial. 3. Roedor.
4. Rickettsia. 5. Soropositividade. I. Ahid, Sílvia
Maria Mendes, orient. II. Oliveira, Moacir Franco
de, co-orient. III. Título.

KALIANE ALESSANDRA RODRIGUES DE PAIVA

***Rickettsia* sp. EM ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

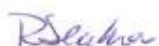
Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), como exigência final para obtenção do título de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal.

Aprovada em: 22 / 02 / 2016.

BANCA EXAMINADORA



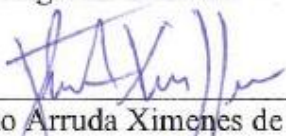
Profa. Dra. Sílvia Maria Mendes Ahid (UFERSA)
Presidente - Orientadora



Profa. Dra. Rita de Maria Seabra Nogueira (UEMA)
Primeiro Membro



Prof. Dr. Carlos Iberê Alves Freitas (UFERSA)
Segundo Membro



Prof. Dr. José Ticiano Arruda Ximenes de Lima (UFERSA)
Terceiro Membro

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

KALIANE ALESSANDRA RODRIGUES DE PAIVA, nasceu no dia 14 de janeiro de 1984, na cidade de Natal/RN. Coursou o ensino médio no Colégio Comercial Cenecista Augusto Severo (Parnamirim-RN), concluindo no de 2001. Iniciou o ensino superior em agosto de 2004, na Universidade Potiguar (UNP), onde graduou-se em Ciências Biológicas, concluindo em junho de 2008. Em adição estagiou no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA/RN), durante todo o curso de graduação. Em junho de 2008, iniciou o curso de Especialização em Educação e Sustentabilidade Ambiental, na Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN), concluindo em outubro de 2009. Ingressou em março de 2014 no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), na linha de pesquisa Sanidade Animal. No decorrer do curso de mestrado, foi bolsista CAPES, realizou estágio em docência na disciplina de Parasitologia Animal, turmas Medicina Veterinária e Zootecnia. Iniciou a carreira profissional no ano de 2008, atuando como docente na disciplina de Biologia na Escola Municipal Joana de Souza Ribeiro e, em julho de 2010 na disciplina de Ciências da Natureza no Programa Nacional de Inclusão de Jovens Projovem Urbano da Fundação Guimarães Duque (Mossoró-RN).

Ao meu pai, Raimundo Bessa de Paiva, que por muitos anos, venceu dificuldades junto comigo e com seu exemplo de vida, me concedeu subsídios para a conclusão dessa etapa (*In Memoriam*).

A minha mãe, Lucia Maria Rodrigues de Paiva, que me fornecendo amor, amizade e a esperança de ótima realização em toda pesquisa e apoiou-me em momentos difíceis.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me fornecer saúde e proteção nos momentos difíceis e permitir a conclusão dessa etapa especial da minha vida;

Agradeço a minha família, com suas sabedorias e intelecções fez-me sentir capaz para alcançar e finalizar os objetivos e metas, configurada nessa trajetória acadêmica;

Agradeço a Orientadora Profa. Dra. Sílvia Maria Mendes Ahid, com sua sabedoria, paciência e dedicação, me concedeu a oportunidade de ingressar no curso de Pós-Graduação em Ciência Animal, a nível de mestrado, e base teórica para o desenvolvimento da pesquisa e conclusão dos resultados;

Agradeço ao Prof. Dr. Moacir Franco de Oliveira pela coorientação;

Agradeço ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna e equipe Dr. Marcos Gomes e Dr. Jonas Moraes-Filho, que disponibilizaram os laboratórios e auxiliaram na realização das análises sorológicas e moleculares do material coletado durante toda a pesquisa;

Agradeço aos Professores, Dr. Lionel Segui e Dr. Michael Hrnir, que disponibilizaram a área de estudo (TRIPOL) e laboratórios da Fazenda Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural doSemi-Árido, para o desenvolvimento da pesquisa de campo;

Agradeço a Banca Examinadora por contribuir nas discussões e melhoria do projeto;

Agradeço aos meus Amigos integrantes do Laboratório de Parasitologia Animal, Josivania Pereira, Aliona Fonseca, Guilherme Sodré, Janilene de Oliveira, Wesley Coelho, Rosivaldo Keffer, Hilgarde Pessoa e Lara Fernandes, por ajudarem em todas as etapas de desenvolvimento do projeto de pesquisa.

***Rickettsia* sp. EM ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES DO RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL**

PAIVA, Kaliane Alessandra Rodrigues de. ***Rickettsia* sp. em roedores e marsupiais silvestres do Rio Grande do Norte, Brasil.** 2016. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), Mossoró - RN, Brasil, 2016.

RESUMO: *Rickettsia* são patógenos com potencial zoonótico transmitidos por animais silvestres e domésticos, onde a ocorrência de infecções por *Rickettsia* spp. acontece entre populações de roedores e marsupiais silvestres, os quais tem relevante participação na manutenção do ciclo desses microrganismos no ambiente silvestre. Desta forma, esse estudo objetivou registrar a ocorrência de *Rickettsia* sp. em roedores e marsupiais silvestres no semiárido do Rio Grande do Norte. O trabalho consistiu em uma pesquisa de campo, com roedores e marsupiais silvestres, com os dados expressos em frequência simples e porcentagem através do programa estatístico IBM SPSS (Armonk, NY: IBM Corp.), versão 22.0. Foram capturados nas armadilhas Sherman e Tomahawk, 02 *Thrichomys*, 03 *Wiedomys*, 30 *Gracilinanus agilis* e 06 *Monodelphis domestica*, dos quais foram coletados por venopunção da veia jugular, 36 amostras de sangue de marsupiais e 05 de roedores. Destes foram coletados 64 *Amblyomma auricularium*, 07 *Amblyomma parvum* e 12 *Amblyomma* sp. Foram obtidas por centrifugação 36 amostras de soros de marsupiais e 05 de roedores e analisadas utilizando a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). Todos os exemplares de *A. auricularium*, *Amblyomma* sp. e *A. parvum* foram macerados e submetidos a extração de DNA e amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) direcionados para um fragmento dos genes *gltA* e *ompA rickettsial*. Das amostras de soro obtidas do sangue de roedores e marsupiais silvestres e testadas na RIFI, apresentaram soropositividade para *Rickettsia amblyommii*, 6,7% de *G. agilis*, 83,3% *M. domestica* e 50% *Thrichomys*. Oito exemplares de *A. auricularium* estavam positivos para *R. amblyommii* na análise de fragmentos dos genes *gltA* (350 pb) e *ompA* (587 pb), com 100% de similaridade com Candidatus *R. amblyommii* estirpe Bahia e AaPE, correspondendo a uma baixa circulação do agente dentre os vetores e elevada entre a população de *M. domestica*. Esta pesquisa registra pela primeira vez a ocorrência de *R. amblyommii* em marsupiais das espécies *G. agilis* e *M. domestica* pertencentes a família Didelphidae e roedores da família Echimyidae do gênero *Thrichomys*, no semiárido do Rio Grande do Norte, Brasil.

Palavras-chave: Animais silvestres. Marsupial. Roedor. *Rickettsia*. Soropositividade.

***Rickettsia* sp. IN WILD RODENTS AND MARSUPIALS OF RIO GRANDE DO NORTE, BRAZIL**

PAIVA, Kaliane Alessandra Rodrigues de. ***Rickettsia* sp. in wild rodents and marsupials of Rio Grande do Norte, Brazil**. 2016. 60f. Dissertation (Master's degree in Animal Sciences) - Graduate Program in Animal Sciences, Federal Rural University of the Semiarid (UFERSA), Mossoró – RN, Brazil, 2016.

ABSTRACT: *Rickettsia* are pathogens with zoonotic potential transmitted by wild and domestic animals, where the occurrence of infections by *Rickettsia* spp. It happens among populations of wild rodents and marsupials, which has a significant share in the maintenance cycle of these microorganisms in the wild environment. Thus, this study aimed to record the occurrence of *Rickettsia* sp. in wild rodents and marsupials in the Rio Grande do Norte semi-arid. The work consisted in a field research with wild rodents and marsupials, with data expressed in simple frequency and percentage using IBM SPSS (Armonk, NY: IBM Corp.), version 22.0. Were captured in Sherman and Tomahawk traps, 02 *Thrichomys*, 03 *Wiedomys*, 30 *Gracilinanus agilis* and 06 *Monodelphis domestica*, which were collected by venipuncture of jugular vein, 36 blood samples of marsupials and 05 of rodents. These were collected 64 *Amblyomma auricularium*, 07 *Amblyomma parvum* and 12 *Amblyomma* sp. Were obtained by centrifugation 36 samples of sera marsupials and 05 rodents and analyzed using Immunofluorescence Assay (IFA). All copies of *A. auricularium*, *Amblyomma* sp. and *A. parvum* were macerated and submitted to DNA extraction and amplification by Polymerase Chain Reaction (PCR) directed to a fragment of *gltA* and *ompA* rickettsial genes. Of serum samples obtained from wild rodents and marsupials blood and tested in IFA showed seropositivity for *Rickettsia amblyommii*, 6.7% *G. agilis*, 83.3% *M. domestica* and 50% *Thrichomys*. Eight samples of *A. auricularium* were positive for genes in *R. amblyommii* fragment analysis *gltA* (350 bp) and *ompA* (587 bp) with 100% similarity to Candidatus *R. amblyommii* Bahia and AaPE strain, corresponding to a low circulation agent from the vectors and high among the population of *M. domestica*. This research records for the first time the occurrence of *R. amblyommii* in marsupial species *G. agilis* and *M. domestica* belonging to Didelphidae family and Echimyidae family rodents *Thrichomys* genre, in the semiarid region of Rio Grande do Norte, Brazil.

Keywords: Wild animals. Marsupials. Rodents. *Rickettsia*. Seropositivity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. Área total (485 ha) da fazenda (retângulo amarelo). Fragmento de 26 hectares da fazenda, local onde ocorreu as coletas de campo (retângulo menor vermelho) 24
- Figura 2 - Distribuição dos seis transectos (linhas estruturadas com pontos amarelos direcionadas na vertical e horizontal) em um fragmento de 26 hectares, compreendendo a Trilha dos Polinizadores (TRIPOL) da Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil 25
- Figura 3 - Armadilhas utilizadas na captura dos roedores e marsupiais silvestres. A. Sherman; B. Tomahawk 26
- Figura 4 - Contenção mecânica dos roedores e marsupiais silvestres no ponto de apoio. A. Retirada do animal capturado da armadilha Sherman; B. Contenção física manual do animal; C. Pesagem do animal 27
- Figura 5 - Técnica de marcação dos roedores e marsupiais silvestres. A. Marcação do animal, usando um alicate específico para marcação de pequenos mamíferos; B. Animal com brinco de marcação 27
- Figura 6 - Procedimento da coleta de sangue em roedores e marsupiais silvestres. A. Tricotomia; B. Coleta de sangue por venopunção da veia jugular 28
- Figura 7 - Soltura dos roedores e marsupiais silvestres. A. Animal em caixa de espera, para reabilitação e avaliação dos parâmetros vitais; B. Ponto de captura do animal; C. Animal solto no ponto de captura após recuperação anestésica 29
- Figura 8 - Reação de Imunofluorescência Indireta das amostras de soro dos roedores e marsupiais silvestres. A. Adição de 20 µl dos conjugados anti-gambá para marsupiais e anti-camundongo para roedores nas amostras de soro em cada poço da lâmina; B. Microscópio de Imunofluorescência utilizado para análise de *Rickettsia* nas amostras de soro, Obj. 40x; C. Visualização das amostras de soro com os conjugados, marcadas com isotiocianato de fluoresceína 30
- Figura 9 - Visualização em gel de agarose na eletroforese da integridade do DNA assegurada por 16S rRNA mitocondrial de carrapato 31
- Figura 10 - Espécies de roedores silvestres encontradas na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. A. *Wiedomys* sp.; B. *Thrichomys* sp. 32

Figura 11 - Espécies de marsupiais silvestres encontradas na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. A. *Gracilinanus agilis*; B. *Monodelphis domestica* 32

Figura 12 - Reação de Imunofluorescência Indireta para *Rickettsia amblyommii* em marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. A. Titulação 128 em *Gracilinanus agilis* (seta preta); B. Titulação 8192 em *Monodelphis domestica* (seta vermelha) 36

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Captura e recapturas dos roedores e marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil, durante os seis meses de pesquisa de campo 33

Tabela 2 - Espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados em roedores e marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil 34

Tabela 3 - Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta com titulação reagente para antígenos derivados das cinco espécies de *Rickettsia* isoladas no Brasil, em roedores e marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil 35

Tabela 4 - Sororeatividade para as cinco espécies de *Rickettsia* isoladas no Brasil em roedores e marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil 36

Tabela 5 - Análise molecular de fragmentos dos genes *gltA* (350pb) e *ompA* (587pb) para *Rickettsia amblyommii* em larvas e ninfas de *Amblyomma auricularium*, *Amblyomma parvum* e *Amblyomma* sp. encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil 37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
3 REVISÃO DE LITERATURA	15
3.1 GÊNERO <i>Rickettsia</i>	15
3.2 SUSCEPTIBILIDADE DE ROEDORES E MARSUPIAIS À INFECÇÕES POR <i>Rickettsia</i> MEDIADA PELO PARASITISMO DE CARRAPATOS	17
3.3 COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE <i>Rickettsia</i> EM IXODÍDEOS, ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES	20
3.4 OCORRÊNCIA DE <i>Rickettsia</i> EM ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES	21
3.5 DIAGNÓSTICO DAS RICKETTSIOSES	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 LOCAL DA PESQUISA E ANIMAIS CAPTURADOS	24
4.2 ARMADILHAS E SESSÕES DE CAPTURA	25
4.3 CONTENÇÃO DOS ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES	26
4.4 MARCAÇÃO DOS ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES	27
4.5 COLETA DE SANGUE	28
4.6 SOLTURA DOS ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES	28
4.7 ANÁLISES DE <i>Rickettsia</i> NAS AMOSTRAS DE SORO	29
4.8 COLETA, IDENTIFICAÇÃO TAXONOMICA DOS CARRAPATOS E ANÁLISE DE <i>Rickettsia</i>	30
4.9 ANÁLISES DOS DADOS	31
5 RESULTADOS	32
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÕES	48
REFERÊNCIAS	49
ANEXOS	58

1 INTRODUÇÃO

A fauna silvestre apresenta uma grande diversidade de espécies de mamíferos, dentre as quais, estão registradas 1750 espécies de roedores e 262 espécies de marsupiais no mundo (COLAZO; CASTRO, 1997; CASAGRANDE et al., 2009). No Nordeste brasileiro existem 30 gêneros de roedores e 11 gêneros de marsupiais, com hábitos noturnos, encontrados nos biomas Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (FREITAS, 2012), mas se adaptam em outros ambientes com facilidade (ALMEIDA et al., 2013).

Em condições climáticas adversas, como seca prolongada, ou com aumento da ação antrópica sobre o ambiente silvestre, os roedores e marsupiais migram para outros lugares em busca de alimento e abrigo que favoreça à sua sobrevivência, constituindo-se importantes indicadores da qualidade do ambiente (SANTOS-FILHO et al., 2006; FACURE; RAMOS, 2011).

A rápida adaptação dos roedores e marsupiais a qualquer ambiente e ao hábito de viverem em árvores e tocas, favorecem a infestação por carrapatos do gênero *Amblyomma* e consequente contágio de múltiplas infecções por espécies de *Rickettsia* (DANTAS-TORRES et al., 2012), ocorrendo com frequência, nos períodos de maior atividade animal e exploração ambiental, já que o parasitismo está associado com a sazonalidade, área corporal do animal e com ambiente em que o animal se encontra, seja rural, urbano, cativo ou habitat natural (VALIM et al., 2004; PEREIRA et al., 2012).

As principais espécies de *Rickettsia* que são transmitidas por carrapatos do gênero *Amblyomma* a roedores e marsupiais silvestres são as pertencentes ao Grupo Febre Maculosa, podendo destacar *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia rhipicephali* (HORTA et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011; SZABÓ et al., 2013; NUNES et al., 2015).

As espécies de *Rickettsia* do Grupo Febre Maculosa são ecologicamente importantes, por apresentarem uma extensa distribuição geográfica em diferentes biomas e ecossistemas (LABRUNA et al., 2008; MIRANDA et al., 2011; LABRUNA et al., 2014; WACHTER et al., 2015), além de infectarem as diversas espécies de *Amblyomma*, vetores potenciais para a sua propagação, através de uma alta eficiência de multiplicação que mantem no organismo desses carrapatos, de modo a realizar transmissão transtestadial e transovariana (VÉLEZ et al., 2012; SARAIVA et al., 2013). Já no organismo dos roedores e marsupiais silvestres se adaptam facilmente tornando-se não patogênica, constituindo hospedeiros reservatórios amplificadores desses patógenos (MILAGRES et al., 2010; SZABÓ et al., 2013).

Dessa forma, as infestações por carrapatos do gênero *Amblyomma* em roedores e marsupiais silvestres, torna-se um problema de importância epidemiológica para as várias regiões do Brasil, uma vez que, são potenciais vetores na transmissão de rickettsioses aos animais e seres humanos, causando desde infecções brandas até as letais (MOURA-MARTINIANO et al., 2014; MCINTOSH et al., 2015).

As infecções por *Rickettsia* foram descritas em marsupiais do gênero *Didelphis* e *Monodelphis*, assim como em roedores dos gêneros *Akodon*, *Hydrochaeris* e *Euryoryzomys* na região Sudeste (SOUZA et al., 2009; MILAGRES et al., 2010; SZABÓ et al., 2013), em roedores do gênero *Hydrochaeris* na região Sul (FORTES et al., 2011) e por *Chaetomys* e *Coendou* no Nordeste do Brasil (MCINTOSH et al., 2015). A maior ocorrência de infecções por *Rickettsia* spp. acontece entre populações de marsupiais, tornando-os importantes hospedeiros reservatórios amplificadores desses patógenos no Brasil e com relevante participação na manutenção do ciclo desses microrganismos no ambiente silvestre (SARAIVA et al., 2013).

Contudo, não há registros de infecções por *Rickettsia* em roedores e marsupiais silvestres no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. Desta forma, considerando o potencial zoonótico de *Rickettsia* e a importância de roedores e marsupiais silvestres na transmissão e disseminação de *Rickettsia* no Brasil, esse estudo objetivou registrar a ocorrência de *Rickettsia* sp. em roedores e marsupiais silvestres no semiárido do Rio Grande do Norte.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Estudar a ocorrência de *Rickettsia* sp. em roedores e marsupiais silvestres da Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró/RN.

2.2 ESPECÍFICOS

- a) Identificar as espécies do gênero *Rickettsia* presentes nos roedores e marsupiais silvestres;
- b) Associar a soropositividade para *Rickettsia* sp. com infestações por carrapatos em roedores e marsupiais silvestres.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 GÊNERO *Rickettsia*

Os microrganismos do gênero *Rickettsia* taxonomicamente são classificados no filo Proteobacteria, classe Alphaproteobacteria, ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae (MORAES-FILHO et al., 2009). Morfologicamente são caracterizadas como cocobacilos gram negativas, medem 0,8 a 2 μm de comprimento e 0,3 a 0,5 μm de diâmetro, possuem parede celular com peptidoglicano e lipopolissacarídeos e a membrana apresenta as proteínas rOmp, com diferentes pesos moleculares, que constituem os principais antígenos usados na classificação das diferentes espécies (BLANTON et al., 2014).

As espécies de *Rickettsia* para sobreviverem utilizam oxigênio, se multiplicam por fissão binária simples no citoplasma de células teciduais de animais e nos artrópodes parasitam glândulas salivares, ovários, intestino, túbulos de malpighi e hemolinfa, além disso, são capazes de se movimentarem dentro das células infectadas através de filamentos de actina. Essas características lhes conferem um comportamento semelhante ao de vírus e bactérias, tornando-os diferentes dos demais microrganismos (QUINTERO et al., 2013).

As espécies patogênicas de *Rickettsia* estão divididas em três grupos, conforme os padrões antigênicos, moleculares e ecológicos: grupo do Tifo, Febre maculosa e Tifo rural ou grupo ancestral. As espécies pertencentes ao grupo do Tifo são *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; no grupo Febre maculosa estão compreendidas mais de 23 espécies, dentre elas - *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia africae*; no Tifo rural ou grupo ancestral compreende a espécie *Rickettsia tsutsugamushi*, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* (MORAES-FILHO et al., 2009; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2014; GALVÃO et al., 2014).

Esses grupos de *Rickettsia* são distinguidos molecularmente por dois genes: citrato sintase (gltA) e proteína externa de membrana A (ompA), sendo o primeiro, presente em todas as espécies de *Rickettsia* e o segundo encontrado nas espécies do Grupo Febre Maculosa (QUINTERO et al., 2013). Sobretudo, tais grupos podem ser diferenciados pela presença de lipopolissacarídeos, forma de multiplicação na célula hospedeira, sintomatologia clínica e hospedeiros definitivos (WALKER et al., 2003; FENG et al., 2004).

O Grupo do Tifo apresenta em poucas espécies lipopolissacarídeos e se multiplicam na célula hospedeira continuamente até o rompimento total, podendo causar o

Tifo murino e Tifo epidêmico (WALKER, 2007). O Tifo murino é uma infecção decorrente do parasitismo de *R. typhi*, que desencadeia em humanos, febre, cefaleia, mialgias, artralgias, náuseas, vômitos e em 18% dos casos surgem máculas na região torácica. Foi considerada uma epidemia em 1926, por Maxcy (GODINHO et al., 2002). O Tifo epidêmico é uma doença humana, cujo agente é a *R. prowazekii*, geralmente provoca febre, cefaleia, erupção cutânea, dor abdominal, hepatoesplenomegalia, sendo os sintomas muito semelhante a leptospirose (URIBE et al., 2006). Foi identificada em refugiados na guerra do leste europeu no início da década de 1950 e houve relatos no final do século 19 e início do século 20 (GALVÃO et al., 2005). Para a propagação dessas doenças, esses microrganismos têm como vetores sifonápteros (pulga) e ftirápteros (pioelho) (MILAGRES et al., 2010; BARBIERI et al., 2014).

O Grupo Febre Maculosa, diferente do Grupo do Tifo, apresenta em todas as espécies lipopolissacarídeos e os microrganismos se propagam nas células sem causar destruição, resultando na Febre Maculosa (WALKER et al., 2003). A Febre maculosa é uma infecção aguda de caráter multissistêmico, ocasionada pelo microrganismo *R. rickettsii*, no qual desenvolve sintomas como febre alta, dores musculares, cefaleia e petequias cutâneas ascendentes por todo o corpo em 80% dos casos, com prognóstico variável (GALLETTI et al., 2013; NASSER et al., 2015). É uma enfermidade relatada nos Estados Unidos desde 1873, com grande taxa de letalidade. No Brasil teve sua primeira descrição em 1930 no estado de São Paulo em áreas periurbanas e atualmente é uma doença com ocorrência em Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro, com letalidade de 32% (PINTER; LABRUNA, 2006; TELFORD, 2014; NASSER et al., 2015). A transmissão do agente etiológico ocorre por meio de ixodídeos, sifonápteros e ácaros (MILAGRES et al., 2010; BARBIERI et al., 2014).

O grupo do Tifo rural desencadeia o Tifo do mato, enfermidade causada pelo microrganismo *R. tsutsugamushi*, que raramente apresenta risco a vida do ser humano. Esta doença tem ocorrência no Japão, Coreia e extremo Oriente da Rússia, não havendo nenhum registro no Brasil (SHELITE et al., 2016). Esta doença apresenta como vetores piolhos, pulgas e ácaros da família Trombiculidae, o qual são importantes ectoparasitas que afetam o humano (HERRERO et al., 2010).

O grupo ancestral representado por *R. bellii* e *R. canadensis*, normalmente não é patogênico para os animais e humanos, apesar de análises sorológicas comprovarem a exposição dos animais ao agente (OGRZEWALSKA et al., 2012). Entretanto, estudo sobre evolução e epidemiologia dessas espécies de *Rickettsia*, tem demonstrado, quando associadas a ixodídeos, podem desencadear doença em humano semelhante as provocadas pelas espécies

do grupo Febre Maculosa (MERHEJ et al., 2014). Os vetores desses microrganismos envolvem 11 linhagens de artrópodes, alguns pertencentes aos gêneros *Amblyomma*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Demacentor*, *Argas* e *Ornithodoros* (OGRZEWALSKA et al., 2012; BARBIERI et al., 2014).

As doenças decorrentes de microrganismos do gênero *Rickettsia* apresentam relevante importância para a saúde pública e meio ambiente, por acometer não só humanos, mas animais domésticos, sinantrópicos e silvestres, promovendo o estabelecimento desses agentes infecciosos na natureza (SOUSA et al., 2008; GALVÃO; PADILHA, 2013).

3.2 SUSCEPTIBILIDADE DE ROEDORES E MARSUPIAIS À INFECÇÕES POR *Rickettsia* MEDIADA PELO PARASITISMO DE CARRAPATOS

Os roedores e marsupiais silvestres em seu ambiente natural frequentemente sofrem infecções múltiplas por várias espécies de *Rickettsia*, podendo desenvolver sintomas característicos de rickettsiose ou serem reservatórios amplificadores (MIRANDA et al., 2011). A resposta imunológica específica desenvolvida frente as infecções dos patógenos e a toxina do parasita liberada durante a hematofagia é o mecanismo responsável por tornar esses animais reservatórios amplificadores ou desencadear a doença no curso da infecção (PARIZI et al., 2007). A resposta imunológica específica utiliza anticorpos com receptores específicos para a região mais imunogênica do patógeno, devido a receptores de reconhecimento padrão (PRRs) para sequências moleculares específicas presentes nos microrganismos, denominadas padrão molecular associado a patógenos (PAMPs), na qual é garantida com a imunidade inata, que atua como o primeiro sistema de destruição dos microrganismos, por ativar a imunidade celular e humoral (PAIVA-OLIVEIRA et al., 2012).

Mesmo com a imunidade inata ativada, a susceptibilidade dos roedores e marsupiais silvestres, se estabelece conforme o parasitismo das espécies de carrapato, pois para realizar seu comportamento hematófago, com duração superior a 14 dias, desenvolvem mecanismos para modular muitos dos processos fisiológicos dos seus hospedeiros, como a vasoconstrição, a inflamação e a resposta imunológica, permitindo o aumento de intervalo de tempo de ativação da resposta imune inata e adaptativa (DAIX et al., 2007; PARIZI et al., 2007).

Os carrapatos da família Ixodidae apresentam em sua saliva a proteína Salp15, a qual durante a hematofagia é secretada no organismo dos animais, sendo capaz de promover alterações na resposta imune induzida por linfócitos T, por meio de co-receptores específicos

para este tipo de célula, tornando o animal imunossuprimido, como também causando vasodilatação, com isso, auxilia na sua fixação ao hospedeiro, até a próxima fase de seu ciclo de vida e, permite a transmissão de patógenos (MEJRI; BROSSARD, 2007).

Os processos de vasodilatação exacerbada e imunossupressão causada no hospedeiro pela Salp15, acontece por meio de ligações específicas desta proteína com as glicoproteínas de superfície de células T tipo CD4, que atuam como co-receptores do receptor de células T (ANGUITA et al., 2002). Essa interação acarreta na repressão da produção de interleucina-2 no desenvolvimento da resposta imune (JUNCADELLA et al., 2007), a qual atua como fator de crescimento de células T durante o reconhecimento de antígenos na fase de ativação da resposta imune adaptativa. Por essa razão, os patógenos conseguem infectar o animal facilmente no período de alimentação dos carrapatos (RINCÓN et al., 2007; HUANG; AUGUST, 2016).

Cada espécie de carrapato desenvolve mecanismos fisiológicos distintos para invadir e alterar o sistema imunológico dos animais. *Ixodes scapularis* altera o sistema imunológico dos animais através da ação da Salp15, reprimindo intensamente a produção de interleucina-2. *Rhipicephalus appendiculatus* utiliza proteínas que se ligam a histamina e a IgG para subverter o sistema de defesa do hospedeiro e inativar os linfócitos T (PAESEN et al., 1999). A saliva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* age no sistema imune do hospedeiro diferenciando células T CD4⁺ em células Th₁ e Th₂ (CHRISTE et al., 2000). Já a saliva de *Ixodes ricinus* polariza a resposta imune para o tipo Th₂ e reduz a do tipo Th₁, causando um efeito supressivo na imunidade inata dos animais. *Ixodes dammini* contém em sua saliva inibidor da ativação da via alternativa do complemento, comprometendo significativamente a deposição de C3b e a liberação da anafilatoxina C3a (PARIZI et al., 2007).

A variação da virulência de *Rickettsia* e sua modulação no sistema imune dos mamíferos está relacionada ao metabolismo elevado e ao estado de alimentação dos ixodídeos no hospedeiro, pois quando a transmissão desses patógenos ocorre em ixodídeo não ingurgitado é induzida uma resposta imune em animais, sem provocar a doença. Todavia, carrapatos infectados por *Rickettsia* após a hematofagia, desenvolvem infecção no animal. Isso reflete na variação da resposta imune do organismo do hospedeiro ao ser parasitado por diferentes estágios de vida do carrapato, pois acredita que a fonte de alimentação em cada estágio de vida forneça substâncias que inibi o período de dormência celular do patógeno que acontece na diapausa (CARDOSO et al., 2006).

De modo geral, a fixação do carrapato resulta em uma lesão na pele, que desencadeia no hospedeiro ativação do sistema complemento pela resposta da fase aguda, entretanto, esses parasitas liberam substâncias que inibem a via alternativa do sistema complemento, sendo essa ação espécie-específica para parasita-hospedeiro (PARIZI et al., 2007).

Na relação parasita-hospedeiro-patógeno o sistema complemento é importante, pois é o principal mediador humoral do processo inflamatório junto aos anticorpos e, é constituído por proteínas solúveis no plasma e expressas na membrana celular, sendo ativado pelas vias clássica e alternativa (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001).

O sistema complemento exerce a função de formar o complexo lítico de membrana (CLM), que destrói células e participa no processo de opsonização. A opsonização facilita a fixação e reconhecimento das moléculas do sistema complemento na superfície bacteriana, permitindo a fagocitose. Os microrganismos desenvolvem meios diferentes de evitar a opsonização e a ação lítica do sistema complemento, mecanismo conhecido como subversão imune (ITURRY-YAMAMOTO; PORTINHO, 2001). Além disso, os patógenos possuem genes que ativam o mecanismo de supressão imunológica dos hospedeiros, os quais atuam como indutores da produção de interferon gama (IFN gama) e da formação do inflamassoma, ativando diferentes mecanismos de imunidade e processos patológicos distintos, promovendo assim, em alguns casos, a sua disseminação (PAIVA-OLIVEIRA et al., 2012).

As espécies do gênero *Rickettsia* afetam o sistema imunológico dos roedores e marsupiais silvestres, evitando o processo de opsonização, através da ação de interleucina-33, específica de células endoteliais e medeia os seus efeitos biológicos através da interação com os receptores ST2, induz células auxiliares T e mastócitos a produzir citocinas do tipo 2, com isso modula as respostas inflamatórias e desregula as células endoteliais dos tecidos, provocando estresse endotelial celular, apoptose celular e danos nos tecidos (SHELITE et al., 2016). Após esse processo, penetra nas células por meio da sua adesão às células endoteliais de pequenas arteríolas e vénulas, através do receptor prot Ku70, produzindo alterações na membrana, que facilita a sua entrada na célula por fagocitose induzida e realiza sua replicação. Em seguida, rompe a membrana fagossômica, com a liberação de fosfolipase D e hemolisina C, proliferando-se por divisão binária no citosol (HERRERO et al., 2010; MILAGRES et al., 2010).

Rickettsia do grupo Febre Maculosa movimenta-se de célula em célula por meio da reorganização dos filamentos de actina, permitindo que durante esse processo, não causem

lesões celulares. Além disso, são capazes de induzir a ativação do fator nuclear kappa beta ($\text{NF}\kappa\beta$), responsável por inibir a apoptose das células e promover a produção de proteínas (GALVÃO; PADILHA, 2013).

A atividade dos carrapatos e patógenos no hospedeiro, altera intensamente o sistema imunológico dos animais, mas os fatores ecológicos e fisiológicos do hospedeiro exercem também um papel na determinação da suscetibilidade para cada espécie de carrapato e patógeno (LAWRIE et al., 1999). Dependendo da modulação sofrida no sistema imunológico, os roedores e marsupiais silvestres podem ser reservatórios amplificadores, como também, pode desenvolver uma vasculite necrosante generalizada de vênulas e veias, desencadeada pela ativação do sistema complemento e quimiotaxia celular. Concomitante, ocorre ativação do sistema de coagulação e fibrinolítico (MILAGRES et al., 2010). A vasculite culmina num aumento da permeabilidade vascular, que leva a acumulação de fluidos intersticiais nos tecidos vizinhos, originando edema e perda de volume vascular. Juntamente, há um acúmulo de neutrófilos e linfócitos nos vasos. A hipovolemia, hemorragias microvasculares e trombocitopenia são consequências da vasculite. Esse problema atinge a pele, trato gastrointestinal, miocárdio, pulmão, testículos, epidídimo, rim, bexiga, pâncreas, meninges, retina, musculatura lisa e esquelética (GALVÃO; PADILHA, 2013; GALVÃO et al., 2014).

3.3 COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE *Rickettsia* EM IXODÍDEOS, ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES

Os microrganismos do gênero *Rickettsia* para infectar o hospedeiro vertebrado, precisam de um vetor artrópode que esteja em um ambiente com condições climáticas favoráveis para transportá-los e continuar o seu ciclo biológico, que é determinado por três fatores – o vetor primário, o hospedeiro reservatório amplificador e o hospedeiro reservatório transitório (GEHRKE et al., 2013).

A transmissão e sobrevivência de *Rickettsia* acontece por intermédio de vetores invertebrados, como ectoparasitas - piolhos *Polyplax* e *Pediculus*, pulgas *Ctenocephalides*, carrapatos ixodídeos e ácaros *Allodermamyssus* (MILAGRES et al., 2010; GALVÃO et al., 2014). Esses vetores são infectados naturalmente, quando realizam a hematofagia nos hospedeiros riquetsiêmicos.

Nos carrapatos, *Rickettsia* se estabelece no trato digestivo para realizar sua replicação, se espalha e multiplica em outros tecidos, incluindo glândulas salivares e ovários

(PAROLA et al., 2005). Desse modo, as espécies de *Rickettsia* se propagam por transmissão transovariana e transestadial, durante as próximas quatro gerações dos vetores infectados (LABRUNA et al., 2011), como também, os machos podem transferir para as fêmeas através dos fluidos corporais ou dos espermatozoides durante o processo de acasalamento (PAROLA et al., 2005). Além disso, os carrapatos fornecem, a esses patógenos, condições ambientais ideais para sua sobrevivência, pois mesmo em períodos de alimentação escassa ou na ausência, ocorrem alterações morfológicas em *Rickettsia* necessárias para a virulência inicial ser restituída, processo conhecido por reativação (GALLETTI et al., 2013). Com isso os artrópodes participam no ciclo biológico rickettsial, não somente como vetores, mas como reservatório do agente e mantendo-os na natureza (DANTAS-TORRES, 2008).

O ciclo biológico rickettsial continua, quando o ectoparasita infectado, principalmente os carrapatos da família Ixodidae, realiza a hematofagia em um hospedeiro vertebrado (animal doméstico ou silvestre), para continuar se desenvolvendo em outros estágios de vida. Nesse processo, transmite o agente rickettsial através da sua saliva, inoculando diretamente na corrente sanguínea (PAROLA et al., 2005).

Os roedores e marsupiais silvestres quando são infectados por *Rickettsia*, aumenta o potencial de disseminação desse agente, pois participam na maioria dos casos, como reservatórios amplificadores, devido as suas condições biológicas de manter níveis de rickettsémia capazes de infectar os carrapatos, mesmo em um curto período (MILAGRES et al., 2013). Aliado ao sinantropismo elevado em uma região, os roedores e marsupiais silvestres, infectam animais domésticos, como os cães, que são reservatórios transitórios desse agente, por não apresentarem condições ideais para a multiplicação de *Rickettsia* em período de tempo suficiente para infectar outros carrapatos. Contudo são hospedeiros preferenciais do vetor e, assim, carregam para seu domicílio os ectoparasitas infectados, viabilizando o contato do homem com esses vetores e, por conseguinte transmite o agente patogênico, causando uma série de zoonoses, em muitos casos, letais para os seres humanos e animais (MORARU et al., 2013; SARAIVA et al., 2013).

3.4 OCORRÊNCIA DE *Rickettsia* EM ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES

A ocorrência de espécies de *Rickettsia* circulantes entre roedores e marsupiais é elevada (MILAGRES et al., 2013). As principais espécies de *Rickettsia* transmitidas por carrapatos do gênero *Amblyomma* à roedores e marsupiais silvestres pertencem ao Grupo Febre Maculosa, podendo destacar *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. bellii*, *R. felis* e

Rickettsia rhipicephali (HORTA et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011; SZABÓ et al., 2013; NUNES et al., 2015).

No Brasil, *Rickettsia* se distribui entre as regiões Sudeste, Sul e Nordeste, infectando uma vasta biodiversidade de espécies de roedores e marsupiais silvestres, entre elas destacam-se *Didelphis aurita*, *Akodon* sp., *Hydrochaeris hydrochaeris*, *Euryoryzomys russatus*, *Monodelphis* sp., *Gracilinanus* sp., *Rattus rattus*, *Chaetomys subspinosus* e *Coendou insidiosus* (SOUZA et al., 2009; MILAGRES et al., 2010; MCINTOSH et al., 2015).

No estado de São Paulo, Szabó et al. (2013), com pesquisa realizada na Estação Ecológica de Juréia-Itatins no município de Peruíbe, com roedores e marsupiais silvestres, obtiveram resultados sorológicos mais representativos para *Rickettsia* do grupo Febre Maculosa nas espécies *D. aurita* e *Monodelphis* sp., com 100% e 33% soropositividade para *R. rickettsii*, respectivamente. Já Milagres et al. (2013), com pesquisa realizada em Santa Cruz do Escalvado e Pingo D'água, Minas Gerais, demonstraram resultados sorológicos significantes em *R. rattus*, com 94% de soropositividade também para *Rickettsia* do grupo Febre Maculosa. Estudos realizados por McIntosh et al. (2015) na Reserva Biológica de Una (Rebio-Una) e na Reserva Refúgio de Animais Silvestres de Una (Revis-Una), localizadas em Ilheús, Bahia, encontraram em 07 *C. subspinosus* e 06 *C. insidiosus* *R. belli* e *R. amblyommii*. Mesmo em Estados distintos, os animais não desenvolveram sintomas de rickettsiose, conferindo uma significativa participação no ciclo enzoótico e zoonótico dessas doenças nas regiões, uma vez que, os roedores e marsupiais silvestres mantem contatos com os animais domésticos.

Todavia, Blanton et al. (2014), em laboratório demonstraram que *Cavia porcellus* é capaz de desenvolver sintomas de Febre Maculosa, quando infectado somente por uma espécie de *Rickettsia*, com taxa de multiplicação elevada no sangue. Mas, quando ocorria co-infecção com outras espécies de *Rickettsia*, estes animais adquiriram anticorpos para diminuir a infecção da primeira cepa que foi inoculada, pois não apresentaram sintomas da doença, conferindo características de reservatórios amplificadores. Galvão e Padilha (2013) afirmam que as taxas de infecção estão relacionadas com a virulência do patógeno, a susceptibilidade do animal a espécie de *Rickettsia*, a presença de co-infecção e modulação da resposta imune.

3.5 DIAGNÓSTICO DAS RICKETTSIOSES

O diagnóstico das rickettsioses é firmado no histórico da picada pelo carrapato, por sinais clínicos, pelo teste de Imunofluorescência Indireta e técnicas moleculares, como a

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (HERRERO et al., 2010; SOARES et al., 2012; QUINTERO et al., 2013; WILLIAMS-NEWKIRK et al., 2014).

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) fornece um diagnóstico das doenças através da reação entre antígeno-anticorpo, que são determinadas por meio de marcadores que emite uma cor fluorescente no antígeno ou no anticorpo (ALMEIDA; SANTILIANO, 2012). Essa técnica é padrão ouro na detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em animais (AMORIM et al., 2013).

A PCR é um método de diagnóstico direto, por que possibilita a amplificação de sequências de DNA que estejam presentes em misturas complexas e permite estudos de natureza variada, tais como desenvolvimento de métodos de diagnóstico altamente sensíveis e específicos, obtenção de grandes quantidades de DNA para sequenciamento, análises sobre a diversidade genética de populações e diagnóstico de doenças (PADDOCK et al., 2010; KAHN et al., 2013; SUMRANDEE et al., 2014). A PCR é amplamente utilizada na confirmação das espécies de *Rickettsia* presentes em órgãos de animais e no vetor a partir de fragmentos dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* (ŠPITALSKÁ et al., 2015).

Os métodos diagnósticos são importantes, pois auxiliam estudos epidemiológicos em todo o Brasil, permitindo estimar a prevalência das rickettsioses nas diversas regiões do país (TELFORD, 2014).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DA PESQUISA E ANIMAIS CAPTURADOS

A pesquisa foi conduzida na Estação Experimental Rafael Fernandes (Figura 1) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) (05°03'43"S, 37°23'54"W), em Mossoró, estado do Rio Grande do Norte, região Nordeste do Brasil, constituído de clima semiárido, quente e seco, enquadrando-se na classificação climática de Köppen-Geiger como BSw'h', com temperatura média anual de 27°C, umidade relativa do ar de 68,9% e precipitação pluviométrica média anual de 673,9 mm, concentradas em fevereiro a maio e os demais meses (junho a janeiro) marcados por uma longa estação seca (CARMO FILHO et al., 1987).

O estudo foi realizado em período de seca prolongada, com baixa precipitação pluviométrica de 6,1 mm, entre os meses de novembro, dezembro de 2014 e janeiro a abril de 2015, cujas condições climáticas demonstraram temperatura média de 27,9°C e umidade relativa de 71,5%, caracterizando um clima quente e seco.

Figura 1 – Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. Área total (485 ha) da fazenda (retângulo amarelo). Fragmento de 26 hectares da fazenda, local onde ocorreu as coletas de campo (retângulo menor vermelho)



Fonte: <http://www.google.com.br/intl/pt-BR/earth/>

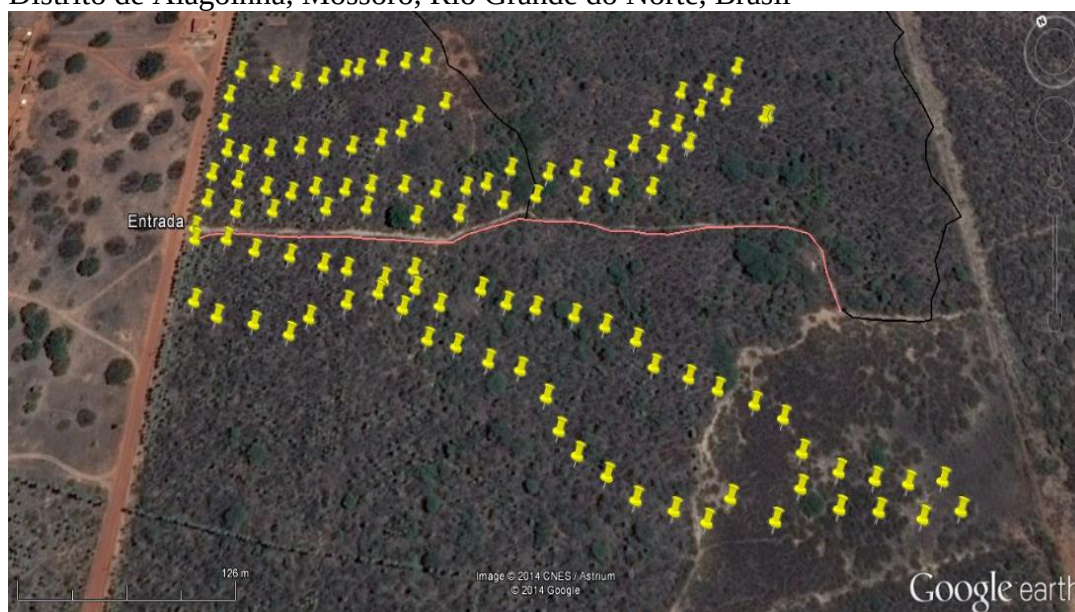
Durante o período de coleta se capturou roedores e marsupiais silvestres, adultos, machos e fêmeas, porém os animais jovens e fêmeas em estágio de prenhes e lactação não passaram por coletas no intuito de evitar estresse.

Esse estudo foi realizado sob aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), sob o Parecer N° 28/2014 (Anexo A) e pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), sob Autorização N° 44685-1 (Anexo B), tendo sido respeitados todos os preceitos éticos de proteção aos animais.

4.2 ARMADILHAS E SESSÕES DE CAPTURA

As capturas dos roedores e marsupiais silvestres foram realizadas em um fragmento de 26 hectares divididos em seis transectos (Figura 2), selecionados aleatoriamente e estruturados em linhas verticais e horizontais com heterogeneidade na quantidade de pontos em cada linha, sendo georeferenciados através do Programa Google Earth (Versão 1.2.3) e GPS (Garmin, modelo Etrex H).

Figura 2 – Distribuição dos seis transectos (linhas estruturadas com pontos amarelos direcionadas na vertical e horizontal) em um fragmento de 26 hectares, compreendendo a Trilha dos Polinizadores (TRIPOL) da Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil

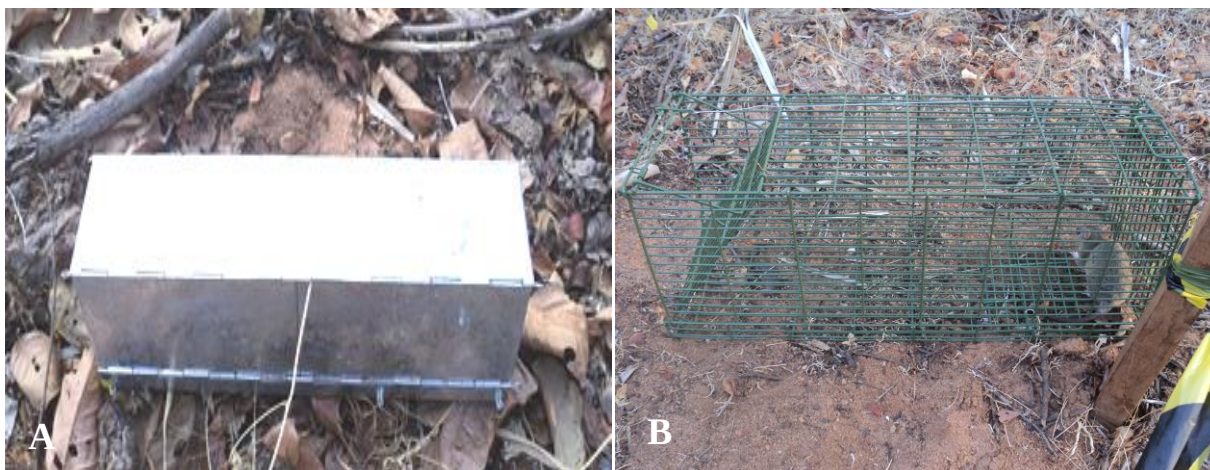


Fonte: Acervo da autora

Durante os meses de coleta, foram colocadas diariamente por seis dias consecutivos 100 armadilhas, sendo 50 do modelo Tomahawk (45 x 15,5 x 17,5cm) e 50 Sherman (31 x 8 x 9cm) (Figura 3), equidistantes 20 m, posicionadas antes do ocaso do sol e verificadas no início da manhã (5 horas), distribuídas em pontos específicos de captura, (KIM et al., 2010).

Mensalmente foram utilizadas 600 armadilhas, totalizando 3.600 ao término do experimento. Para atrair os roedores e marsupiais silvestres foram utilizadas iscas compostas por paçoca de amendoim, sardinha, banana e flocos de milho segundo recomendações descritas por Almeida et al. (2013).

Figura 3 – Armadilhas utilizadas na captura dos roedores e marsupiais silvestres. A. Sherman; B. Tomahawk



Fonte: Acervo da autora

4.3 CONTENÇÃO DOS ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES

Após o procedimento de captura, os animais foram levados ao ponto de apoio, contidos mecanicamente pelo método físico manual e pesados com auxílio de uma balança Pesola com precisão de 5,0 g (Figura 4).

Cetamina e Xilasina foram administradas em associação por via intramuscular nas doses e concentrações de 10 mg/kg (1g/10mL) e 1mg/kg (2g/100mL), respectivamente, utilizando seringa de insulina de 1 mL, com agulha de 0,45 mm (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2008). Confirmado aprofundamento anestésico procedeu-se as coletas dos carrapatos e amostras de sangue.

Figura 4 – Contenção mecânica dos roedores e marsupiais silvestres no ponto de apoio. A. Retirada do animal capturado da armadilha Sherman; B. Contenção física manual do animal; C. Pesagem do animal

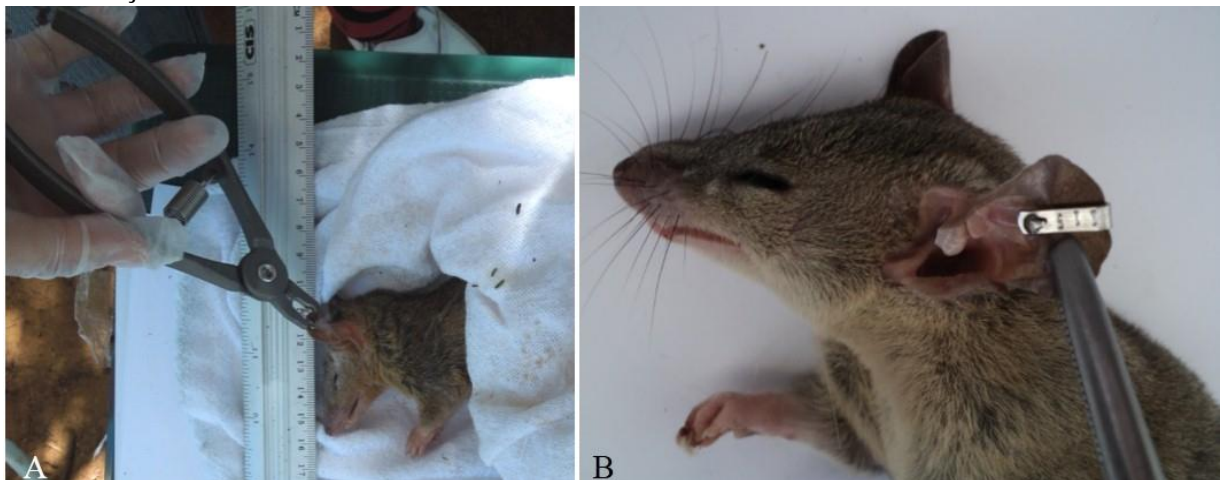


Fonte: Acervo da autora

4.4 MARCAÇÃO DOS ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES

Para evitar a manipulação de animais recapturados no mesmo mês de coleta, todos os animais capturados foram marcados com brincos enumerados no pavilhão auricular esquerdo, seguindo recomendações de Almeida et al. (2013), utilizando material para marcação de pequenos mamíferos (Figura 5). Com base na numeração dos brincos foi estabelecido códigos de marcação para cada animal, sendo realizadas coletas de sangue nos animais recapturados nos meses subsequentes.

Figura 5 – Técnica de marcação dos roedores e marsupiais silvestres. A. Marcação do animal, usando um alicate específico para marcação de pequenos mamíferos; B. Animal com brinco de marcação

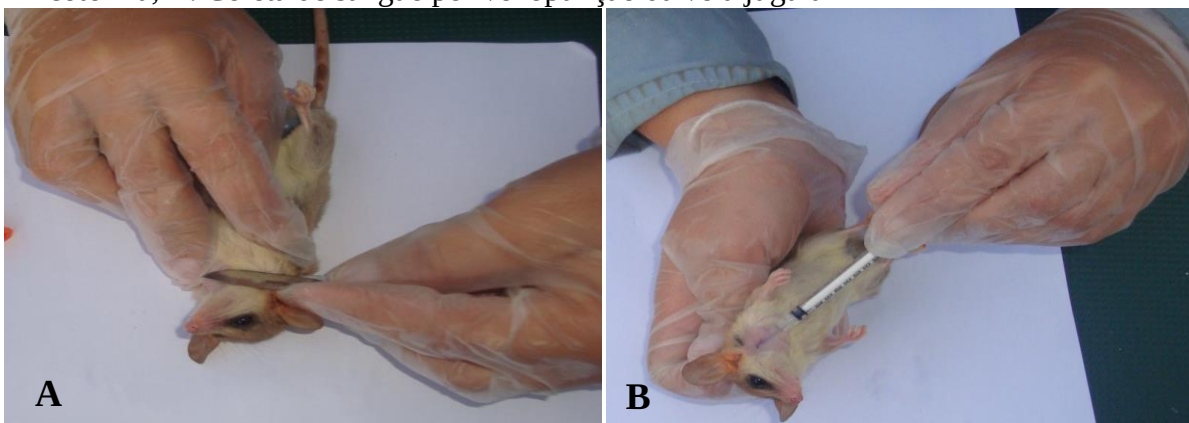


Fonte: Acervo da autora

4.5 COLETA DE SANGUE

Após as contenções mecânica física manual e química, realizou-se a tricotomia e assepsia do local com álcool a 70%. Em seguida, foi coletado 6% do volume de sangue total do peso em gramas em marsupiais e 8% em roedores (FIOCRUZ, 2008), por venopunção da veia jugular, usando uma seringa de insulina 0,5 mL, com agulha de tamanho 0,45 mm, (MORARU et al., 2013). As amostras de sangue foram colocadas em microtúbulos estéreis, acondicionadas em uma caixa térmica refrigeradas com gelo em gel (Figura 6) e armazenadas a -20°C no Laboratório de Parasitologia Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, para posterior análise.

Figura 6 – Procedimento da coleta de sangue em roedores e marsupiais silvestres. A. Tricotomia; B. Coleta de sangue por venopunção da veia jugular



Fonte: Acervo da autora

4.6 SOLTURA DOS ROEDORES E MARSUPIAIS SILVESTRES

Após a coleta de sangue, os animais foram colocados em uma caixa de espera, onde avaliou-se os parâmetros vitais (frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura corporal) e a reabilitação do estado de sedação, constatado pela presença de reflexos protetores (deglutição, reflexo palpebral) e deambulação (TRANQUILLI et al., 2013). Posteriormente procedeu-se a soltura dos animais no ponto de captura (Figura 7).

Realizou-se a identificação taxonômica dos marsupiais através de morfologia, conforme protocolo de Cáceres (2012) e Freitas (2012), e dos roedores de acordo com Reis et al. (2006) e Bonvicino et al. (2008).

Figura 7 – Soltura dos roedores e marsupiais silvestres. A. Animal em caixa de espera, para reabilitação e avaliação dos parâmetros vitais; B. Ponto de captura do animal; C. Animal solto no ponto de captura após recuperação anestésica



Fonte: Acervo da autora

4.7 ANÁLISES DE *Rickettsia* NAS AMOSTRAS DE SORO

As amostras de sangue dos roedores e marsupiais silvestres foram centrifugadas por 10 minutos em 3000rpm no Laboratório da Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, para obtenção do soro. Após, armazenou-se as amostras à -20°C.

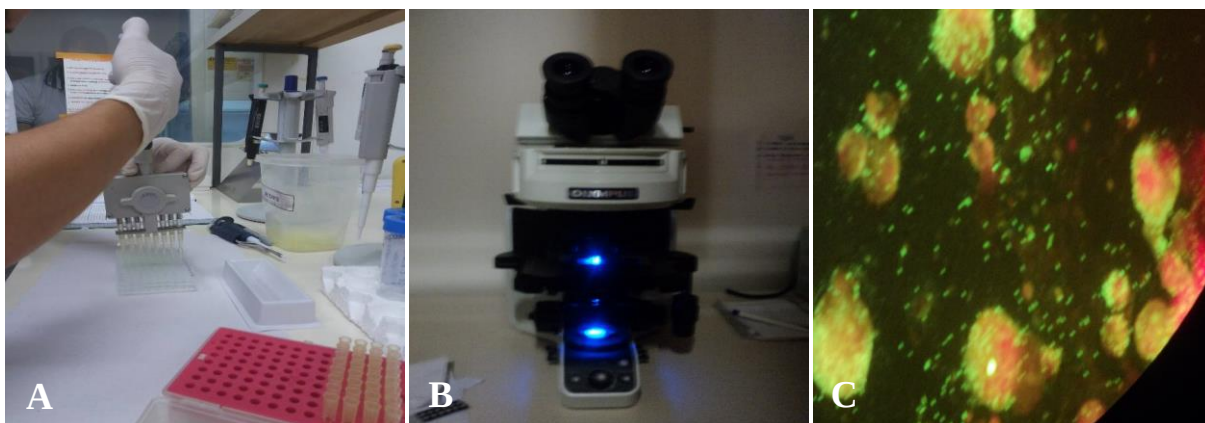
Ao término de todas as coletas de campo, encaminhou-se as amostras para o Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para serem analisadas pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (Figura 8).

Para a realização da RIFI, as amostras de soro foram previamente descongeladas em temperatura ambiente e testadas utilizando antígenos derivados das cinco espécies de *Rickettsia* isoladas no Brasil: *Rickettsia bellii* cepa Mogi, *Rickettsia amblyommii* cepa Ac37, *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ5, *Rickettsia rickettsii* cepa Taiaçu e *Rickettsia parkeri* cepa At24 (LABRUNA et al., 2007), conforme protocolo do Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

Nos processos de triagem e titulação diluiu-se 5 µl das amostras de soro em 315 µl de solução salina tamponada com fosfato (PBS), com diluição inicial 1:64, sendo aplicado em cada lâmina soros previamente testados considerados negativos (controle negativo) e positivos (controle positivo). As amostras de soro positivas para *Rickettsia* na diluição inicial 1:64 foram testadas em diluições seriadas 1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048, 1:4096 e 1:8192, para determinação do título final de reatividade, considerando homólogo para uma

determinada espécie de *Rickettsia*, aquelas amostras que apresentaram títulos quatro vezes maiores quando comparado com as demais espécies testadas. Em ambos os processos, todas as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, com um conjugado anti-gambá (CCZ, São Paulo, Brasil) e anti-camundongo (Sigma, St Louis, MO, EUA) para marsupial e roedor, respectivamente, marcados com isotiocianato de fluoresceína e testados.

Figura 8 – Reação de Imunofluorescência Indireta das amostras de soro dos roedores e marsupiais silvestres. A. Adição de 20 µl dos conjugados anti-gambá para marsupiais e anti-camundongo para roedores nas amostras de soro em cada poço da lâmina; B. Microscópio de Imunofluorescência utilizado para análise de *Rickettsia* nas amostras de soro, Obj. 40x; C. Visualização das amostras de soro com os conjugados, marcadas com isotiocianato de fluoresceína



Fonte: Acervo da autora

4.8 COLETA, IDENTIFICAÇÃO TAXONOMICA DOS CARRAPATOS E ANÁLISE DE *Rickettsia*

As coletas dos carrapatos seguiram recomendações de Pereira et al. (2012), para evitar a perda de estruturas do gnatossoma e foram preservados em álcool etílico absoluto 99,8% P.A, para posterior análises.

Realizou-se a identificação taxonômica dos carrapatos no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, por meio de amplificação por Reação de Cadeia da Polimerase (PCR), utilizando o Kit Wizard Genomic DNA, direcionados para um fragmento do gene 16S rRNA mitocondrial de carrapatos, com os primers 16S+ (F-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT) e 16S- (R-GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT).

Larvas e ninfas de *Amblyomma auricularium*, ninfas de *Amblyomma parvum* e larvas de *Amblyomma* sp. foram submetidas a extração de DNA e amplificação por PCR dos

genes *gltA* e *ompA* rickettsial, utilizando o Kit Wizard Genomic DNA, com primers Rr190.70F e Rr190.701R direcionados para um fragmento do gene *ompA* e dois pares de primer CS-78, CS-323 e CS-239 e CS-1069 para o gene *gltA* (LABRUNA et al., 2004). As amostras produziram amplificações compatíveis com 350 pb do gene citrato sintase (*gltA*) e com 587 pb do gene da proteína da membrana externa (*ompA*). A integridade do DNA foi assegurada para o painel especificidade das preparações de ácidos nucleicos por 16S rRNA mitocondrial de carrapatos, realizando com sucesso detecção do gene rRNA em todas as preparações de DNA por PCR (Figura 9). Todos os produtos de PCR foram sequenciados e os resultados das sequencias foram comparados com os dados do GenBank por análise BLAST.

Figura 9 – Visualização em gel de agarose na eletroforese da integridade do DNA assegurada por 16S rRNA mitocondrial de carrapato



Fonte: Acervo da autora

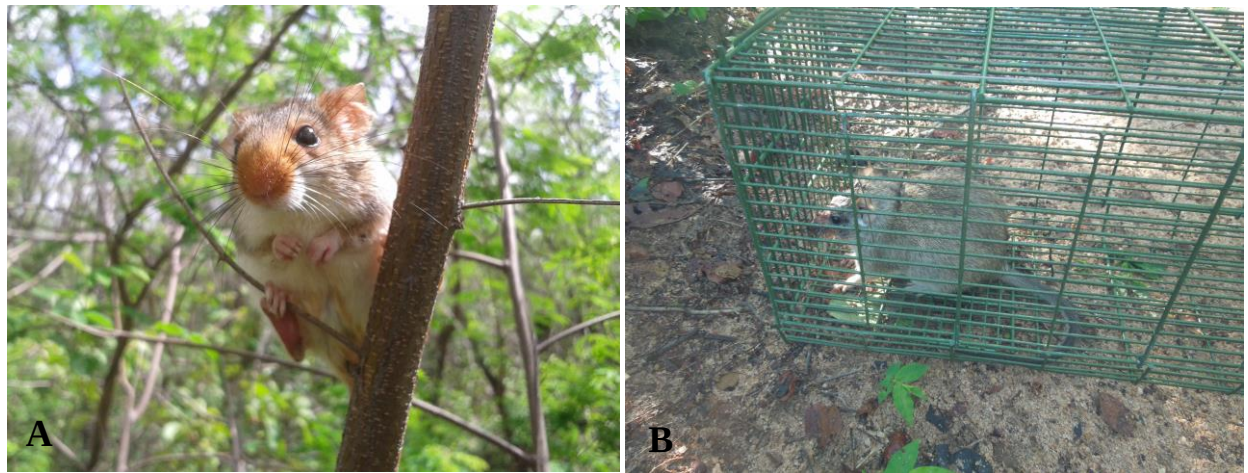
4.9 ANÁLISES DOS DADOS

Os dados foram expressos em frequência simples e porcentagem, seguindo recomendações de Szabó et al. (2013), através do programa estatístico IBM SPSS (Armonk, NY: IBM Corp.), versão 22.0

5 RESULTADOS

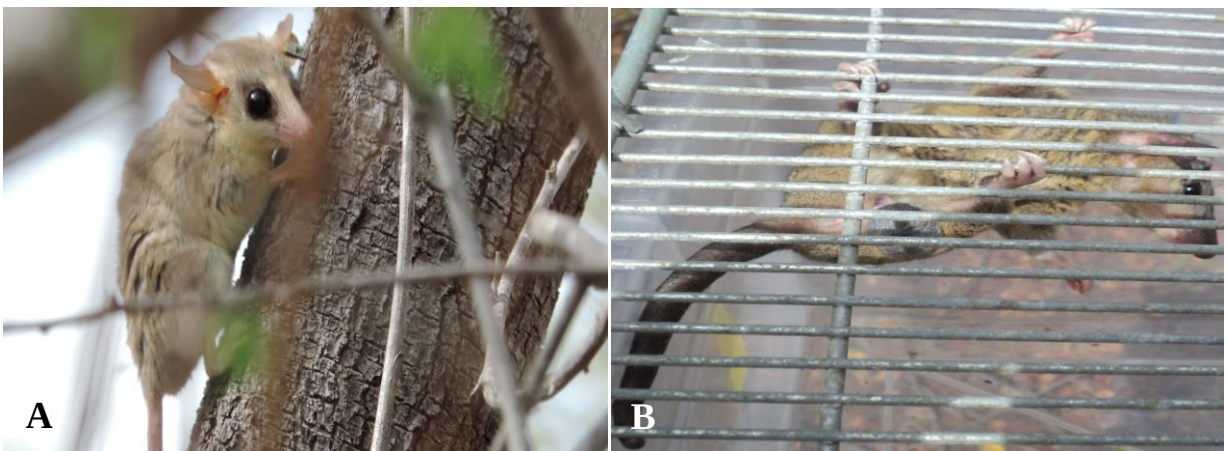
Foram capturados durante toda pesquisa 05 roedores das espécies *Thrichomys* sp. e *Wiedomys* sp. (Figura 10) e 36 marsupiais das espécies *Gracilinanus agilis* e *Monodelphis domestica* (Figura 11), todos adultos, sendo 05 machos de roedores, 28 machos e 08 fêmeas de marsupiais, conforme descrito na Tabela 1. Fêmeas que se encontravam nos estados de prenhes e lactação foram liberadas no ponto de captura, sem realizar a coleta de sangue.

Figura 10 – Espécies de roedores silvestres encontradas na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. A. *Wiedomys* sp.; B. *Thrichomys* sp.



Fonte: Acervo da autora

Figura 11 – Espécies de marsupiais silvestres encontradas na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. A. *Gracilinanus agilis*; B. *Monodelphis domestica*



Fonte: Acervo da autora

Na armadilha do modelo Sherman se capturou 28 *G. agilis*, 04 *M. domestica* e 02 *Wiedomys* sp. Já na Tomahawk, 02 *G. agilis*, 02 *M. domestica*, 02 *Thrichomys* sp. e 01 *Wiedomys* sp. Durante toda pesquisa foi possível recapturar *G. agilis* (A2b113, A1b111, B7b116, A4b58, C7b28), entre os meses de novembro e dezembro de 2015 e janeiro, fevereiro e março de 2016. As recapturas ocorreram nos transectos do lado direito da TRIPOL em pontos próximos e/ou no mesmo ponto (Tabela 1).

Tabela 1 – Captura e recapturas dos roedores e marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil, durante os seis meses de pesquisa de campo

Código do animal	Espécie	Sexo	Ponto de captura/armadilha	Novembro 2014	Dezembro 2014	Janeiro 2015	Fevereiro 2015	Março 2015	Abril 2015
A2b113	<i>Gracilinus agilis</i>	M	16/Sherman	X				X	
A4C5b58	<i>Gracilinus agilis</i>	M	66-91/Sherman			X		X	
A5	<i>Gracilinus agilis</i>	M	13/Sherman					X	
A7	<i>Gracilinus agilis</i>	F	48/Sherman					X	
A8	<i>Gracilinus agilis</i>	F	28/Sherman					X	
B2	<i>Gracilinus agilis</i>	F	55/Sherman						X
C1	<i>Gracilinus agilis</i>	F	35/Sherman						X
C4b103	<i>Gracilinus agilis</i>	M	35/Sherman						X
A1b111	<i>Gracilinus agilis</i>	M	95-97-96/Sherman	X	X		X		
B7b116	<i>Gracilinus agilis</i>	M	99-93/Sherman		X	X			
B9b118	<i>Gracilinus agilis</i>	M	12/Tomahawk		X				
C3b52	<i>Gracilinus agilis</i>	F	63-100/Sherman			X	X		
C4b49	<i>Gracilinus agilis</i>	M	98/Tomahawk			X			
C6b51	<i>Gracilinus agilis</i>	M	31/Sherman			X			
C7b28	<i>Gracilinus agilis</i>	M	66-63/Sherman			X	X		
C9b112	<i>Gracilinus agilis</i>	M	12/Sherman			X			
C10b119	<i>Gracilinus agilis</i>	M	14/Sherman			X			
D2b121	<i>Gracilinus agilis</i>	F	70/Sherman				X		
D3b122	<i>Gracilinus agilis</i>	M	27/Sherman				X		
D5b63	<i>Gracilinus agilis</i>	M	74/Sherman				X		
D7b123	<i>Gracilinus agilis</i>	M	72/Sherman				X		
D8b125	<i>Gracilinus agilis</i>	M	37/Sherman				X		
D9b124	<i>Gracilinus agilis</i>	F	31/Sherman				X		
A6	<i>Monodelphis domestica</i>	M	24/Sherman					X	
C2	<i>Monodelphis domestica</i>	M	24/Sherman						X
B5b115	<i>Monodelphis domestica</i>	M	55/Sherman		X				
B8b117	<i>Monodelphis domestica</i>	M	10/Tomahawk		X				
C8b61	<i>Monodelphis domestica</i>	M	27/Sherman			X			
D1b120	<i>Monodelphis domestica</i>	F	100/Tomahawk				X		
A3Sbe	<i>Thrichomys</i> sp.	M	72/Tomahawk	X					
B3Eu	<i>Thrichomys</i> sp.	M	92/Tomahawk		X				
B4b39	<i>Wiedomys</i> sp.	M	100/Sherman		X				
B1	<i>Wiedomys</i> sp.	M	100/Tomahawk						X
A3	<i>Wiedomys</i> sp.	M	18/Sherman					X	

Entre as espécies de marsupiais capturadas foi possível coletar em *G. agilis* e *M. domestica* carrapatos da espécie *Amblyomma auricularium*, já nas espécies de roedores coletou-se em *Thrichomys* sp. *A. auricularium* e *Amblyomma parvum* e, em *Wiedomys* sp. carrapatos da espécie *Amblyomma* sp. Dentre essas espécies de carrapatos, observou-se múltipla infestação por *A. auricularium* e *A. parvum* em *Thrichomys* sp. (Tabela 2).

Tabela 2 – Espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados em roedores e marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil

Código do animal	Espécie	<i>Amblyomma auricularium</i>		<i>Amblyomma parvum</i>		<i>Amblyomma</i> sp.	
		larvas	ninfas	larvas	ninfas	larvas	ninfas
A2b113	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
A4C5b58	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
A5	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
A7	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
A8	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
B2	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
C1	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
C4b103	<i>Gracilinanus agilis</i>	03	0	0	0	0	0
A1b111	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
B7b116	<i>Gracilinanus agilis</i>	01	0	0	0	0	0
B9b118	<i>Gracilinanus agilis</i>	01	0	0	0	0	0
C3b52	<i>Gracilinanus agilis</i>	02	0	0	0	0	0
C4b49	<i>Gracilinanus agilis</i>	01	0	0	0	0	0
C6b51	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
C7b28	<i>Gracilinanus agilis</i>	03	0	0	0	0	0
C9b112	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
C10b119	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
D2b121	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
D3b122	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
D5b63	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
D7b123	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
D8b125	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
D9b124	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	0	0	0	0
A6	<i>Monodelphis domestica</i>	03	04	0	0	0	0
C2	<i>Monodelphis domestica</i>	0	0	0	0	0	0
B5b115	<i>Monodelphis domestica</i>	0	0	0	0	0	0
B8b117	<i>Monodelphis domestica</i>	14	0	0	0	0	0
C8b61	<i>Monodelphis domestica</i>	10	0	0	0	0	0
D1b120	<i>Monodelphis domestica</i>	10	0	0	0	0	0
A3Sbe	<i>Thrichomys</i> sp.	0	10	0	01	0	0
B3Eu	<i>Thrichomys</i> sp.	02	0	0	06	0	0
B4b39	<i>Wiedomys</i> sp.	0	0	0	0	08	0
B1	<i>Wiedomys</i> sp.	0	0	0	0	0	0

A3	<i>Wiedomys</i> sp.	0	0	0	0	04	0
Total		50	14	0	07	12	0

Dos 41 animais testados na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), 02 roedores apresentaram reatividade na titulação, onde 01 *Thrichomys* sp. apresentou valores de 128 para *Rickettsia amblyommii* e 01 *Wiedomys* sp. com mesmo título para *Rickettsia bellii*. Dentre os marsupiais testados, 07 apresentaram sororeatividade para 04 espécies de *Rickettsia* diferentes, entre esses, 03 *M. domestica* reagiram à antígeno de *R. amblyommii* (8192), *R. bellii* (512) e *Rickettsia rhipicephali* (2048) e 01 *G. agilis* (C3b52) apresentou títulos para *Rickettsia rickettsii* (64), *R. amblyommii* (128) e *R. rhipicephali* (64). Esse *G. agilis* (C3b52) se manteve com soropositividade em janeiro de 2015 e com infestação por *A. auricularium*, mas em fevereiro de 2015, quando foi recapturado, apresentou soronegatividade para as espécies de *Rickettsia* (Tabela 3), como também, não manteve infestação por *A. auricularium*. Os demais animais que ocorreram recapturas apresentaram soronegatividade na RIFI para todas as espécies de *Rickettsia* não sendo possível verificar re-infecção, como também re-infestação por *A. auricularium*.

Tabela 3 – Resultados da Reação de Imunofluorescência Indireta com titulação reagente para antígenos derivados das cinco espécies de *Rickettsia* isoladas no Brasil, em roedores e marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil

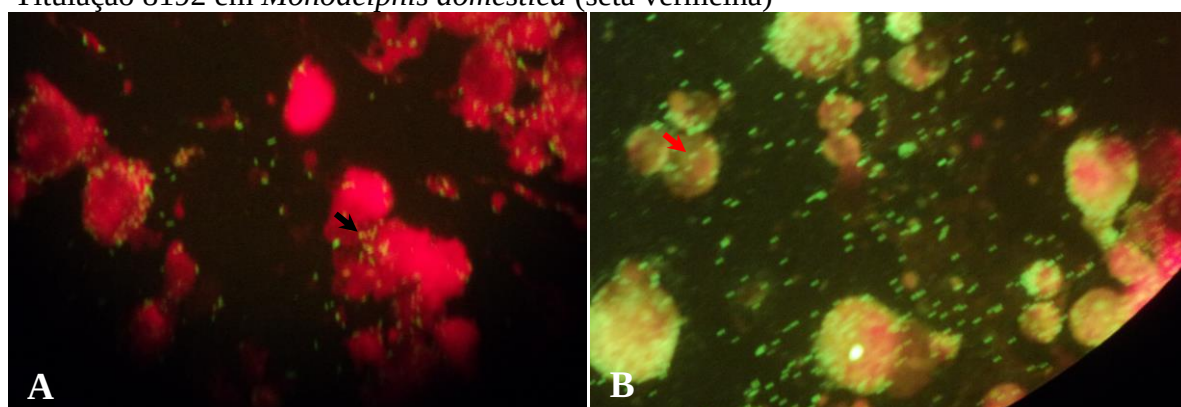
Código do animal	Espécie	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia amblyommii</i>	<i>Rickettsia rhipicephali</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
C4b103	<i>Gracilinanus agilis</i>	0	0	128	64	0
C3b52	<i>Gracilinanus agilis</i>	64	0	128	64	0
A6	<i>Monodelphis domestica</i>	0	0	256	128	0
C2	<i>Monodelphis domestica</i>	64	0	512	128	128
B5b115	<i>Monodelphis domestica</i>	64	0	8192	2048	512
B8b117	<i>Monodelphis domestica</i>	64	0	128	128	512
C8b61	<i>Monodelphis domestica</i>	128	0	8192	2048	0
A3Sbe	<i>Thrichomys</i> sp.	0	0	128	0	0
B4b39	<i>Wiedomys</i> sp.	0	0	0	0	128

Os resultados para *R. amblyommii*, demonstraram em 33,3% de *M. domestica* títulos quatro vezes superiores (8192) em relação as outras espécies de *Rickettsia*, confirmando a exposição desses animais com esse agente na região semiárida do Rio Grande do Norte. Além disso, dentre os animais soropositivos para *R. amblyommii*, 83,3% foi à espécie *M. domestica* (Tabela 4). A Figura 12 mostra os resultados com menores e maiores titulações obtidas na RIFI para *R. amblyommii* entre *G. agilis* e *M. domestica*.

Tabela 4 – Sororeatividade para as cinco espécies de *Rickettsia* isoladas no Brasil em roedores e marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil

Animais (n. testados)	n de animais sororeativos para cada espécie de <i>Rickettsia</i> (% sororeatividade por animal)				
	<i>Rickettsia amblyommii</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	<i>Rickettsia rhipicephali</i>	<i>Rickettsia bellii</i>
<i>Gracilinanus agilis</i> (30)	02 (6,7)	0	0	0	0
<i>Monodelphis domestica</i> (06)	05 (83,3)	0	0	0	0
<i>Thrichomys</i> sp. (02)	01 (50,0)	0	0	0	0
<i>Wiedomys</i> sp. (03)	0	0	0	0	0

Figura 12 – Reação de Imunofluorescência Indireta para *Rickettsia amblyommii* em marsupiais silvestres encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil. A. Titulação 128 em *Gracilinanus agilis* (seta preta); B. Titulação 8192 em *Monodelphis domestica* (seta vermelha)



Fonte: Acervo da autora

Todos os carrapatos coletados dos roedores e marsupiais silvestres foram submetidos a extração de DNA e amplificação por PCR dos genes *gltA* e *ompA* rickettsial. Amostras de DNA rickettsial amplificados por PCR foram sequenciados e submetidos a análises BLAST. Dentre os animais soropositivos, identificou-se em 07 larvas e 01 ninfa de *A. auricularium* a presença de *R. amblyommii* a partir das análises de fragmentos dos genes *gltA* (350pb) e *ompA* (587pb), com 100% de similaridade com Candidatus *R. amblyommii* estirpe Bahia (KM262197) e AaPE (JX867426) (Tabela 5), respectivamente, reportadas na região Nordeste do Brasil por Saraiva et al. (2013). As sequencias referentes aos genes *gltA* (350pb) de *R. amblyommii* foram encontradas em 04 larvas de *A. auricularium* coletadas de 02 *M. domestica*, que apresentaram títulos elevados na RIFI de 256 e 8192 e em ninfa proveniente de 01 *Thrichomys* sp. com títulos baixos de 128. Já as sequencias referentes aos

genes ompA (587pb) de *R. amblyommii* foram encontradas em 03 larvas *A. auricularium* coletadas de 01 *M. domestica* que apresentou soropositividade com títulos de 128.

Tabela 5 – Análise molecular de fragmentos dos genes gltA (350pb) e ompA (587pb) para *Rickettsia amblyommii* em larvas e ninfas de *Amblyomma auricularium*, *Amblyomma parvum* e *Amblyomma* sp. encontrados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil

Positividade para <i>Rickettsia amblyommii</i>								
Espécie de carrapatos	n°						Similaridade %	n° submissão GenBank
	larvas	ninfas	Gene gltA		Gene ompA			
			Larvas	Ninfas	Larvas	Ninfas		
<i>Amblyomma auricularium</i>	50	14	4	1	3	0	100	KM262197 JX867426
<i>Amblyomma parvum</i>	0	7	0	0	0	0	-	-
<i>Amblyomma</i> sp.	12	0	0	0	0	0	-	-

Os resultados demonstram que 6,7% de *G. agilis* foram soropositivos para *R. amblyommii*, mas não havia infecção nos carrapatos coletados. Já *M. domestica* infectados (83,3%) obteve uma taxa elevada dos carrapatos coletados positivos na PCR para *R. amblyommii*, semelhante, ocorreu em um *Thrichomys* sp. (50%) soropositivo, que apresentou carrapatos positivos nas análises moleculares para o agente. Comparando a soropositividade com a infestação por carrapatos infectados por *R. amblyommii*, registra-se a ocorrência elevada entre os roedores e marsupiais silvestres na região semiárida do Rio Grande do Norte.

6 DISCUSSÃO

Esta pesquisa registra pela primeira vez a ocorrência de *Rickettsia amblyommii* em roedores e marsupiais silvestres infestados por *Amblyomma auricularium*, no município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil.

As armadilhas do modelo Sherman e Tomahawk, contribuíram significativamente para registrar a ocorrência de *R. amblyommii* circulante entre roedores e marsupiais silvestres capturados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, localizada no Distrito de Alagoinha, Mossoró, Rio Grande do Norte, pois tendo em vista o curto período que sucederam as coletas de campo (seis meses), considera-se a captura de 05 roedores e 36 marsupiais alta, sendo possível estimar uma ocorrência elevada do agente entre a população local.

Os resultados demonstraram que as Sherman obtiveram maior esforço de captura, com 32 marsupiais entre as espécies de *Gracilinanus agilis* e *Monodelphis domestica* e 02 roedores da espécie *Wiedomys* sp., recapturando 05 *G. agilis*, diferentemente do que ocorreu com as Tomahawk, pois houve a captura de 04 marsupiais das mesmas espécies observadas na Sherman e 03 roedores das espécies *Thrichomys* sp. e *Wiedomys* sp., sem recapturas. As recapturas ocorreram entre os transectos do lado direito da TRIPOL em pontos próximos e no mesmo ponto de captura, significando que esses animais se mantem na mesma toca durante longos períodos e o corredor ecológico presente na TRIPOL dificulta sua migração para os transectos do lado esquerdo.

Ambos os modelos de armadilhas foram capazes de capturar indivíduos de espécies diferentes, com variações de tamanho e peso, influenciando no esforço de captura das armadilhas, o qual observou a captura de indivíduos com peso entre 13g-100g na Sherman e 32g-100g na Tomahawk. Em pesquisa realizada por Santos-Filho et al. (2015), em fragmentos de floresta no sul da Amazonia Brasileira, para avaliar a eficiência das armadilhas do tipo Sherman e Tomahawk na captura de pequenos mamíferos, mostraram que a Sherman capturou 271 indivíduos e 15 espécies diferentes, dentre as quais, *Neacomys spinosus*, *Marmosops bishop*, *Monodelphis glirina* e *Euryoryzomys nitidus*, sendo *M. glirina* a mais capturada e a Tomahawk capturou 233 indivíduos e 15 espécies, dentre essas, *Didelphis marsupialis*, *Oecomys* aff. *catherinae*, *Proechimys* sp. e *Caluromys lanatus*, sendo *Proechimys* sp. a espécie com maior esforço de captura. Nesse estudo foi observado que a Tomahawk conseguiu capturar animais de tamanho maior, que as capturadas pela Sherman.

A diferença no esforço de captura entre as armadilhas está associada com o modelo, pois a Tomahawk é confeccionada em grades de arame galvanizado, facilitando a saída de mamíferos de pequeno porte, o que não acontece com a Sherman, por não apresentar aberturas. Várias pesquisas têm demonstrado que o tipo de armadilha é eficiente na captura específica de espécies, podendo determinar as espécies existentes no local (MICHALSKI et al., 2007; VIEIRA et al., 2014; SANTOS-FILHO et al., 2015).

Relacionando os resultados da presente pesquisa com os estudos realizados por Santos-Filho et al. (2015), sugere-se que a Tomahawk apresenta maior eficiência em capturar grande variedade de espécies e menor quantidade de indivíduos, devido as suas aberturas e a Sherman é mais seletiva na captura de espécies, entretanto, obtém maior esforço de captura.

Estudos sobre eficiência de captura de diferentes armadilhas também são importantes para estimar a biodiversidade e abundância de roedores e marsupiais silvestres, tornando-se imprescindível o uso de modelos de armadilhas diferentes (SANTOS-FILHO et al., 2006), como também auxilia em pesquisas epidemiológicas sobre patógenos transmitidos por roedores e marsupiais silvestres, tornando possível estimar os agentes patogênicos circulantes entre o ambiente silvestre. Na presente pesquisa, possibilitou determinar a circulação de espécies de *Rickettsia* na região semiárida do Rio Grande do Norte em roedores e marsupiais silvestres, como também, em vetores ixodídeos provenientes desses animais.

Nesta pesquisa, foi possível coletar dos roedores e marsupiais silvestres as espécies *A. auricularium*, *Amblyomma parvum* e *Amblyomma* sp. Essas espécies de carrapatos são comumente encontradas em roedores e marsupiais silvestres, devido esses animais apresentarem ampla distribuição geográfica, habitarem em ambientes propícios as infestações, tais como, dossel de florestas úmidas, tocas e árvores em regiões de Mata Atlântica, Cerrado, Florestas Deciduais e Caatinga, associado ao estresse ambiental, a relação parasito-hospedeiro e estilo de vida do animal, que são fatores importantes para a adaptação fisiológica desses carrapatos, tornando-se fácil o parasitismo múltiplo (SÁ-HUNGARO et al., 2014).

Dentre as espécies *A. auricularium*, *A. parvum* e *Amblyomma* sp., coletados nos roedores e marsupiais silvestres, *A. auricularium* demonstrou ser a principal espécie parasitando os hospedeiros, com 50 larvas e 14 ninfas distribuídas entre *G. agilis*, *M. domestica* e *Thrichomys* sp., seguida de *Amblyomma* sp. com 12 larvas em dois exemplares de *Wiedomys* sp. (Tabela 2). De todos os roedores e marsupiais silvestres capturados, *M. domestica* apresentou maior infestação por *A. auricularium* (37 larvas e 04 ninfas), quando comparado com as demais espécies e, *Wiedomys* sp. não apresentou infestações por essa espécie de carrapato.

Infestações múltiplas por *A. auricularium* e *A. parvum* foram observadas em 02 *Thrichomys* sp. na presente pesquisa e, nas demais espécies de roedores e marsupiais silvestres houve apenas infestações por uma única espécie de carrapato. No ano de 2014, nos meses de janeiro a setembro, períodos em que houve grande variação nas precipitações pluviométricas, entre 166,6 mm e 2,0 mm, no semiárido do Rio Grande do Norte, Pereira et al. (2015, no prelo) observaram múltiplas infestações por *Amblyomma* sp. (14 larvas) e *A. parvum* (07 ninfas) em *Thrichomys* sp., divergindo dos resultados dessa pesquisa.

Em estudos realizados por Horta et al. (2011), no bioma Caatinga no estado de Pernambuco, registraram em *Thrichomys apereoides* infestação múltipla por *A. auricularium* (05 ninfas) e *A. parvum* (13 ninfas) e, nos animais que não ocorreram infestações múltiplas, foi encontrado apenas estágios imaturos de *A. auricularium* nas espécies *Galea spixii* (29 ninfas), *T. apereoides* (05 ninfas) e *M. domestica* (01 ninfa), com maiores infestações em *G. spixii* e, corroborando com o presente estudo, não foi observado infestações em animais do gênero *Wiedomys*. Infestações múltiplas em roedores do gênero *Thrichomys* não acontece em fragmentos de Mata Atlântica, pois em estudos conduzidos no estado de Pernambuco, por Aléssio et al. (2012) foi observado apenas infestação por *Amblyomma fuscum* em *Thrichomys laurentius* e não foi encontrado exemplares de *A. auricularium*. Já em pesquisa realizada por Soares et al. (2015), no bioma Amazônia, no estado do Pará, não foi observado *A. auricularium* parasitando espécies de roedores e marsupiais silvestres, somente 01 exemplar foi encontrado em *Dasybus novemcinctus*.

Os resultados da presente pesquisa e, comparando com os dados descritos na literatura, o semiárido do Nordeste brasileiro apresenta maior incidência de *A. auricularium* entre roedores e marsupiais silvestres. Todavia, nas regiões Norte e Centro-Oeste, não houve incidência dessa espécie de carrapatos entre os roedores e marsupiais silvestres. Já a incidência de *A. auricularium* entre as populações de marsupiais é superior, do que entre as populações de roedores na região semiárida do Rio Grande do Norte, diferentemente do descrito na literatura na região semiárida em Pernambuco, onde foi verificado maiores incidências nas populações de roedores.

A incidência de *A. auricularium* em roedores e marsupiais silvestres no semiárido do Nordeste, pode estar relacionada as condições fisiológicas dos animais, juntamente com as variações de temperatura e umidade relativa local, pois é uma espécie de carrapato frequentemente encontrado na Caatinga, por ser adaptado as condições climáticas e ambientais do local, com ovipostura e eclosão dos ovos em temperatura média de 25°C e 85% de umidade relativa (SARAIVA et al., 2013; SÁ-HUNGARO et al., 2014), justificando assim,

a frequência dessa espécie de carrapato no presente estudo, o qual foi conduzido em período de seca prolongada, cujas condições climáticas demonstraram temperatura média de 27,9°C e umidade relativa de 71,5%, aproximando-se das condições ideais para o desenvolvimento e estabelecimento desse artrópode nos roedores e marsupiais silvestres, no semiárido do Rio Grande do Norte.

Por isso, as infestações múltiplas em *Thrichomys* sp. com espécies de carrapatos diferentes, verificados na Estação Experimental Rafael Fernandes da Universidade Federal Rural do Semi-Árido, em Mossoró, Rio Grande do Norte, realizado por Pereira et al. (2015, no prelo) e por essa pesquisa, em meses diferentes, pode estar relacionado com o clima, pois entre janeiro a setembro de 2014, houveram variações nos índices pluviométricos, diminuindo a temperatura e umidade relativa local, já no período em que aconteceu a presente pesquisa, não houve variação pluviométrica, permanecendo a temperatura entre 27,9°C e umidade relativa de 71,5%, estabelecendo um clima quente e seco, propiciando o aparecimento de *A. auricularium*, conforme descrito na literatura.

A predileção do parasita ao hospedeiro pode associar-se ao ambiente em que o animal se encontra, ao comportamento sazonal dos parasitas, área corporal do animal, com maior disponibilidade alimentar e ao sistema imunológico do animal (BITTENCOURT; ROCHA, 2002; VALIM et al., 2004; PARIZI et al., 2007). Com isso, sugere-se que a alta infestação em *M. domestica* relacione-se com o seu sistema imunológico e com seus hábitos, pois segundo Freitas (2012), alimenta-se de insetos, larvas, pequenos vertebrados e frutas e, também apresenta cauda curta, o que impede de procurar outros ambientes, tornando-o exclusivamente terrestre, por essa razão tem um contato maior com outras espécies animais, facilitando assim a infestação por *A. auricularium*. Semelhantemente ocorre com *D. novemcinctus*, o qual consegue manter o parasitismo por *A. auricularium*, mesmo em um bioma com condições climáticas pouco favoráveis ao seu desenvolvimento, conforme descrito por Soares et al. (2015).

A fixação do carrapato acontece por meio de mecanismos que torna os roedores e marsupiais silvestres mais susceptíveis, pois durante a hematofagia, desenvolvem mecanismos para modular muitos dos processos fisiológicos dos seus hospedeiros, como vasoconstrição, inflamação e resposta imunológica, permitindo o aumento de intervalo de tempo de ativação da resposta imune inata e adaptativa (DAIX et al., 2007; PARIZI et al., 2007).

Cada espécie de carrapato desenvolve mecanismos fisiológicos distintos para invadir e alterar o sistema imunológico dos animais. *Ixodes scapularis* altera o sistema

imunológico dos animais através da ação da Salp15, reprimindo intensamente a produção de interleucina-2, durante o estímulo das células T. Essa repressão acontece por meio de ligações específicas da Salp15 com as glicoproteínas de superfície de células T tipo CD4, que atuam como co-receptores do receptor de células T (TCR) (ANGUITA et al., 2002). Essa interação acarreta na repressão da produção de interleucina-2, porque amplifica o sinal gerado pelo TCR recrutando Lck, que é essencial para a ativação de muitas moléculas envolvidas na cascata de sinalização de células T ativadas, no desenvolvimento da resposta imune (JUNCADELLA et al., 2007). A saliva de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* age no sistema imune do hospedeiro diferenciando células T CD4+ em células Th₁ e Th₂, essa diferenciação ocorre pela influência direta das condições ambientais da pele parasitada e por moléculas da saliva do carrapato (CHRISTE et al., 2000). Esse processo foi observado em estudos com o extrato de glândula salivar dessa espécie de carrapato em bovinos, onde verificaram que a proliferação de células T foi inibida in vitro, quando estimuladas por mitógenos (TURNI et al., 2007).

Apesar de não ter elucidado em *A. auricularium* os mecanismos de modulação do sistema imunológico do hospedeiro para sua fixação, se sabe que carrapatos da família Ixodidae apresentam em sua saliva a proteína Salp15, a qual durante a hematofagia é secretada no organismo dos animais, sendo capaz de promover alterações na resposta imune induzida por linfócitos T, por meio de co-receptores específicos para este tipo de célula, tornando o animal imunossuprimido, como também causando a vasodilatação, com isso, auxilia na sua fixação ao hospedeiro, até a próxima fase de seu ciclo de vida e, permite a transmissão de patógenos (MEJRI; BROSSARD, 2007). Segundo Parizi et al. (2007), a natureza do agente invasor e os tipos de resposta imune inata envolvida determinam o tipo de célula T auxiliar que irá se desenvolver durante a hematofagia.

Com isso, sugere-se que *A. auricularium* em *D. novemcinctus*, no bioma Amazônia, no estado do Pará, em estudos conduzidos por Soares et al. (2015) e, *M. domestica*, na Caatinga estado do Rio Grande do Norte, da presente pesquisa, desenvolve mecanismos que consegue modular o sistema imunológico desses hospedeiros, se fixando com sucesso na superfície corpórea do animal, durante períodos necessários até o próximo estágio de vida. Diferentemente ocorre com *D. marsupialis* no bioma Amazônia (SOARES et al., 2015), em cães (DANTAS-TORRES et al., 2006; CANÇADO et al., 2008; KERNIF et al., 2012; MATIAS et al., 2015) e *Wiedomis* sp. na Caatinga, nesse estudo, o qual, *A. auricularium* não consegue se fixar na pele desses hospedeiros.

Talvez a interação parasito-hospedeiro, associado com fatores fisiológicos do animal, seja prejudicada pelas condições climáticas do ambiente, inibindo a ação da Salp15 sobre o sistema complemento, que segundo Parizi et al. (2007), a inibição da via alternativa do sistema complemento pela Salp15 é uma ação espécie-específica para parasita-hospedeiro.

A predominância de *A. auricularium* nos hospedeiros permite uma maior disseminação de *R. amblyommii* na região semiárida do Rio Grande do Norte, em relação as demais espécies de *Rickettsia* registradas no Nordeste brasileiro, pois este microrganismo, de acordo com Saraiva et al. (2013) é encontrado nessa espécie de carrapato, sugerindo ser o vetor específico de *R. amblyommii*. Isso foi verificado nos resultados do presente estudo, que confirmam a especificidade do vetor para esse agente, pois os animais infestados por *A. auricularium* PCR positivos para *R. amblyommii*, foram soropositivos, sendo este fato, significativamente associado com infestação por *A. auricularium*. Outro dado importante que pode confirmar essa especificidade, são os demonstrados em *Thrichomys* sp. infectado por *R. amblyommii*, no qual ocorreu infestação múltipla por ninfas de *A. auricularium* e *A. parvum* e, nas análises de PCR, foi possível detectar que as ninfas de *A. parvum* não se infectou com *R. amblyommii*, mesmo parasitando um animal positivo, tornando essa espécie de carrapato um vetor potencial na disseminação desse agente no semiárido do Rio Grande do Norte.

Por meio dos resultados da soropositividade dos roedores e marsupiais silvestres na Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e análises do sequenciamento dos genes rickettsial (gltA e ompA) em carrapatos, foi possível estimar a ocorrência de *R. amblyommii* entre as populações de roedores e marsupiais silvestres do semiárido do Rio Grande do Norte e identificar o principal vetor.

Apesar desta pesquisa demonstrar como principal vetor *A. auricularium*, a distribuição dessa espécie de *Rickettsia* foi registrada nos estados do Maranhão, Rondônia, Paraná, Bahia, São Paulo, Pará e Pernambuco, tendo como vetores diferentes espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*. No Maranhão e Rondônia foi encontrado como principal vetor *Amblyomma cajennense* (LABRUNA et al., 2004; COSTA et al., 2015), no Paraná e Bahia *Amblyomma longirostre* (PACHECO et al., 2012; MCINTOSH et al., 2015) e em São Paulo, Pará e Pernambuco *A. auricularium* (OGRZEWALSKA et al., 2012; SARAIVA et al., 2013; SOARES et al., 2015), estes últimos corroboram com o presente estudo.

Apesar de no Brasil em alguns Estados a propagação de *R. amblyommii* ocorre através de carrapatos de outras espécies diferentes, várias pesquisas desenvolvidas nos Estados Unidos, tem demonstrado a distribuição desse patógeno exclusivamente por meio de

Amblyomma americanum (JIANG et al., 2010; BARRETT et al., 2014; PONNUSAMY et al., 2014), confirmando que esse patógeno pode ter um vetor específico para seu desenvolvimento, devido as condições fisiológicas do vetor. No caso do semiárido do Rio Grande do Norte, essa pesquisa sugere que *A. auricularium* seja o vetor específico para essa espécie de *Rickettsia*, tendo em vista que, em alguns Estados do Brasil percebe a predominância de *A. auricularium* disseminando esse patógeno.

Esse estudo indica que a ocorrência de *R. amblyommii* infectando *A. auricularium*, demonstra a possibilidade de surgimento de outras espécies de *Rickettsia* na região semiárida do Rio Grande do Norte, pois nos estados do Mato Grosso, Paraíba e Pará, comumente encontra-se em uma mesma espécie de carrapato, como *A. cajennense*, infecções múltiplas por *R. amblyommii* e *Rickettsia bellii* (LOPES et al., 2014; LUGARINI et al., 2015; SOARES et al., 2015). Cardoso et al. (2006), objetivando conhecer a dinâmica da infecção dos vetores e hospedeiros por *Rickettsia* na área peri-urbana do município de Caratinga, Minas Gerais, demonstraram infecções múltiplas com 97% de homologia para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia honei* em *A. cajennense* parasitando 28 equinos. Além de múltiplas infecções, Cardoso et al. (2006), observaram reinfestações e reinfecções, pelas mesmas espécies de carrapatos e *Rickettsia* em um período de 12 meses.

Na presente pesquisa, não foi observado reinfecção por *R. amblyommii* e reinfestação por *A. auricularium*, pois os animais capturados e recapturados em meses seguintes, não apresentaram infestações por carrapatos e nem infecções por *R. amblyommii*, durante os seis meses de coletas de campo. Apenas em um indivíduo da espécie *G. agilis* (C3b52), que foi capturado em janeiro de 2015, com soropositividade para *R. amblyommii* e com infestações por *A. auricularium*, quando recapturado em fevereiro de 2015, apresentou soronegatividade para essa espécie de *Rickettsia*, concomitante, não manteve infestação por *A. auricularium*. Isso pode está relacionado a resistência do animal ao parasitismo e as infecções por *R. amblyommii*, pois de acordo com Parizi et al. (2007), a resistência pode ocorrer com o aumento de C3, o qual irá se depositar no intestino dos carrapatos alimentados e nas vesículas epidérmicas, que se desenvolvem no hospedeiro abaixo do ponto de fixação do carrapato.

De acordo com Milagres et al. (2013) a presença de anticorpos em roedores das espécies *Rattus rattus*, *Nectomys squamipes*, *Bolos* sp., *Oryzomys subflavus* e *Akodon* sp., indica condições vantajosas para o desenvolvimento e reprodução de *Rickettsia* nos animais, com isso, a ausência de anticorpos (IgG) verificado em *G. agilis* (C3b52), designa que o

animal não tem condições imunológicas ideais para o desenvolvimento e multiplicação dessa *Rickettsia*.

Diante do exposto, os dados obtidos na presente pesquisa mostraram que dentre as espécies de roedores e marsupiais soropositivas, *G. agilis* (6,7%), *M. domestica* (83,3%) e *Thrichomys* sp. (50,0%), *M. domestica*, demonstrou ser o principal hospedeiro de *R. amblyommii*, no semiárido do Rio Grande do Norte. Vários estudos na região Sudeste, têm reportado elevada ocorrência de *R. amblyommii* entre populações de marsupiais, em relação a de roedores e animais domésticos, nos quais os percentuais de marsupiais do gênero *Didelphis* apresentaram ocorrência variando de 42% a 100% e *Monodelphis* sp. de 33%. Em relação aos roedores, as espécies *Euryoryzomys russatus* e *Akodon* sp., verificou respectivamente uma ocorrência de 29,4% e 37,5%. Já em animais domésticos, verificaram em cães uma variação entre 3,8% a 92,9% e, em cavalos registraram 7,3% a 15% (MILAGRES et al., 2010; SZABÓ et al., 2013; SILVEIRA et al., 2015), demonstrando que os marsupiais são os hospedeiros mais importantes no ciclo de vida de *R. amblyommii*.

Na região Centro-Oeste e Norte do Brasil, Soares et al. (2015), demonstraram, que os roedores da espécie *Coendou prehensilis* (66,7%), obtiveram maior ocorrência de *R. amblyommii*, do que nas espécies de *D. marsupialis* (11,8%), significando que entre as regiões, o reservatório amplificador competente de *R. amblyommii* varia entre os diferentes biomas.

Comparando os dados descritos na literatura, com os resultados da presente pesquisa, o semiárido do Nordeste brasileiro apresenta maior incidência de *R. amblyommii* entre as populações de marsupiais silvestres, em relação aos roedores e animais domésticos, igualmente na região Sudeste. Todavia, nas regiões Norte e Centro-Oeste, a incidência é maior entre as espécies de roedores e não há entre animais domésticos. Isso demonstra a possibilidade das espécies de marsupiais serem reservatórios amplificadores competentes em regiões com clima semiárido.

A soropositividade em *G. agilis* levantam a possibilidade desse animal adquirir resistência, tanto à *R. amblyommii*, como à *A. auricularium*, pois de uma população de 36 marsupiais capturados, apenas 02 apresentaram títulos baixos para esse agente, como também, o animal recapturado, em um curto intervalo de tempo, não apresentou anticorpos específicos para *R. amblyommii*. Talvez isso acontece, por que esses indivíduos podem apresentar anticorpos com receptores específicos para a região mais imunogênica de *Rickettsia* (lipopolissacáridos), desenvolvendo assim uma imunidade específica (PARIZI et al., 2007). Outra possibilidade é que *G. agilis*, por se alimentar de insetos (FREITAS, 2012), pode ser

que utilize carrapatos em suas refeições, não permitindo sua permanência por tempo suficiente para modular o sistema imunológico do hospedeiro e assim, dificultar a transmissão de *Rickettsia*. Esse fato também foi verificado em trabalho realizado por Soares et al. (2015), no qual analisou infecção por *Rickettsia* em mamíferos e carrapatos, observando que na espécie *Gracilinus microtarsus*, não apresentou infecção por *Rickettsia* e nem infestação por carrapatos do gênero *Amblyomma*, confirmando uma ocorrência baixa entre a população de espécies do gênero *Gracilinus*.

Já os resultados da soropositividade para *M. domestica*, demonstram uma elevada ocorrência de *R. amblyommii*, entre essa espécie de marsupial no semiárido do Rio Grande do Norte. Essa ocorrência pode correlacionar-se com a susceptibilidade dessa espécie animal ao microrganismo, pois são reservatórios amplificadores do agente patogênico, entretanto em uma infecção elevada pode desenvolver sinais clínicos, como lesões cutâneas e febre (JAHFARI et al., 2012). Isso ocorre devido aos mecanismos de defesa do sistema imunológico desse animal frente a infestação por carrapatos, no qual, a saliva dos carrapatos tem favorecido a infecção dos patógenos, através de moléculas anticomplemento presentes, as quais tem desenvolvido no processo de hematofagia mecanismo para imunossuprimir os hospedeiros (PARIZI et al., 2007).

Aliado a ação imunossupressora do parasitismo dos carrapatos, *Rickettsia* também desenvolve mecanismos que afetam o sistema imunológico dos roedores e marsupiais silvestres, evitando o processo de opsonização, através da ação de interleucina-33, que é capaz de modular as respostas inflamatórias e desregula as células endoteliais dos tecidos, provocando estresse endotelial celular, apoptose celular e danos nos tecidos (SHELITE et al., 2016) e com isso, promover sua multiplicação, causando sintomas de rickettsiose ou tornando-se potenciais reservatórios amplificadores de *R. amblyommii* (GALVÃO; PADILHA, 2013).

Apesar dos mecanismos de modulação do sistema imunológico que *Rickettsia* desenvolve no hospedeiro, a ocorrência elevada de *R. amblyommii* em *M. domestica*, pode ser também justificada através de uma possível co-infecção com outra espécie de *Rickettsia*, pois segundo Galvão e Padilha (2013), quando um animal sofre co-infecção adquire anticorpos específicos contra a parte mais imunogênica de *Rickettsia*, tornando-se potencial reservatório amplificador do microrganismo. Sendo assim, as taxas de infecção do vetor podem variar dependendo da virulência do patógeno, susceptibilidade a *Rickettsia*, a presença de co-infecções e modulação da resposta imune no hospedeiro (GALVÃO; PADILHA, 2013).

A elevada circulação de *R. amblyommii* entre *M. domestica*, verificada nessa pesquisa, favorece a transmissão facilmente do microrganismo ao vetor, disseminando rapidamente o agente infeccioso para os animais silvestres do seu convívio e aos sinantrópicos. E, com o aumento do sinantropismo, existirá a possibilidade de propagação desse microrganismo na região urbana, por meio de infecções de animais domésticos, como os cães, podendo ser um risco a população circunvizinha, pois recentemente tem-se registrado nos Estados Unidos a forma branda de febre maculosa em humanos, causada por *R. amblyommii*, quando associado *A. americanum* (JIANG et al., 2010).

Em estudos realizados por Szabó et al. (2013), na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, em Peruibe, estado de São Paulo, obteve como resultados soropositividade em 100% dos *Didelphis aurita* e 33% de *Monodelphis* sp. para *R. rickettsii*, *R. amblyommii*, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia rhipicephali*, conferindo uma significativa participação no ciclo enzoótico e zoonótico das rickettsioses no município de Peruibe, uma vez que, estes animais mantêm contatos com os animais domésticos, demonstrando uma elevada ocorrência de *Rickettsia* entre as populações de marsupiais, quando comparado com as de roedores.

No Brasil a patogenicidade de *R. amblyommii* deve ser estudada, pois se tem registros de alguns resultados sorológicos positivos em humano (SILVEIRA et al., 2015). Apesar dessa pesquisa não realizar testes sorológicos em humanos, diante dos resultados, torna-se importante estudos no ambiente urbano, para verificar a ocorrência dessa espécie de *Rickettsia* entre animais domésticos e humanos. E assim traçar o perfil epidemiológico no estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

7 CONCLUSÕES

Registra-se pela primeira vez a ocorrência de *Rickettsia amblyommii* em roedores e marsupiais silvestres na região semiárida do Rio Grande do Norte, Brasil. *R. amblyommii* circulante dentre *Amblyomma auricularium* e em roedores e marsupiais silvestres na região estudada é consideravelmente baixa. Em *Monodelphis domestica* a circulação desse agente considera-se elevada, demonstrando ser um hospedeiro reservatório amplificador competente para *R. amblyommii*. Sugere-se que esta espécie de *Rickettsia* deve abranger muito mais do que os locais já descritos, pois os hospedeiros, roedores e marsupiais silvestres, apresentam elevada distribuição no país.

REFERÊNCIAS

- ALÉSSIO, F. M. et al. Ecological Implications on the Aggregation of *Amblyomma fuscum* (Acari: Ixodidae) on *Thrichomys laurentius* (Rodentia: Echimyidae), in Northeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 57, n. 1, p. 83-90, 2012.
- ALMEIDA, A. J.; FREITAS, M. M. F.; TALAMONI, S. A. Use of Space by the Neotropical Caviomorph Rodent *Thrichomys apereoides* (Rodentia: Echimyidae). **Zoologia**, v. 30, n. 1, p. 35-42, 2013.
- ALMEIDA, B. R.; SANTILIANO, F. C. Levantamento dos Métodos de Diagnóstico para a Doença de Chagas. **Enciclopédia Biosfera**, v. 8, n. 14, p. 1586-1603, 2012.
- AMORIM, M. V. et al. Detecção de Anticorpos Anti-*Rickettsia* spp. em Cães e Equinos no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, n. 6, p. 3755-3766, 2013.
- ANGUITA, J. et al. Salp15, an *Ixodes scapularis* Salivary Protein, Inhibits CD4+ T Cell Activation. **Immunity**, v. 16, n. 6, p. 849-859, 2002.
- BARBIERI, A. R. M. et al. 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.
- BARRETT, A.; LITTLE, S. E.; SHAW, E. “*Rickettsia amblyommii*” and *R. montanensis* Infection in Dogs Following Natural Exposure to Ticks. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 1, p. 20-25, 2014.
- BITTENCOURT, E. B.; ROCHA, C. F. D. Spatial Use of Rodents (Rodentia: Mammalia) Host Body Surface by Ectoparasites. **Brazilian Journal of Biology**, v. 62, n. 3, p. 419-425, 2002.
- BLANTON, L. S. et al. “*Rickettsia amblyommii*” Induces Cross Protection Against Lethal Rocky Mountain Spotted Fever in a Guinea Pig Model. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 8, p. 557-562, 2014.
- BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D’ANDREA, P. S. **Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa - OPAS/OMS, 2008. 120p.
- CÁCERES, N. C. **Os marsupiais do Brasil: Biologia, ecologia e conservação**. 2. ed. Campo Grande: UFMS, 2012. 530p.
- CANÇADO, P. H. D. et al. Spatial Distribution and Impact of Cattle Raising on Ticks in the Pantanal Region of Brazil by Using the CO₂ Tick Trap. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 371-377, 2008.
- CARDOSO, L. D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp. Circulante em Foco Silencioso de Febre Maculosa Brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.

CARMO FILHO, F.; SOBRINHO, J. E.; AMORIM, A. P. **Dados meteorológicos de Mossoró (janeiro de 1898 a dezembro de 1986)**. Mossoró: ESAM/FGD, 1987. 325p.

CHRISTE, M.; RUTTI, B.; BROSSARD, M. Cytokines (IL-4 and IFN- γ) and Antibodies (IgG2a) Produced in Mice Infected with *Borrelia burgdorferi* Sensu Stricto Via Nymphs of *Ixodes ricinus* Ticks or Syringe Inoculations. **Parasitology Research**, v. 86, n. 6, p. 491-496, 2000.

COLAZO, R.; CASTRO, J. Los Roedores Dañinos: Algunos Aspectos Del Control Químico y Bacteriológico. **Revista de Investigaciones Pecuarias**, v. 8, n. 1, p. 1-9, 1997.

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

DAIX, V. et al. *Ixodes* Ticks Belonging to the *Ixodes ricinus* Complex Encode a Family of Anticomplement Proteins. **Insect Molecular Biology**, v. 16, n. 2, p. 155-166, 2007.

DANTAS-TORRES, F. The Brown Dog Tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from Taxonomy to Control. **Veterinary Parasitology**, v. 152, n. 3, p. 173-185, 2008.

DANTAS-TORRES, F. et al. Exposure of Small Mammals to Ticks and Rickettsiae in Atlantic Forest Patches in the Metropolitan Area of Recife, North-Eastern Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 83-91 2012.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the Brown Dog Tick, Parasitizing Humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

FACURE, K. G.; RAMOS, V. N. Food Habits of the Thick-Tailed Opossum *Lutreolina Crassicaudata* (Didelphimorphia, Didelphidae) in Two Urban Areas of Southeastern Brazil. **Mammalian Biology**, v. 76, n. 2, p. 234-236, 2011.

FENG, H. et al. Fc-dependent Polyclonal Antibodies to Outer Membrane Proteins A e B, But Not to Lipopolysaccharide, Protect SCID Mice Against Fatal *Rickettsia conorii* Infection. **Infection and Immunity**, v. 72, n. 4, p. 2222-2228, 2004.

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. **Manual de utilização de animais**: FIOCRUZ. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2008. 54p.

FORTES, F. S. et al. Anti-*Rickettsia* spp. Antibodies in Free-Ranging and Captive Capybaras from Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 1014-1018, 2011.

FREITAS, A. M. **Mamíferos no nordeste Brasileiro**: Espécies Continentais. Pelotas: USEB, 2012. 133p.

FREITAS, A. M.; SILVA, T. F. S. **Mamíferos na Bahia**: Espécies Continentais. Pelotas: USEB, 2005. 132p.

- GALLETTI, M. F. B. M. et al. Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting its Tick Vector. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 77388, 2013.
- GALVÃO, M. A. M. et al. Riquetsioses no Brasil e Portugal: Ocorrência, Distribuição e Diagnóstico. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 5, p. 850-856, 2005.
- GALVÃO, M. A. M. et al. Brazilian Spotted Fever in Caratinga, Minas Gerais. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 24, n. 3, p. 302-306, 2014.
- GALVÃO, M. A. M.; PADILHA, A. F. Rickettsial Diseases: A Public Health Problem in Latin America?. **Acta Médica Costarricense**, v. 55, n. 3, p. 7-10, 2013.
- GEHRKE, F. S. et al. Molecular Characterization of Mediterranean Spotted Fever *Rickettsia* Isolated from a European Traveler in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Travel Medicine**, v. 20, n. 1, p. 54-56, 2013.
- GODINHO, F. et al. Tifo Murino: Uma Infecção Esquecida. **Medicina Interna**, v. 9, n. 1, p. 17-20, 2002.
- HERRERO, J. A. et al. Infecciones por Rickettsias y Fiebre Q. **Medicine**, v. 57, n. 10, p. 3881-3888, 2010.
- HORTA, M. C. et al. Ticks (Acari: Ixodida) Parasitizing Free-Living Wild Animals in the Caatinga Biome in the State of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 16, n. 3, p. 207-211, 2011.
- HUANG, W.; AUGUST, A. Role(s) of IL-2 Inducible T Cell Kinase and Bruton's Tyrosine Kinase in Mast Cell Response to Lipopolysaccharide. **Genomics Data**, v. 8, p. 18-20, 2016.
- ITURRY-YAMAMOTO, G. R.; PORTINHO, C. P. Sistema Complemento: Ativação, Regulação e Deficiências Congênitas e Adquiridas. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, n. 1, p. 41-51, 2001.
- JAHFARI, S. et al. Prevalence of *Neoehrlichia mikurensis* in Ticks and Rodents from North-west Europe. **Parasites & Vectors**, v. 5, p. 74-84, 2012.
- JIANG, J. et al. Molecular Detection of *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma americanum* Parasitizing Humans. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 4, p. 329-340, 2010.
- JUNCADELLA, I. J. et al. T-cell Signaling Pathways Inhibit by the Tick Saliva Immunosuppressor, Salp15. **Immunology & Medical Microbiology**, v. 49, n. 3, p. 433-438, 2007.
- KAHLON, A. et al. *Anaplasma phagocytophilum* Asp14 is an Invasin that Interacts with Mammalian Host Cells Via its C Terminus to Facilitate Infection. **Infection and Immunity**, v. 81, n. 1, p. 65-79, 2013.

KERNIF, T. et al. *Bartonella* and *Rickettsia* in Arthropods from the Lao PDR and from Borneo, Malaysia. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 1, p. 51-57, 2012.

KIM, H. C. et al. Serosurveillance of Scrub Typhus in Small Mammals Collected from Military Training Sites Near the DMZ, Northern Gyeonggi-Do, Korea, and Analysis of the Relative Abundance of Chiggers from Mammals Examined. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 48, n. 3, p. 237-243, 2010.

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

LABRUNA, M. B. et al. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249-256, 2007.

LABRUNA, M. B. et al. Comparative Susceptibility of Larval Stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to Infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008.

LABRUNA, M. B. et al. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 829-834, 2011.

LABRUNA, M. B. et al. New Records and Human Parasitism by *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 1, p. 283-287, 2014.

LAWRIE, C. H.; RANDOLPH, S. E.; NUTTALL, P. A. *Ixodes* Ticks: Serum Species Sensitivity of Anticomplement Activity. **Experimental Parasitology**, v. 93, n. 4, p. 207-214, 1999.

LOPES, L. B. et al. *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra Hantavirus in an Indian Reserve in the Brazilian Amazon. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 191, p. 1-7, 2014.

LUGARINI, C. et al. Rickettsial Agents in Avian Ixodid Ticks in Northeast Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 364-375, 2015.

MATIAS, J. et al. Spotted Fever Group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* Tick from the Urban Area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 107-110, 2015.

MCINTOSH, D. et al. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia State, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 879-883, 2015.

MEDEIROS, A. P. et al. Spotted Fever Group *Rickettsia* Infecting Ticks (Acari: Ixodidae) in the State of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

- MEJRI, N.; BROSSARD, M. Splenic Dendritic Cells Pulsed with *Ixodes ricinus* Tick Saliva Prime Naive CD4⁺ to Induce T_H2 Cell Differentiation *In Vitro* and *In Vivo*. **International Immunology**, v. 19, n. 4, p. 535-543, 2007.
- MERHEJ, V. et al. Genotyping, Evolution and Epidemiological Findings of *Rickettsia* Species. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 25, p. 122-137, 2014.
- MICHALSKI, F. et al. Efficiency of Box-Traps and Leg-Hold Traps with Several Bait Types for Capturing Small Carnivores (Mammalia) in a Disturbed Area of Southeastern Brazil. **Revista de Biología Tropical**, v. 55, n. 1, p. 315-320, 2007.
- MILAGRES, B. S. et al. *Rickettsia* in Synanthropic and Domestic Animals and Their Hosts from Two Areas of Low Endemicity for Brazilian Spotted Fever in the Eastern Region of Minas Gerais, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1305-1307, 2010.
- MILAGRES, B. S. et al. Spotted Fever Group *Rickettsia* in Small Rodents from Areas of Low Endemicity for Brazilian Spotted Fever in the Eastern Region of Minas Gerais State, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 937-939, 2013.
- MIRANDA, J. et al. Vigilancia de la Infección por *Rickettsia* sp. en Capibaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) Un Modelo Potencial de Alerta Epidemiológica en Zonas Endémicas. **Biomédica**, v. 31, n. 2, p. 216-21, 2011.
- MORAES-FILHO, J. et al. Pesquisa de Anticorpos Anti-*Rickettsia rickettsii* em Equinos do Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo (CCZ/SP). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 2, p. 85-91, 2009.
- MORARU, G. M. et al. Evidence of Antibodies to Spotted Fever Group Rickettsiae in Small Mammals and Quail from Mississippi. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 1, p. 1-5, 2013.
- MOURA-MARTINIANO, N. O. et al. *Rickettsia* and Vector Biodiversity of Spotted Fever Focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 1-5, 2014.
- NASSER, J. T. et al. Urbanização da Febre Maculosa Brasileira em Município da Região Sudeste: Epidemiologia e Distribuição Espacial. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 2, p. 299-312, 2015.
- NUNES, E. C. et al. *Rickettsia amblyommii* Infecting *Amblyomma sculptum* in Endemic Spotted Fever Area from Southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1058-1061, 2015.
- OGRZEWALSKA, M. et al. *Rickettsia belli* in Ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from Birds in Peru. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 254-256, 2012.
- PACHECO, R. C. et al. Rickettsial Infection in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected on Birds in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 710-716, 2012.

- PADDOCK, C. D. et al. Isolation of *Rickettsia parkeri* and Identification of a Novel Spotted Fever Group *Rickettsia* sp. from Gulf Coast Ticks States (*Amblyomma maculatum*) in the United. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 9, p. 2689-2696, 2010.
- PAIVA-OLIVEIRA, E. L. et al. Inflamassoma e sua Repercussão Clínica: Revisão da Literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 11, n. 1, p. 96-102, 2012.
- PARIZI, L. F.; MASUDA, A.; VAZ JUNIOR, I. S. Modulação da Resposta Imune do Hospedeiro pelos Carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 35, n. 3, p. 285-294, 2007.
- 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.
- PAESEN, G. C. et al. Tick Histamine-binding Proteins: Isolation, Cloning, and Three-dimensional Structure. **Molecular Cell**, v. 3, n. 5, p. 661-671, 1999.
- PEREIRA, J. S. et al. Ectoparasitos em Preás (*Galea spixii* Wagler, 1831) Cativos no Semiárido do Rio Grande do Norte. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 32, n. 8, p. 789-793, 2012.
- PEREIRA, J. S. et al. Infestação por Ixodidae e Argasidae em Pequenos Mamíferos da Estação Experimental Rafael Fernandes, RN, Brasil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, 2015. No prelo.
- PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523-530, 2006.
- PONNUSAMY, L. et al. Diversity of Rickettsiales in the Microbiome of the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 354-359, 2014.
- QUINTERO, J. C. et al. Ecoepidemiología de la Infección por Rickettsias en Roedores, Ectoparásitos y Humanos en El Noroeste de Antioquia, Colombia. **Biomédica**, v. 33, n. 1, p. 1-43, 2013.
- REIS, N. R. et al. **Mamíferos do Brasil**. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2006. 437p.
- RINCÓN, L. M. G. et al. La Universidad del Zulia (Luz) Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Condes (Venezuela). **Revista Cubana de Cirugía**, v. 46, n. 1, p. 1-8, 2007.
- SÁ-HUNGARO, I. J. B. et al. *Amblyomma auricularium* (Acari: Ixodidae): Underwater Survival of the Non-Parasitic Phase of Feeding Females. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 387-392, 2014.
- SARAIVA, D. G. et al. *Rickettsia amblyommii* Infecting *Amblyomma auricularium* Ticks in Pernambuco, Northeastern Brazil: Isolation, Transovarial Transmission, and Transstadial Perpetuation. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 10, p. 1-4, 2013.

- SANTOS-FILHO, M. et al. Trap Efficiency Evaluation for Small Mammals in the Southern Amazon. **Acta Amazonica**, v. 45, n. 2, p. 187-194, 2015.
- SANTOS-FILHO, M. S.; SILVA, D. J.; SANAIOTTI, T. M. Efficiency of Four Trap Types in Sampling Small Mammals in Forest Fragments, Mato Grosso, Brazil. **Mastozoología Neotropical**, v. 13, n. 2, p. 217-225, 2006.
- SHELITE, T. R. et al. IL-33-Dependent Endothelial Activation Contributes to Apoptosis and Renal Injury in *Orientia tsutsugamushi*-Infected Mice. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1-19, 2016.
- SILVEIRA, I. et al. Rickettsial Infection in Animals, Humans and Ticks in Paulicéia, Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 62, n. 7, p. 525-533, 2015.
- SOARES, H. S. et al. Ticks and Rickettsial Infection in the Wildlife of Two Regions of the Brazilian Amazon. **Experimental and Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125-140, 2015.
- SOARES, J. F. et al. Experimental Infection of the Tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne Tick, with *Rickettsia rickettsii*, the Agent of Rocky Mountain Spotted Fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139-151, 2012.
- SOUSA, R. et al. Host-and Microbe-Related Risk Factors for and Pathophysiology of Fatal *Rickettsia conorii* Infection in Portuguese Patients. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 4, p. 576-585, 2008.
- SOUZA, C. E. et al. 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, n. 2, p. 116-121, 2009.
- ŠPITALSKÁ, E. et al. *Rickettsia* Species in Fleas Collected from Small Mammals in Slovakia. **Parasitology Research**, v. 114, n. 11, p. 4333-4339, 2015.
- SZABÓ, M. P. J. et al. 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, 2013.
- SUMRANDEE, C. et al. Molecular Detection of *Rickettsia* Species in *Amblyomma* Ticks Collected from Snakes in Thailand. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 632-640, 2014.
- TELFORD, S. R. Status of the “East Side Hypothesis” (Transovarial Interference) Twenty Five Years Later. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 144-150, 2014.
- TRANQUILLI, W. J.; THURMON, J. C.; GRIMM, K. A. **Lumb & Jones, Anestesiologia e Analgesia Veterinária**. 4. ed. São Paulo: Roca, 2013. 1096p.
- TURNI, C.; LEE, R. P.; JACKSON, L. A. The Effects of Salivary Gland Extracts from *Boophilus microplus* Ticks on Mitogen-stimulated Bovine Lymphocytes. **Veterinary Research Communications**, v. 31, n. 5, p. 545-552, 2007.

- URIBE, M. C. M. et al. Tifo Epidémico en Jalisco, Presentación de Un Caso Clínico Pediátrico. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología volumen**, v. 26, n. 2, p. 64-66, 2006.
- VALIM, M. P. Parasitismo por Acari e Phthiraptera em Cobaio [Cavia porcellus (Linnaeus, 1758)] de Ambientes Rural e Urbano nos Municípios de Silva Jardim e Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 41, n. 4, p. 240-246, 2004.
- VÉLEZ, J. C. Q.; HIDALGO, M.; GONZÁLEZ, J. D. R. Rickettsiosis, Una Enfermedad Letal Emergente y Re-Emergente en Colombia. **Universitas Scientiarum**, v. 17, n. 1, p. 82-99, 2012.
- VIEIRA, A. L. M. et al. Efficiency of Small Mammal Trapping in an Atlantic Forest Fragmented Landscape: The Effects of Trap Type and Position, Seasonality and Habitat. **Brazilian Journal of Biology**, v. 74, n. 3, p. 538-544, 2014.
- WACHTER, M. et al. Seroprevalence of Spotted Fever Group Rickettsiae in Dogs in Germany. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 3, p. 191-194, 2015.
- WALKER, D. H.; VALBUENA, G. A.; OLANO, J. P. Pathogenic Mechanisms of Disease Caused by *Rickettsia*. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 1-11, 2003.
- WALKER, D. H. Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. 1, p. 39-44, 2007.
- WILLIAMS-NEWKIRK, A. J. et al. Characterization of the Bacterial Communities of Life Stages of Free Living Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). **Plos One**, v. 9, n. 7, p. 102-130, 2014.

ANEXO A – Autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais da UFERSA (CEUA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

PARECER DE PROJETO ENCAMINHADO A CEUA-UFERSA

Parecer Nº 28/2014 PROCESSO Nº 23091.002621/2014-63.

Data de Entrada: 23/07/2014

Aprovado: 12/11/2014

1. Responsável:

Sílvia Maria Mendes Abid

2. Título do Projeto

Pesquisa de Rickettsia sp. associada a roedores e marsupiais nativos da Estação Experimental Rafael Fernandes da UFERSA, Rio Grande do Norte Brasil

3. Considerações:

Após apreciação pelos membros, a comissão julgou que os esclarecimentos no memorando CEUA 09/2014 foram satisfatórios. O projeto tem relevância científica e está dentro das especificações da CEUA. Durante os procedimentos, os animais serão manipulados adequadamente e serão submetidos a estresse ou sofrimento mínimos. O procedimento de eutanásia dos animais, quando necessário, está de acordo com a Resolução n. 714 de 20 de junho de 2001 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. Todo o procedimento de manipulação dos animais será realizado com acompanhamento técnico especializado e com o uso de material adequado.

4. Parecer final:

FAVORÁVEL à aprovação do projeto

Mossoró, 13 de novembro de 2014.

Atenciosamente,

Profª Emanuelle Fontenele Rabelo
Presidente
Comissão de Ética no uso de animais
CEUA/UFERSA

Emanuelle Fontenele Rabelo
Presidente CEUA

ANEXO B – Autorização para Atividades com Finalidade Científica ICMBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 44685-1	Data da Emissão: 15/07/2014 14:18	Data para Revalidação*: 14/08/2015
* De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Kallane Alessandra Rodrigues de Paiva	CPF: 050.803.784-09
Título do Projeto: PESQUISA DE Rickettsia sp. ASSOCIADO A ROEDORES E MARSUPIAIS NATIVOS DA ESTAÇÃO EXPERIMENTAL RAFAEL FERNANDES DA UFRSA, RIO GRANDE DO NORTE, BRASIL	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO	CNPJ: 24.529.265/0001-40

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Captura, marcação e transporte dos animais e coleta de sangue	09/2014	12/2015
2	Sorologia, PCR e análises hematológicas e bioquímicas	11/2014	02/2016
3	Análise estatística e interpretação dos resultados	03/2016	05/2016

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exonera o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para Importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	As armadilhas utilizadas para captura de mamíferos deverão ser visitadas pelo menos duas vezes ao dia (matutino e vespertino) para minimizar a morte devido a hipotermia.
---	---

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Wesley Adson Costa Coelho	Pesquisador	010.809.354-95	002.106.382 IEP-RN	Brasileira
2	Guilherme Moniz Sodre Lopes Teixeira	Estudante	095.229.774-46	002508352 SSP-RN	Brasileira
3	SILVIA MARIA MENDES AHID	Coordenadora	176.501.513-87	2567440 Iep-RN	Brasileira
4	Lara Fernandes de Araújo Pereira	Estudante	079.390.544-30	002743203 Iep-RN	Brasileira
5	Josivania Soares Pereira	Pesquisadora	056.484.214-19	1911407 SSP-RN	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 45742117



Página 1/4

ANEXO C – Declaração para Transporte de Material Biológico

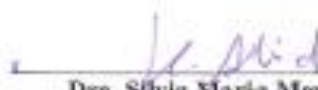


UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
Departamento de Ciências Animais

Mossoró, 17 de março de 2015

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins, que a mestrande **Kalliane Alessandra Rodrigues de Paiva**, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal (matrícula: 2014100370), com projeto intitulado *Rickettsia* sp. associado a roedores e marsupiais nativos da Estação Experimental Rafael Fernandes da UFERSA, Rio Grande do Norte, Brasil, cadastrado na Pró-reitoria de Pós-graduação da Universidade Federal Rural do Semi-Árido sob Nº PI1416A-239, aprovado pela Comissão de Ética da UFERSA (CEUA) sob parecer nº 28/2014, Processo nº 23091.002621/2014-65 e autorizado pelo SISBIO sob nº 44685-1, sob minha orientação, transporta material biológico (plasma sanguíneo) de roedores e marsupiais silvestres, do Laboratório de Parasitologia Animal, Departamento de Ciências Animais, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró – RN, para o Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Universidade de São Paulo, no período de 28/03/2015 à 11/04/2015, para realizar análises de Imunofluorescência Indireta.


Dra. Sílvia Maria Mendes Ahid

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO (UFERSA)
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal
Sala 31, Depto de Ciências Animais I
<http://lattes.cnpq.br/5525213637103948>