

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

**TESE**

**Diagnóstico Molecular de Bioagentes em Carrapatos,  
Oriundos de Fragmentos do Bioma Mata Atlântica,  
Brasil**

**Adilton Pacheco de Oliveira**

**2019**



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

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE BIOAGENTES EM CARRAPATOS,  
ORIUNDOS DE FRAGMENTOS DO BIOMA MATA ATLÂNTICA,  
BRASIL**

**Adilton Pacheco de Oliveira**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Aivaldo Henrique da Fonseca**

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

Seropédica, RJ  
Maio de 2019

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

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

O48d Oliveira, Adlilton Pacheco de, 1988-  
Diagnóstico Molecular de Bioagentes em Carrapatos,  
Oriundos de Fragmentos do Bioma Mata Atlântica, Brasil  
/ Adlilton Pacheco de Oliveira. - Rio de Janeiro,  
2019.  
57 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.  
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências  
Veterinárias, 2019.

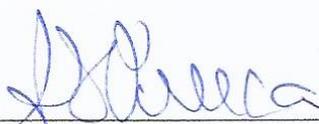
1. Agentes transmitidas por carrapatos. 2.  
Borrelia. 3. Riquetsia. 4. Unidades de conservação  
ambiental. 5. Aves silvestres. I. Fonseca, Adivaldo  
Henrique da , 1953-, orient. II Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em  
Ciências Veterinárias III. Título.

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

ADLILTON PACHECO DE OLIVEIRA

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 20 /05/ 2019



---

ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA, Dr. UFRRJ  
(Orientador)



---

CLAUDIA BEZERRA DA SILVA, Dra. UFRRJ



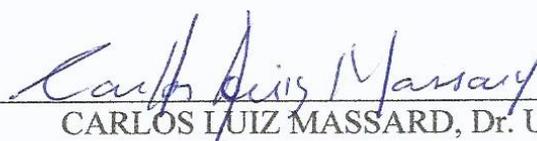
---

PATRICIA BARIZON CEPEDA, Dra. UBM - RJ



---

MARIA HALINA OGRZE WALSKA, Dra. FIOCRUZ - RJ



---

CARLOS LUIZ MASSARD, Dr. UFRRJ

Para minha família, com muito amor e gratidão.  
Dedico.

## AGRADECIMENTOS

Hoje se encerra mais um ciclo em minha vida e para esse ciclo se completar, muitas foram as pessoas que colaboraram, por isso, é muito difícil agradecer sem temer esquecer alguém. Início então agradecendo a todos os aqui presentes!

Agradeço aos meus avós maternos Cleonice Pacheco "*In Memoriam*" e Lauro Ladislau "*In Memoriam*" pelo exemplo dado em vida a seus filhos e netos, aproveito também para agradecer aos meus avós paternos Benedito e Francisca de Oliveira "*In Memoriam*", pelo exemplo de simplicidade e humildade raros nos dias atuais.

Aos meus pais, Ana do Socorro Pacheco e Manoel de Jesus Oliveira, pela determinação e luta na minha formação. Não medindo esforços para atender todas as minhas necessidades, sempre trabalhando muito e não se importando com as próprias necessidades, à vocês, meu muito obrigado. E não importa o quanto eu agradeça nunca será o suficiente para expressar o que eu sinto, a vocês serei grato eternamente.

Agradeço aos meus irmãos, Adenilson e Anna Waléria, pelo apoio durante esses anos e por me perdoarem devido à ausência em suas vidas desde muito cedo, e por não desempenhar como devia as minhas obrigações de irmão mais velho muitas vezes sentido por vocês, mesmo que eu não tivesse muito a ensinar.

Agradeço aos meus sobrinhos Enzo Emanuel e Amanda Carolina por me proporcionarem a experiência do que é amor de pai, já que não tenho filhos. E por servirem de motivação para nunca desistir das coisas.

Agradeço aos meus tios e primos, que mesmo à distância, sempre me enviam palavras de incentivo e por me apoiarem incondicionalmente em todas as minhas decisões.

Agradeço aos professores do PPGCV - UFRRJ, que desempenharam com dedicação as aulas ministradas durante este curso, e que na medida do possível fizeram o que podiam para melhorar o aprendizado dos seus alunos.

Agradeço ao Arthur Santiago, secretário do PPGCV - UFRRJ, por ser ter sido sempre muito gentil, prestativo e eficiente em todas as minhas necessidades acadêmicas.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida. O presente trabalho também foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Não poderia deixar de agradecer o companheirismo, carinho, autenticidade e amizade, os amigos Roberto Espinheiro e família, Alessandra Sousa, Michele Bahia, Isabela Araújo, Paulo Cesar Magalhães e Matheus Cordeiro que sempre estiveram ao meu lado nos momentos, tristes, alegres e na cumplicidade do dia a dia dentro e fora da Universidade.

Aproveito para agradecer também aos meus amigos: Leandro Caldeira, Mateus Bueno, Victor Teixeira e Rodolfo Guimarães, Pablo Delbracio e Osvanira Alves pelo aprendizado, amizade e companheirismo durante esses anos dividindo casa e a minha vida com vocês. Vocês são a família que deus me permitiu escolher.

Ao pessoal do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP), Cláudia Bezerra, Carolina Marota, Juliana Ferreira dos Santos, Márcio Barizon Cepeda, Priscilla Nunes, Priscila Vieira e Thays Figueiroa pelos conselhos, ensinamentos e ajuda. A vocês meu muito obrigado.

Agradeço ao Professor Dr. Adevair Henrique da Fonseca, por viabilizar as viagens de campo e me incentivar a ter paixão pelo trabalho nas unidades de conservação ambiental brasileiras. E também ao Dr. Hermes Luz por ter possibilitado a existência de um segundo capítulo nesta tese.

Ao meu orientador Professor Adivaldo Henrique da Fonseca, pelos ensinamentos dispensados nesses últimos quatro anos, e por ser um exemplo de ser humano ético e profissional. A você professor, minha eterna gratidão.

Agradeço aos meus alunos da UNESA-RJ em Vargem Pequena, por despertarem em mim a vocação que neguei durante muito tempo a “docência”. Por anos sonhei em ser somente pesquisador, hoje tenho as duas carreiras pra seguir com gosto.

E finalmente agradeço a Deus, por proporcionar estes agradecimentos a todos que tornaram minha vida mais afetuosa, além de ter me dado uma família maravilhosa e amigos sinceros. Viver sempre vai ser meu jeito de agradecer!

## **BIOGRAFIA**

Adlilton Pacheco de Oliveira é filho de Ana do Socorro Pacheco e Manoel de Jesus Oliveira. É natural de Capanema, interior do estado do Pará e nasceu em 1988.

Cresceu na capital paraense Belém, onde iniciou o ensino fundamental na Escola Estadual do Outeiro o qual foi concluído em 2003. Em seguida, ingressou no ensino médio/técnico na Escola Agrotécnica Federal de Castanhal, localizada na cidade de Castanhal, interior do estado, concluindo seus estudos em 2006.

Em 2007 trabalhou como prestador de serviços no Abatedouro de aves e coelhos de Santa Izabel e como estagiário na Integradora Makarú (incubação e criação de aves de corte) localizada em Ananindeua, neste mesmo ano foi aprovado no vestibular para o curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA) e voltou à Castanhal, cidade sede do curso, onde se formou em 2013 ingressando logo em seguida no mestrado pelo Programa de Pós-graduação em Saúde Animal na Amazônia – UFPA. A conclusão do mestrado ocorreu em 2015. Neste mesmo ano ingressou no curso de doutorado pelo Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) em Seropédica onde reside desde o início do curso de doutorado.

É nesta presente data, defende sua tese como o último requisito necessário para obter o título de doutor em Ciências pela UFRRJ.

## RESUMO GERAL

OLIVEIRA, Adilton Pacheco. **Diagnóstico Molecular de Bioagentes em Carrapatos, Oriundos de Fragmentos do Bioma Mata Atlântica, Brasil.** 2019. 57p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Este trabalho está dividido em dois capítulos e tem por objetivos: 1) Identificar as espécies de carrapatos na fase de vida livre, que ocorrem nas Unidades de Conservação (UC's) dos estados do Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES) e Minas Gerais (MG), e realizar detecção de ácidos desoxirribonucleicos (DNA) de bactérias dos gêneros *Rickettsia* e *Borrelia* por meio da reação em cadeia pela polimerase (PCR) e 2) Detectar evidências moleculares da presença de bactérias e protozoários dos gêneros *Rickettsia*, *Borrelia*, *Babesia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia* em carrapatos coletados de aves silvestres no estado do Rio de Janeiro. No primeiro trabalho, foram visitadas 17 UC's (nacionais, estaduais e municipais) onde carrapatos em fase de vida livre foram capturados utilizando armadilha de CO<sub>2</sub> e coleta manual. Foram coletados 1.356 carrapatos, sendo 1201 larvas, 106 ninfas e 49 adultos. As ninfas foram identificadas como *Amblyomma* spp. e os adultos como *A. oblongoguttatum*, *A. sculptum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. aureolatum*. As amostras foram submetidas a extração de DNA pelo método de fenol-clorofórmio com precipitação em álcool isopropílico. Na PCR utilizando como alvo uma sequência parcial do gene *gltA*, foi detectado DNA de *Rickettsia* spp. em 10,1% (19/188) das amostras, para *Borrelia* spp. foi utilizado como alvo uma sequência parcial do gene *flaB* e nenhuma amostra foi positiva. O sequenciamento das 19 amostras positivas na PCR, permitiu a identificação de DNA de *Rickettsia bellii* (KX0094101) em todas as amostras. Para o capítulo II, foram capturadas 33 aves, de 20 espécies diferentes das quais 14 estavam parasitadas por ninfas de carrapatos que foram identificados como *A. longirostre*. Foi detectado a presença de DNA de *Rickettsia* spp. em três amostras, sendo uma delas positiva também para *Borrelia* spp.. Após sequenciamento, a amostra co-infectada apresentou 100% de identidade com *Rickettsia bellii* cepa H3 e 91% com *Borrelia turcica*, duas amostras apresentaram 100% de identidade com *Rickettsia* sp. cepa Aranha e cepa AL.

Palavras-Chaves: Parques, febre maculosa, borreliose humana, pássaros, infestação

## GENERAL ABSTRACT

OLIVEIRA, Adilton Pacheco. **Molecular Diagnosis of Bioagents in Ticks from Fragments of the Atlantic Rain Forest Biome, Brazil.** 2019. 57p. Tesis (PhD in Veterinary Sciences, Animal Health). Institute of Veterinary Medicine, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

This work is divided into two chapters and aims to: 1) Identify the species of ticks in the free-living phase, which occur in the Conservation Units (UC's) in the states of Rio de Janeiro, Espírito Santo (ES) and Minas Gerais, Brazil, and to detect deoxyribonucleic acids (DNA) from bacteria of the genera *Rickettsia* and *Borrelia* through polymerase chain reaction (PCR) and 2) Detect molecular evidence of the presence of bacteria and protozoa of the genera *Rickettsia*, *Borrelia*, *Babesia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* in ticks collected from wild birds in the state of Rio de Janeiro. In the first study, 17 UC's were visited (national, state and municipal) where free-living ticks were captured using CO<sub>2</sub> trap and manual collection. A total of 1,356 ticks were collected, including 1201 larvae, 106 nymphs and 49 adults. The nymphs were identified as *Amblyomma* spp. and adults such as *A. oblongoguttatum*, *A. sculptum*, *A. brasiliense*, *A. dubitatum*, *A. aureolatum*. The samples were submitted to DNA extraction by the phenol-chloroform method with precipitation in isopropyl alcohol. In PCR using a partial sequence of the *gltA* gene as a target, *Rickettsia* spp. in 10.1% (19/188) of the samples, for *Borrelia* spp. a partial sequence of the *flaB* gene was used as a target and no sample was positive. Sequencing of 19 samples identified the presence of *Rickettsia bellii* DNA. For Chapter II, 33 birds of 20 different species were captured, of which 14 were parasitized by tick nymphs that were identified as *A. longirostre*. The presence of *Rickettsia* spp. in three samples, one of which was also positive for *Borrelia* spp. After sequencing, the co-infected sample showed 100% identity with *Rickettsia bellii* strain H3 and 91% with *Borrelia turcica*, two samples had 100% identity with *Rickettsia* sp. Aranha strain and AL strain.

Keywords: Parks, spotted fever, human borreliosis, birds, infestation.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1 Unidades de Conservação Ambiental (UC's).....	12
2.2 Espécies de Carrapatos de Importância Médica e Veterinária.....	13
2.4 Infestação por Carrapatos em aves Silvestres.....	13
2.3 O gênero <i>Amblyomma</i> .....	14
2.5 Agentes Zoonóticos Transmitidos por carrapatos do gênero <i>Amblyomma</i> no Brasil.....	15
<b>CAPÍTULO I - Detecção de DNA de <i>Rickettsia</i> spp. e <i>Borrelia</i> spp. em carrapatos em fase de vida livre de unidades de conservação na região sudeste do Brasil.....</b>	<b>17</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>18</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>19</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>21</b>
2.1 Aspectos éticos.....	21
2.2 Descrição dos locais de coleta .....	21
2.3 Método de coleta de carrapatos .....	22
2.4 Identificação dos carrapatos .....	23
2.5 Extração de DNA e Reação em cadeia pela Polimerase (PCR) .....	23
2.6 Sequenciamento .....	24
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>29</b>
<b>CAPÍTULO II - Detecção de DNA de Bioagentes em carrapatos de aves silvestres do município de Guapimirim e Parque Nacional da Serra dos Órgãos, estado do Rio de Janeiro, Brasil .....</b>	<b>30</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>31</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>32</b>
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
2.1 Aspectos éticos .....	34

2.2 Descrição dos locais do estudo .....	34
2.3 Métodos de captura das aves e coleta de carrapatos.....	34
2.4 Identificação e armazenamento dos carrapatos .....	34
2.5 Preparo das amostras e extração do DNA .....	34
2.6 Reação em cadeia de Polimerase (PCR).....	35
2.7 Sequenciamento e análise filogenética .....	37
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>4 CONCLUSÃO.....</b>	<b>42</b>
<b>3 CONCLUSÕES GERAIS .....</b>	<b>43</b>
<b>4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>44</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>51</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>52</b>
<b>APÊNDICE C.....</b>	<b>53</b>
<b>ANEXO A.....</b>	<b>56</b>
<b>ANEXO B.....</b>	<b>57</b>

## 1 INTRODUÇÃO GERAL

As unidades de conservação ambiental (UC's) brasileiras recebem muitos visitantes à procura de atividades ao ar livre como acampamentos, caminhadas e trilhas. Sendo assim, expostas a infestações por carrapatos e, conseqüentemente, a possíveis patógenos que os mesmos albergam. Vários parques têm sido interditados ou até mesmo fechados por causa de doenças como a febre maculosa que envolve carrapatos e animais em seu ciclo de transmissão. Essas enfermidades são o segundo grupo de doenças transmitidas por artrópodes de maior importância em saúde humana, devido sua alta letalidade.

No Brasil, existem várias espécies de carrapatos associados a infestações de seres humanos e muitas delas são comprovadamente transmissoras de patógenos, como é o caso de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, uma espécie de carrapato de baixa especificidade parasitária que infesta seres humanos com frequência e é considerado o principal vetor da bactéria patogênica responsável pela febre maculosa brasileira. Por este motivo, é de grande importância o monitoramento da ocorrência de espécies de carrapatos que ofereçam risco de infestação e transmissão de doenças a seres humanos.

Para isso, o objetivo do presente trabalho foi descrever a ocorrência de carrapatos em fase parasitária e não parasitária em UC's de âmbito municipal, estadual e federal, além disso detectar por meio de técnicas moleculares, agentes que podem ser transmitidos por esses carrapatos.

Nesse contexto, o trabalho foi dividido em dois capítulos. O primeiro capítulo, apresenta resultados de um levantamento da ocorrência de espécies de carrapatos em fase não parasitária encontradas em 17 UC's distribuídas entre os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais; além de apresentar também a frequência de detecção de DNA de bactérias dos gêneros *Rickettsia* e *Borrelia* nesses carrapatos por meio de técnicas moleculares. O segundo capítulo, apresenta um levantamento das infestações por carrapatos em aves silvestres capturadas em Guapimirim e Serra dos Órgãos, no Rio de Janeiro, bem como uma avaliação da presença de DNA de agentes infecciosos e parasitários nesses carrapatos por meio de técnicas moleculares.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Unidades de Conservação Ambiental (UC's)

É sabido que, muitos povos e civilizações reconheceram ao longo da história, a necessidade de proteger áreas naturais com características especiais, por diversos motivos: estas áreas podiam estar associadas a mitos, fatos históricos marcantes e à proteção de fontes de água, caça, plantas medicinais e outros recursos naturais. Com o passar do tempo, muitas áreas naturais foram sendo destruídas para dar lugar à ocupação humana. Animais e plantas desapareceram e outros, até os dias atuais, ainda correm risco de extinção (BRASIL, 2018a).

O Brasil é considerado um país detentor de uma das maiores diversidades biológicas do planeta, possuindo grande variedade de espécies de fauna e flora, que compõe importantes ecossistemas proporcionando um dos melhores climas do mundo, água pura e em grande quantidade, terras férteis e paisagens paradisíacas. Uma das formas de se proteger essas áreas naturais é por meio da criação de Unidades de Conservação (UC's), estratégia extremamente eficaz para a manutenção dos recursos naturais em longo prazo (BRASIL, 2018a; ALEIXO et al., 2010).

Segundo Brasil (2018b), as UC's podem ser divididas em dois grupos: unidades de proteção integral e unidades de uso sustentável.

Nas unidades de proteção integral é permitido apenas o uso indireto dos recursos naturais; ou seja, aquele que não envolve consumo, coleta ou danos aos recursos naturais. E como exemplos dessas atividades estão a recreação em contato com a natureza, turismo ecológico, pesquisa científica, educação e interpretação ambiental, entre outras. Fazem parte deste tipo de unidade: Estação Ecológica/biológica - área destinada à preservação da natureza e à realização de pesquisas científicas; Reserva Biológica - área destinada à preservação da diversidade biológica, onde podem ser efetuadas medidas de recuperação de ecossistemas alterados e de preservação e recuperação do equilíbrio natural, da diversidade biológica e dos processos ecológicos naturais; Parque - área destinada à proteção dos ecossistemas naturais de grande relevância ecológica e beleza cênica, onde podem ser realizadas atividades de recreação, educação e interpretação ambiental, e desenvolvidas pesquisas científicas; Monumento Natural - área que tem como objetivo básico a preservação de lugares singulares, raros e de grande beleza cênica, permite a existência de propriedades privadas em seu interior; e Refúgio de Vida Silvestre - ambiente natural onde se asseguram condições para a existência ou reprodução de espécies ou comunidades da flora local e da fauna residente ou migratória, permite a existência de propriedades privadas em seu interior (RYLANDS; BRANDON, 2005; BRASIL, 2011).

Já as unidades de uso sustentável são áreas que visam conciliar a conservação da natureza com o uso sustentável dos recursos naturais, mas desde que praticadas de uma forma que a perenidade dos recursos ambientais renováveis e dos processos ecológicos esteja assegurada (BRASIL, 2018b). Fazem parte deste tipo de unidade: Área de Proteção Ambiental - área em geral extensa, com certo grau de ocupação humana, dotada de atributos naturais, estéticos e culturais importantes para a qualidade de vida e o bem-estar das populações; Área de Relevante Interesse Ecológico - área de pequena extensão, com pouca ou nenhuma ocupação humana e com características naturais singulares, cujo objetivo é manter ecossistemas naturais de importância regional ou local e regular o uso admissível dessas áreas, permite a existência de propriedades privadas em seu interior; Floresta - área com cobertura florestal onde predominam espécies nativas, cujo principal objetivo é o uso sustentável e diversificado dos recursos florestais e a pesquisa científica; Reserva Extrativista - área natural com o objetivo principal de proteger os meios, a vida e a cultura de populações tradicionais, cuja subsistência baseia-se no extrativismo e, ao mesmo tempo, assegurar o uso sustentável dos recursos naturais existentes; Reserva de Fauna - área com populações animais de espécies nativas, terrestres ou

aquáticas, onde são incentivados estudos técnicos e científicos sobre o manejo econômico sustentável dos recursos faunísticos; Reserva de Desenvolvimento Sustentável - área natural onde vivem populações tradicionais que se baseiam em sistemas sustentáveis de exploração dos recursos naturais; Reserva Particular do Patrimônio Natural - área privada criada para proteger a biodiversidade a partir de iniciativa do proprietário (RYLANDS & BRANDON 2005; BRASIL, 2011).

## 2.2 Espécies de Carrapatos de Importância Médica e Veterinária.

Os carrapatos são artrópodes e se dividem em três famílias, a Ixodidae (683 espécies), Argasidae (183 espécies) e Nuttalliellidae com uma espécie, *Nuttalliella namaqua* (BARROS-BATTESTI, 2006). Todas as espécies requerem obrigatoriamente sangue de vertebrados e possuem um significativo nível de especificidade, podendo utilizar como fonte de alimentação hospedeiros alternativos como os seres humanos (MASSARD; FONSECA, 2004).

Os carrapatos da família Ixodidae são os mais numerosos em quantidade de espécies e na região neotropical, são representados pelos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*. Já os da família Argasidae, são constituídos pelos gêneros *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros* e *Otobios*. A família Nuttalliellidae não possuem representantes na região neotropical, e limita-se ao continente africano (ONOFRIO et al., 2006; BARROS-BATTESTI, 2006; VENZAL et al., 2006).

Em seres humanos e animais, os carrapatos podem causar processos alérgicos, espoliação sanguínea e principalmente, a transmissão de agentes infecciosos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Ao infestar animais de companhia e de interesse zootécnico, os carrapatos podem ser vetores de diversos agentes, como os dos gêneros *Babesia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Theileria* e outros, além de causar prejuízos com as lesões do couro provocadas pelas reações inflamatórias causadas pela picada e fixação do artrópode (MASSARD; FONSECA, 2004)

Nos seres humanos, as infestações por carrapatos ocorrem de maneira acidental (MASSARD; FONSECA, 2004). Porém, não menos importante que em animais, uma vez que o risco de transmissão de doenças também é uma variável preocupante. Para o homem, os carrapatos podem transmitir agentes patogênicos principalmente dos gêneros *Rickettsia* e *Borrelia*, e vírus responsáveis por encefalites e doenças hemorrágicas (CONFALONIERI; MARINHO, 2007).

## 2.3 Infestação por Carrapatos em Aves Silvestres.

No Brasil existem 68 espécies de carrapatos, sendo que 46 pertencem a família Ixodidae e 22 a argasidae. Destas pelo menos 23 espécies são encontradas parasitando aves silvestres. Esse número tem crescido com o advento de novos estudos ressaltando o papel das aves nos ciclos de vida desses artrópodes (OGRZEWALSKA; PINTER, 2016)

O parasitismo por carrapatos do gênero *Amblyomma* em aves silvestres é frequente. Esses animais podem ser infestados naturalmente ou acidentalmente por formas imaturas de pelo menos doze espécies já relatadas, sendo a mais frequente nesses relatos *A. longirostre* (MARTINS et al., 2014; SANCHES et al., 2013; SANTOLIN et al., 2012; SCOFIELD et al., 2011; ARZUA et al., 2003; OLIVER; JAMES, 1989).

As aves podem adquirir a infestação por carrapatos tanto nas árvores em contato com galhos e folhas quanto no solo. Esses artrópodes se fixam geralmente na cabeça, base do bico e faixa ventral das aves. A grande importância dessas infestações está ligada principalmente a capacidade de dispersão desses artrópodes e conseqüentemente a dispersão de agentes infecciosos e parasitários que os mesmos albergam, bem como a influência dessas infestações

na bioecologia dessas aves, que ainda é pouco conhecida (SANTOLIN et al., 2012; MORSHED et al., 2005; ARZUA et al., 2003).

## 2.4 O Gênero *Amblyomma*

O gênero *Amblyomma* pertence à família Ixodidae, que são popularmente conhecidos como “carrapatos duros” pois em todas as suas fases de desenvolvimento apresentam escudo dorsal. Esta família possui cerca de 680 espécies descritas que se distribuem amplamente em todos os continentes (BARROS-BATTESTI, 2006). No Brasil, o gênero *Amblyomma* é representado por cerca de 33 espécies, sendo algumas delas endêmicas. Esses ixodídeos possuem acentuado dimorfismo sexual (Figura 1), onde machos apresentam escudo dorsal completo se estendendo até a margem posterior do corpo, e fêmeas apresentam escudo incompleto não ultrapassando a região mediana do corpo (ONOFRIO et al., 2006).



**Figura 13.** Escudo dorsal completo de um macho de *Amblyomma humerale* (-----), e incompleto de uma fêmea de *Amblyomma dissimile* (-----). Fonte: arquivo pessoal.

Segundo Onofrio (2007a), a maioria das espécies de *Amblyomma* realiza o ciclo em três hospedeiros, com raras exceções, como *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844, que algumas vezes pode fazer a ecdise do estágio de larva para ninfa sobre o hospedeiro. O ciclo biológico desses ixodídeos cursa com vários dias de alimentação e com raras exceções de espécies partenogenéticas a cópula entre macho e fêmea acontece sobre o hospedeiro, onde posteriormente as fêmeas ingurgitadas se desprendem e iniciam a oviposição de centenas de ovos no solo sob a vegetação. Uma vez concluída a postura, as fêmeas morrem, enquanto machos permanecem no hospedeiro fecundando outras fêmeas. O ciclo biológico de carrapatos deste gênero inclui ovo embrionado e três estágios ativos (larva, ninfa e adultos) que se alimentam no hospedeiro antes de prosseguirem para o próximo estágio (fase parasitária). A ecdise ocorre fora do hospedeiro, isto é, no ambiente (fase não parasitária), caracterizando um ciclo de vida heteroxeno (FACCINI; BARROS-BATESTI, 2006; OLIVER; JAMES, 1989).

As fases de vida livre de *Amblyomma* spp. são reguladas por condições climáticas, principalmente calor e umidade. Em geral, esses carrapatos são mais abundantes em locais quentes e úmidos, além disso podem sobreviver durante meses sem se alimentar (FACCINI; BARROS-BATESTI, 2006).

Quanto a especificidade parasitária de *Amblyomma* spp., são carrapatos menos específicos durante suas fases imaturas podendo parasitar uma vasta gama de hospedeiros, enquanto que adultos preferem animais específicos. A variedade de hospedeiros é bastante

representativa, e compreende grande parte da ordem dos mamíferos. As aves são parasitadas geralmente por formas imaturas, sendo raros os achados de adultos nesse grupo de animais. Os anfíbios e répteis também estão entre os hospedeiros deste grupo de artrópodes (Figura 14), e são frequentemente infestados por todos os estágios de desenvolvimento (FACCINI; BARROS-BATESTI, 2006; ONOFRIO et al., 2006; OLIVER; JAMES, 1989).

## 2.5 Agentes Zoonóticos Transmitidos por Carrapatos do Gênero *Amblyomma* no Brasil

Segundo o “Centers for disease control and prevention (CDC)” muitos agentes infecciosos virais, bacterianos e parasitários podem ser transmitidos por carrapatos aos seres humanos e animais, onde arboviroses, borrelioses e babesioses são exemplos dessas doenças (CDC, 2014). No Brasil foram diagnosticadas duas doenças em humanos frequentemente associadas a carrapatos, a Febre Maculosa (FM) com vários casos confirmados tanto em humanos como em animais, e a Borreliose Humana Brasileira (BHB), similar a Doença de Lyme da América do Norte (FONSECA et al., 2005; YOSHINARI et al., 2010). Essas doenças são graves e de diagnóstico difícil, sendo importantes para as várias especialidades médicas, uma vez que possuem apresentações clínicas bastante complexas (YOSHINARI, 2009)

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias gram-negativas intracelulares e pleomórficas (LA SCOLA; RAOULT, 1997), que até o ano 2000 eram conhecidos apenas três espécies de ocorrência na América do Sul, sendo duas espécies do Grupo Tifo (GT) *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi* transmitidas por piolhos e pulgas respectivamente, e uma do Grupo da Febre Maculosa (GFM), *Rickettsia rickettsii* transmitida por carrapatos, todas três espécies são patogênicas a humanos (LABRUNA, 2009). Porém a partir do ano 2000, pelo menos sete outras espécies de *Rickettsia* foram relatadas infectando artrópodes no Brasil e outros países da América do Sul, tais como *Rickettsia felis* em pulgas (Argentina, Brasil, Chile, Peru e Uruguai); *Rickettsia parkeri* (Argentina, Brasil e Uruguai), *Rickettsia massiliae* (Argentina), *Rickettsia amblyomatis* (Argentina, Brasil e Guiana Francesa), *Rickettsia bellii* (Argentina e Brasil), *Rickettsia rhipicephali* (Brasil) e *Candidatus “Rickettsia andeanae”* (Brasil e Peru) infectando carrapatos. Todas essas espécies estão no GFM, com exceção de *Rickettsia bellii* que pertence a um Grupo Ancestral (FUXELIUS et al., 2007; LABRUNA, 2009; NIERI-BASTOS et al., 2014).

A FM é uma doença zoonótica, febril aguda, e tem como agente etiológico *Rickettsia rickettsii* (ANGERAMI et al., 2006). Esta doença tem sido descrita no Brasil desde 1920, com diminuição dos casos relatados com o passar dos anos. Porém, na década de 1990 houve um ressurgimento da doença, que em 2007 contabilizou 255 casos confirmados em São Paulo (LABRUNA, 2009). O Rio de Janeiro somente no período de 2015 a 2018, já contabilizou 55 óbitos (BRASIL, 2018c).

A maior parte dos casos se concentra na região sudeste, acompanhando a distribuição do carrapato vetor *Amblyomma sculptum*, que ocorre em abundância também nas regiões Centro Oeste, Nordeste e parte do Sul (FIOL et al., 2010; MARTINS et al., 2010).

A BHB é uma doença que determina complicações sistêmicas e recorrentes, incluindo distúrbios imunológicos ao longo da prolongada evolução clínica. É causada por espiroquetas do complexo *Borrelia burgdorferi sensu lato* de morfologia atípica não espiralada, que se assemelha a *Mycoplasma* spp. e *Chlamydia* spp. Este agente precisa ser estudado para melhor entendimento quanto sua espécie, cujo inquéritos sorológicos revelaram sua circulação em várias regiões do Brasil (GALO et al., 2009; YOSHINARI et al., 2010; CORDEIRO et al., 2012).

Esta doença de origem infecciosa, tem seu agente etiológico transmitido por carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e/ou *Rhipicephalus*. Acredita-se que *A. sculptum* seja o transmissor das espiroquetas ao homem, pois já se verificou o desenvolvimento da BHB após a picada

acidental por esse carrapato (YOSHINARI et al., 2010). Além disso, os carrapatos das espécies *A. aureolatum*, *Ixodes* sp., *I. didelphidis* e *I. loricatus* foram identificados em roedores e marsupiais infectados com espiroquetas morfologicamente semelhantes às do gênero *Borrelia* (ABEL et al. 2000). Particularmente no Estado de Espírito Santo, existe uma importante associação entre a ocorrência de casos de BHB e presença de capivaras, sugerindo que carrapatos que parasitam estes roedores possam participar no ciclo epidemiológico da BHB. Igualmente importante é o desenvolvimento de sintomas clínicos dessa doença após o contato dos carrapatos com animais domésticos como cavalos, cachorros e bovinos (YOSHINARI et al., 2010).

# CAPÍTULO I

**DETECÇÃO DE DNA DE *Rickettsia* spp. E *Borrelia* spp. EM CARRAPATOS EM FASE DE VIDA LIVRE DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO NA REGIÃO SUDESTE DO BRASIL**

## RESUMO

As unidades de conservação ambiental (UC's) brasileiras recebem muitos visitantes à procura de atividades ao ar livre como campings, trilhas, etc. Sendo assim, expostas a infestações por carrapatos e, conseqüentemente, a possíveis patógenos que os mesmos albergam. O objetivo do presente trabalho foi identificar as espécies de carrapatos na fase de vida livre, que ocorrem nas UC's dos estados do Rio de Janeiro (RJ), Espírito Santo (ES) e Minas Gerais (MG), e realizar detecção de DNA de bactérias dos gêneros *Rickettsia* e *Borrelia* por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) nesses carrapatos. Foram visitadas 17 UC's (nacionais, estaduais e municipais) onde carrapatos em fase de vida livre foram capturados utilizando armadilha de CO<sub>2</sub> e coleta manual. Foram realizados 113 diferentes pontos de coleta, sendo destes 22 fixos com repetições de quatro coletas totalizando 88 coletas nesses pontos. Os artrópodes foram identificados com chave dicotômica específica, sendo larvas e ninfas identificadas até gênero e adultos até espécie. Ninfas e adultos foram acondicionados individualmente e as larvas reservadas em *pool* e congeladas. A extração de DNA foi feita pelo protocolo fenol-clorofórmio em um total 188 amostras. A PCR foi realizada utilizando *primers* que amplificam um fragmento do gene citrato sintase e flagelina B de *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp. respectivamente. Foram coletados 1.356 carrapatos, sendo 1201 larvas, 106 ninfas e 49 adultos. As ninfas foram identificadas como *Amblyomma* spp. e os adultos como *A. oblongoguttatum* (3♂/2♀), *A. sculptum* (9♂/13♀), *A. brasiliense* (1♂/1♀), *A. dubitatum* (2♂/5♀) e *A. aureolatum* (6♂/6♀). Na PCR foi detectado DNA de *Rickettsia* spp. em 10,1% (19/188) das amostras, nenhuma amostra foi positiva para *Borrelia* spp. Das amostras positivas para *Rickettsia* spp., sete eram *pools* de larvas, oito amostras de ninfas de *Amblyomma* spp., e quatro de adultos sendo três de *A. dubitatum* e uma de *A. aureolatum*. Após sequenciamento de 19 amostras, identificou-se sequencias de *Rickettsia bellii* em todas as 19 amostras. DNA de *Rickettsia bellii* está presente em carrapatos de UC's no ES, em contrapartida, DNA de *Borrelia* spp. está ausente. A ocorrência de carrapatos do gênero *Amblyomma* em UC's dos estados do RJ, MG e ES é frequente e serve de alerta para os visitantes e autoridades responsáveis pelas UC's, sobre o risco de infestações por carrapatos e, conseqüentemente, exposição a agentes infecciosos e parasitários.

**Palavras chaves:** Mata atlântica, infestação, borreliose humana, febre maculosa

## ABSTRACT

Brazilian environmental conservation units (CUs) receive many visitors looking for outdoor activities such as camp sites, trails, etc. Thus, they are exposed to infestations by ticks and, consequently, to possible pathogens that they harbor. The objective of the present work was to identify the species of ticks in the free life stage, which occur in the State of Rio de Janeiro (State of Rio de Janeiro), State of Espírito Santo (ES) and Minas Gerais (MG), and to perform DNA detection of bacteria of the genera *Rickettsia* and *Borrelia* through the polymerase chain reaction (PCR) in these ticks. We visited 17 UC's (national, state and municipal) where free-living ticks were captured using CO<sub>2</sub> trap and manual collection. There were 113 different collection points, of which 22 were fixed with replicates of four collections totaling 88 collections at these points. The arthropods were identified with specific dichotomous key, being larvae and nymphs identified until genus and adults until species. Nymphs and adults were individually packaged and reserved larvae were pooled. DNA extraction was done by the phenol-chloroform protocol in a total of 188 samples. PCR was performed using primers that amplify a fragment of the citrate synthase gene and flagellin B from *Rickettsia* spp. and *Borrelia* spp. respectively. A total of 1,356 ticks were collected, including 1201 larvae, 106 nymphs and 49 adults. The nymphs were identified as *Amblyomma* spp. and adults such as *A. oblongoguttatum* (3♂ / 2♀), *A. sculptum* (9♂ / 13♀), *A. brasiliense* (1♂ / 1♀), *A. dubitatum* (2♂ / 5♀) and *A. aureolatum* (6♂ / 6♀). PCR was detected in *Rickettsia* spp. in 10.1% (19/188) of the samples, no sample was positive for *Borrelia* spp. Of the positive samples for *Rickettsia* spp., Seven were pools of larvae, eight samples of nymphs of *Amblyomma* spp., And four of adults were three of *A. dubitatum* and one of *A. aureolatum*. After sequencing samples, *Rickettsia bellii* sequences were identified in all 19 samples. *Rickettsia bellii* DNA is present in ticks of UC's in ES, in contrast, DNA from *Borrelia* spp. is absent. The occurrence of *Amblyomma* ticks in UC's of the states of RJ, MG and ES is frequent and serves as a warning to visitors and authorities responsible for CUs about the risk of tick infestations and, consequently, exposure to infectious and parasitic agents.

Keywords: Atlantic rain forest, infestation, human borreliosis, spotted fever

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é detentor de uma megabiodiversidade distribuída em seus vários biomas e algumas características dessa diversidade são passíveis de proteção, como as espécies endêmicas de fauna e flora, indícios arqueológicos e antropológicos deixados por animais e povos antigos (BRASIL, 2019). Para preservação desse patrimônio natural e cultural, foram criadas as Unidades de Conservação Ambiental (UC's), que também servem como áreas de educação socioambiental, e uso recreativo para a população (BRASIL, 2018a).

Nos últimos anos a sociedade brasileira vem adquirindo cada vez mais afinidade por atividades ao ar livre e as UC's são destinos cada vez mais procurados (SZEREMETA; ZANNIN, 2013). O contato com a natureza é uma das necessidades fundamentais de quem procura por esses lugares, porém, esse contato nem sempre é benéfico. Essas áreas possuem artrópodes hematófagos, principalmente mosquitos e carrapatos que normalmente parasitam animais, mas com o aumento do fluxo de pessoas as infestações em humanos têm se tornado cada vez mais comuns, servindo de alerta para o risco de transmissão de doenças ou problemas alérgicos (RIBEIRO et al., 2010).

Em associação ao risco de infestação, temos também a invasão das UC's por espécies exóticas e/ou nativas de outras regiões como javalis e capivaras, que além de causarem impactos consideráveis, também podem servir como hospedeiros dos carrapatos e também como reservatórios/amplificadores de doenças (RIBEIRO et al., 2010; COCATE et al., 2015)

As doenças transmitidas por carrapatos ocupam o segundo lugar entre as enfermidades veiculadas por artrópodes aos humanos, ficando atrás somente das transmitidas por mosquitos. Porém, quando é levado em consideração a transmissão para animais, as doenças transmitidas por carrapatos ocupam o primeiro lugar no *ranking* (CORDEIRO, 2012).

Existem no Brasil, duas zoonoses frequentemente associadas a carrapatos; a Febre Maculosa (FM) que possui altas taxas de incidência todos os anos, principalmente na região sudeste do Brasil (BRASIL, 2018c), e a Borreliose Humana Brasileira, similar a Doença de Lyme descrita na América do Norte, causadora de dores articulares e desordens imunológicas crônicas (FONSECA et al., 2005; YOSHINARI et al., 2010).

Essas doenças são graves e de diagnóstico difícil, sendo importantes para as várias especialidades médicas, uma vez que possuem apresentações clínicas bastante complexas (YOSHINARI, 2009). Baseado nisso, o objetivo deste trabalho foi relatar a ocorrência de espécies de carrapatos em estágio não parasitário encontrados em Unidades de Conservação (UC's) nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, bem como realizar a detecção de DNA de *Borrelia* spp. e *Rickettsia* spp. que infectam esses carrapatos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aspectos Éticos

Este trabalho foi realizado com permissão do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio sob o número de protocolo 45198-2 (Anexo A).

### 2.2 Descrição dos Locais de Coleta

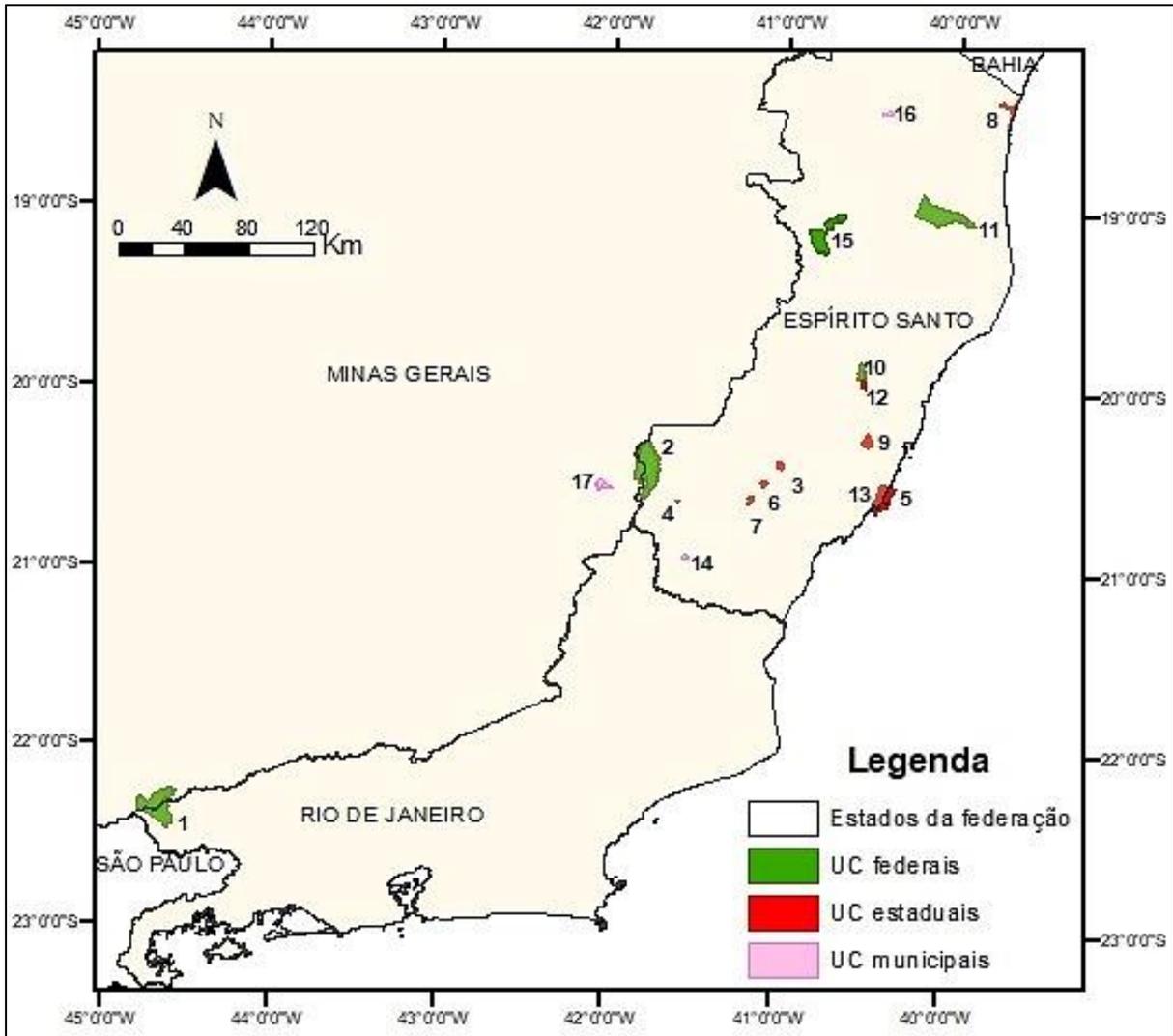
As coletas foram realizadas no ano de 2015 em Unidades de conservação (UC's) Federais, Estaduais e Municipais nos estados do Rio de Janeiro (RJ) e Espírito Santo (ES) e em suas regiões limítrofes com o estado de Minas Gerais (MG). Foram visitadas 17 UC's, classificadas como Parque nacional (ParNa), Parque estadual (PE), Reserva biológica (ReBio), Estação biológica (EB), áreas de proteção ambiental (APA) e monumentos naturais (MoNa).

As localizações das UC's e a quantidade de pontos de coleta realizados estão disponíveis na tabela 1 e Figura 1. Informações mais detalhadas sobre os locais de coleta e coordenadas geográficas de cada ponto, estão disponíveis nos apêndices A, B e C.

**Tabela 1.** Descrição dos locais e número de pontos de coleta realizado em cada Unidade de Conservação (UC's).

N	UF	Município	UC's	N. de pontos de coleta
1	RJ	Itatiaia	ParNa de Itatiaia	22 (88*)
2		Ibitirama (Alto Caparaó/Caparaó)	ParNa do Caparaó	17
3		Domingos Martins	PE Pedra Azul	5
4		Alegre/Ibitirama	PE Cachoeira da Fumaça	6
5		Guarapari	PE Paulo César Vinha	5
6		Castelo	PE do Forno Grande	6
7		Castelo	PE Mata das Flores	5
8		Conceição da Barra	PE Itaúnas	6
9	ES	Cariacica	ReBio Duas Bocas	5
10		Santa Teresa	ReBio Augusto Ruschi	5
11		Sooretama/Jaguaré/Linhares	ReBio Sooretama	7
12		Santa Teresa	EB Santa Lúcia	4
13		Guarapari	APA de Setiba	4
14		Mimoso do Sul	MoNa do Pico dos Pontões	4
15		Pancas	MoNa dos Pontões Capixabas	4
16		Nova Venécia	MoNa da Pedra da Fortaleza	4
17	MG	Espera Feliz	APA Alto Taboão	4
<b>TOTAL</b>		-	-	113

ParNa - Parque nacional; PE - Parque estadual; ReBio - Reserva biológica; EB - Estação biológica; APA - área de proteção ambiental; MoNa - monumento natural; \*no ParNa Itatiaia foram realizadas quatro coletas em 22 pontos fixos a cada estação do ano, totalizando 88 coletas durante um ano;



**Figura 1.** Mapa com a distribuição das UC's estudadas no RJ, ES e MG. 1- ParNa de Itatiaia, 2 - ParNa do Caparaó, 3 - PE Pedra Azul, 4 - PE Cachoeira da Fumaça, 5 - PE Paulo César Vinha, 6 - PE do Forno Grande, 7 - PE Mata das Flores, 8 - PE Itaúnas, 9 - ReBio Duas Bocas, 10 - ReBio Augusto Ruschi, 11 - ReBio Sooretama, 12 - EB Santa Lúcia, 13 - APA de Setiba, 14 - MoNa do Pico dos Pontões, 15 - MoNa dos Pontões Capixabas, 16 - MoNa da Pedra da Fortaleza, 17- APA Alto Taboão. Fonte: Delimitação das Unidades Federativas – IBGE 2014 e Brasil (2019b); Datum SIGAS2000 (23K e 24s), produzido no software ArcGIS.

As coletas realizadas no ParNa de Itatiaia foram feitas em pontos fixos durante as quatro estações do ano. Este parque foi o único local que foi visitado mais de uma vez, devido sua posição estratégica que favorecia a logística das visitas.

Os pontos de coleta foram escolhidos levando em consideração características como: proximidade com trilhas utilizadas por humanos e presenças de tocas ou indícios de passagem de animais nativos.

### 2.3 Método de Coleta de Carrapatos

As coletas foram realizadas utilizando dois métodos de captura de carrapatos em fase de vida não parasitário: Armadilha química de CO<sub>2</sub> segundo Cançado et al. (2008) com modificações segundo Silveira (2010) e remoção mecânica dos artrópodes das vestes e corpo dos pesquisadores. A armadilha química tem como princípio a atração de carrapatos pelo CO<sub>2</sub>, que é produzido pela reação de ácido láctico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>), diluído a 20% com carbonato de cálcio

(CaCO<sub>3</sub>). Após captura os carrapatos foram acondicionados em tubos de polipropileno que continham RNA later®.

## 2.4 Identificação dos Carrapatos

Os carrapatos adultos foram identificados em nível de espécie, enquanto as larvas e as ninfas foram identificadas somente até nível de gênero (impossibilidade de identificação morfológica específica causada pelo método de acondicionamento). Para isso, foram utilizados microscópio estereoscópico e a chave dicotômica modificada de Guimarães et al. (2001) *in* Barros-Battesti et al. (2006). Após identificação os artrópodes foram acondicionados novamente em tubos de poliestileno com RNA later® e depois congelados.

## 2.5 Extração de DNA e Reação em cadeia de Polimerase (PCR)

Os carrapatos mantidos conservados em RNA later® foram lavados em água destilada por três vezes e re-hidratados em 200 µL de PBS “phosphate buffered saline”, adultos e ninfas foram acondicionados individualmente, já as larvas foram acondicionadas em “pool” de 20, em tubos de poliestileno de 1,5 mL totalizando 188 amostras. Em seguida adicionou-se sete esferas de óxido de zircônio de 2 mm e 80 mg de esferas de vidro de 0,1 mm, ambas autoclavadas, para a trituração em Minibeadbeater BIOSPEC® por 1 minuto.

A lise celular foi efetuada com a adição de 250 µL de solução de digestão (20 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% “sodium dodecyl sulfate”, 10mM CaCl<sub>2</sub>) com 20 µL de proteinase k (20 mg/mL) em incubação “overnight” à temperatura de 56° Celsius. O DNA foi extraído por um tratamento com Fenol e outro tratamento com fenol-clorofórmio seguido de precipitação com isopropanol. O DNA precipitado (formado após centrifugação de 16000 xG) foi lavado duas vezes com álcool 70% e suspenso em 100 µL de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA pH 9,0) em “overnight” à 4°C (SANTOLIN et al., 2013). Para verificar a eficiência da técnica de extração de DNA todas as amostras foram submetidas a uma prévia amplificação de uma sequência parcial do gene 16S rRNA de carrapato, seguindo o protocolo estabelecido por Mangold et al. (1998).

A presença de DNA de *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp. foi detectada por Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) e Nested PCR respectivamente, usando os oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) (INVITROGEN / LIFE TECHNOLOGIES®) descritos na Tabela 2. Em cada reação continha 3 µL de DNA, 14,2 µL de água, 2 µL de “primers” (10 µM F+R), 2,5 µL de tampão (10X concentrado), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) e 2 µL de dNTP’s (2,5 mM) e 0,15µL Taq DNA polimerase (PROMEGA®) em um volume final de 25 µL. Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA obtidas dos agentes mantidos em laboratório, para *Rickettsia* spp., foi utilizado DNA controle positivo de *R. parkeri* cepa At24 mantida em cultivo de células VERO. Já os controles positivos de *Borrelia* spp. foram obtidos a partir de um isolado de *B. anserina* mantida em nitrogênio líquido no Laboratório de Doenças Parasitárias-UFRRJ. Como controles negativos para as reações, foram utilizadas amostras de DNA de carrapatos mantidos em laboratório e previamente testados e para o controle de contaminação foi utilizado água ultrapura.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e visualizados em Transiluminador-UV.

**Tabela 2.** Pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação de genes de *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp. por PCR.

<i>Primer</i>	Gene	Sequência de Nucleotídeo (5'- 3')	Tamanho do Fragmento	Origem
CS239 F CS1069 R	<i>gltA</i>	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT CAGGGTCTTCGTGCATTCTT	834pb*	Labruna et al. (2004)
BorFlaF1 BorFlaR1	<i>FlaB</i>	TACATCAGCTATTAATGCTTCAAGA GCAATCATWGCCATTGCRGATTG	729pb* (1)	Blanco et al. (2017)
BorFlaF2 BorFlaR2	<i>FlaB</i>	CTGATGATGCTGCTGGWATGG TCATCTGTCATTRTWGCATCTT	410pb* (2)	Blanco et al. (2017)

\*Pb: pares de base;(1) e (2): Nested-PCR

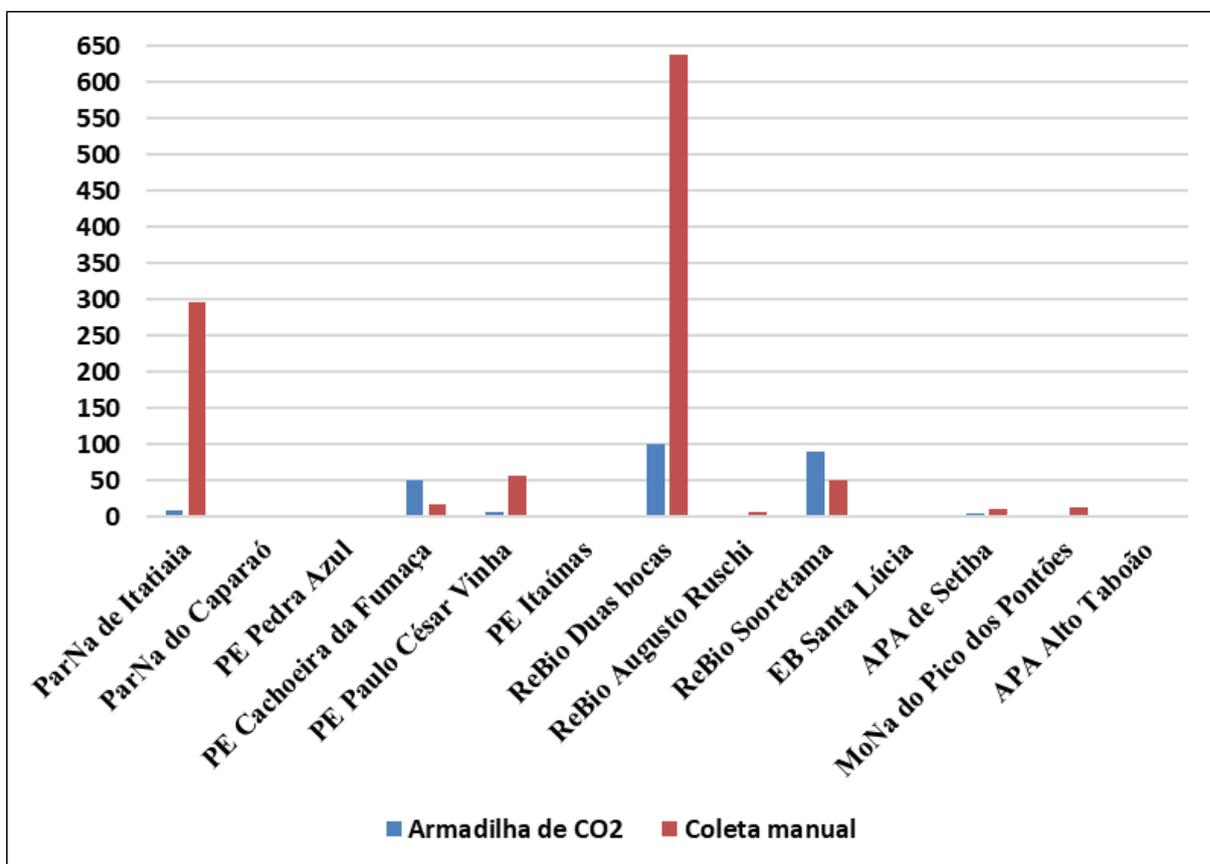
## 2.6 Sequenciamento

As amostras positivas (produtos) na PCR foram purificadas com kit comercial USB® ExoSAP-IT® PCR cleanup reagent (THERMOFISHER) seguindo o protocolo indicado pelo fabricante e submetidas a sequenciamento pelo método de Sanger. As sequências parciais obtidas foram comparadas com sequências dos genes *gltA* e *FlaB* disponíveis no *GenBank* utilizando a plataforma BLAST-NCBI.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram coletados o total de 1.356 carrapatos em fase não parasitária, sendo 1.201 larvas, 106 ninfas e 49 adultos (Tabela 3), distribuídos em 13 UC's nos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e suas divisas com Minas Gerais. Houve ausência de captura de carrapatos em quatro UC's: PE do Forno Grande - ES, PE Mata das Flores - ES; MoNa dos Pontões Capixabas - ES e MoNa da Pedra da Fortaleza – ES. A ausência de captura nesses locais pode ter sido influenciada pelo clima chuvoso no dia de coleta.

Tais locais foram escolhidos por se tratarem de áreas de visitação de grande volume de pessoas, somente o ParNa de Itatiaia recebeu em 2016 cerca de 127.494 visitantes (BRASIL, 2017). Devido esse volume de visitantes associado a quantidade de carrapatos encontrados, os relatos de infestação são frequentes nesses locais. Esse fato também foi observado com o método de captura onde esses artrópodes foram mais frequentes, isto é, através da coleta manual (vestimenta e corpo dos pesquisadores) (Figura 2).



**Figura 2.** Gráfico da coleta de carrapatos nas UC's utilizando dois métodos de captura, a armadilha de CO<sub>2</sub> e coleta manual. Eixo x- número de carrapatos coletados. Eixo y-locais de coleta.

**Tabela 3.** Descrição do total de Ixodídeos coletados em fase não parasitária, estágio de desenvolvimento, gênero/espécie e locais e tipo de captura, nas UC's do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Minas Gerais, Brasil.

UC's	Tipo de captura		Gênero/espécie (Quantidade e estágio de desenvolvimento)	Total por localidade
	Armadilha de CO <sub>2</sub>	Coleta manual		
ParNa de Itatiaia-RJ	8	297	<i>Amblyomma</i> spp. (294 L/10 N); <i>A. sculptum</i> (1 ♂)	305
ParNa do Caparaó-ES/MG	2	-	<i>Amblyomma</i> sp. (1 N); <i>A. sculptum</i> (1 ♀)	2
PE Pedra Azul-ES	1	-	<i>Amblyomma</i> sp. (1 N)	1
PE Cachoeira da Fumaça-ES	49	17	<i>Amblyomma</i> spp. (49 L/6 N); <i>A. sculptum</i> (5 ♂/2 ♀); <i>A. dubitatum</i> (4♀)	66
PE Paulo César Vinha-ES	6	56	<i>Amblyomma</i> spp. (52 L/1 N); <i>A. sculptum</i> (3 ♂/5 ♀); <i>A. dubitatum</i> (1♂)	62
PE Itaúnas-ES	3	1	<i>Amblyomma</i> spp. (4 N)	4
ReBio Duas Bocas-ES	101	638	<i>Amblyomma</i> spp. (730 L/6 N); <i>A. sculptum</i> (1 ♂/2 ♀)	739
ReBio Augusto Ruschi-ES	-	6	<i>Amblyomma</i> spp. (4 N); <i>A. brasiliense</i> (1 ♂/1 ♀)	6
ReBio Sooretama-ES	89	51	<i>Amblyomma</i> spp. (69 L/66 N); <i>A. oblongoguttatum</i> (3 ♂/2 ♀)	140
EB Santa Lúcia-ES	-	1	<i>Amblyomma</i> sp. (1 N)	1
APA de Setiba-ES	5	11	<i>Amblyomma</i> spp. (7 L/5 N); <i>A. sculptum</i> (2 ♀); <i>A. dubitatum</i> (1♂/1 ♀)	16
MoNa do Pico dos Pontões-ES	-	12	<i>A. aureolatum</i> (6 ♂/6 ♀)	12
APA Alto Taboão-MG	1	1	<i>Amblyomma</i> sp. (1 N); <i>A. sculptum</i> (1 ♀)	2
<b>TOTAL</b>	<b>265</b>	<b>1091</b>		<b>1356</b>

ParNa - Parque nacional; PE - Parque estadual; ReBio - Reserva biológica; EB - Estação biológica; APA - área de proteção ambiental; MoNa - monumento natural; L - larva, N - ninfa, ♂ - macho, ♀ - fêmea

Segundo Silveira e Fonseca (2013) e Dantas-Torres et al. (2013) o uso de diferentes técnicas de coleta imprime maior validade aos resultados, porque dependendo da técnica utilizada à abundância e a diversidade de espécies pode ser super ou subestimada.

Os espécimes de carrapatos capturados pertenciam majoritariamente ao gênero *Amblyomma*, tais como *Amblyomma* spp. (n=1307) *Amblyomma sculptum* (n=23), *Amblyomma aureolatum* (n=12), *Amblyomma dubitatum* (n=7), *Amblyomma oblongoguttatum* (n=5) e *Amblyomma brasiliense* (n=2) (Tabela 3). Espécies primariamente associadas a casos de FM, como *A. sculptum* e *A. aureolatum*, foram encontradas em algumas áreas pesquisadas, assim como *A. dubitatum*, espécie que assume importância secundária na epidemiologia da FM sendo responsável por sua manutenção na natureza, agindo como hospedeiro amplificador de *Rickettsia* spp. (LABRUNA et al., 2004; PINTER et al., 2004). Já *A. brasiliense* e *A. oblongoguttatum* estão associados a infestações em humanos, sendo as formas imaturas de *A. brasiliense* consideradas extremamente agressivas a seres humanos (GUGLIELMONE et al. 2006; SZABÓ et al., 2006; ARAGÃO, 1936).

As UC's onde as capturas foram mais frequentes são ReBio Duas Bocas-ES, ParNa de Itatiaia-RJ e ReBio Sooretama respectivamente, além dessas UC's, ixodídeos também foram capturados em mais 14 locais (Tabela 3).

Com exceção do ParNa de Itatiaia-RJ, as demais áreas pesquisadas neste estudo ainda não haviam sido estudadas com relação a diversidade de fauna ixodológica, sendo este o primeiro relato das espécies que ocorrem nesses locais. Silveira e Fonseca (2013) descreveram a ocorrência de carrapatos no ParNa de Itatiaia, onde observaram *A. brasiliense* como a espécie mais frequente. Diferente disso, no presente estudo a espécie mais encontrada foi *A. sculptum*, sendo este um achado importante e adicional ao estudo da diversidade de carrapatos nesse local. No ParNa de Itatiaia também foram realizadas quatro coletas de carrapatos, uma a cada estação do ano, e a ocorrência de carrapatos encontrada de acordo com a estação do ano corroboram com os achados de Silveira e Fonseca (2013) que descreveram maior abundância de formas imaturas no período de inverno e primavera, respectivamente.

A maior presença de formas imaturas no período de inverno tem grande impacto na epidemiologia das infestações por carrapatos, principalmente no ParNa de Itatiaia, pois nesses meses essa unidade tem um significativo aumento na frequência de visitantes, devido férias escolares e maior probabilidade de neve e geada na parte alta do parque (BRASIL, 2012). Devido a isso, as chances de infestações e transmissão de agentes infecciosos e parasitários tendem a ser maiores.

Os resultados encontrados na PCR, demonstram a presença de DNA de bactérias do gênero *Rickettsia* em 10,1% (19/188) das amostras testadas. Essas amostras positivas representaram sete das 17 UC's visitadas (Tabela 4). Todas as UC's com amostras de carrapatos positivas estavam localizadas no estado do Espírito Santo, e a maioria dessas amostras eram de formas imaturas de carrapatos (larvas e ninfas). Dos carrapatos adultos somente duas espécies foram encontradas positivas para *Rickettsia* spp., como: *A. aureolatum* e *A. dubitatum*. Em nenhuma amostra foi detectado DNA de *Borrelia* spp.

Após sequenciamento e análise das 19 amostras que apresentaram DNA de *Rickettsia* spp. das diferentes UC's, verificou-se que todas apresentavam 100% de identidade com *Rickettsia bellii* (acesso no GenBank: KX0094101).

**Tabela 4.** Unidades de conservação e espécies de carrapatos que apresentaram positividade no teste de PCR.

UC's	Gênero/espécie (Quantidade e estágio de desenvolvimento)	Resultado da PCR convencional
PE Pedra Azul-ES	<i>Amblyomma</i> spp. (1 N)	<i>Rickettsia</i> spp.
PE Cachoeira da Fumaça-ES	<i>Amblyomma</i> spp. (1 pool L/5 N); <i>A. dubitatum</i> (2♀)	<i>Rickettsia</i> spp.
PE Paulo César Vinha-ES	<i>A. dubitatum</i> (1♂)	<i>Rickettsia</i> spp.
ReBio Duas Bocas-ES	<i>Amblyomma</i> spp. (6 “pools” L)	<i>Rickettsia</i> spp.
ReBio Sooretama-ES	<i>Amblyomma</i> spp. (1 N)	<i>Rickettsia</i> spp.
EB Santa Lúcia-ES	<i>Amblyomma</i> spp. (1 N)	<i>Rickettsia</i> spp.
MoNa do Pico dos Pontões-ES	<i>A. aureolatum</i> (1♀)	<i>Rickettsia</i> spp.

PE - Parque estadual; ReBio - Reserva biológica; EB - Estação biológica; MoNa - monumento natural; L - larva; N - ninfa; ♂ - macho; ♀ - fêmea.

*Rickettsia bellii* é considerada uma bactéria de patogenicidade desconhecida para seres humanos, e já foi encontrada em várias espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* (PINTER; LABRUNA, 2006, PACHECO et al. 2008), reforçando os resultados encontrados. É importante frisar que apesar de não terem sido encontrados agentes de patogenicidade confirmada, o risco de introdução dos mesmos existe, uma vez que foram encontrados vetores dispersos no ambiente da maioria das UC's visitadas e bactérias que possuem biologia semelhantes à desses agentes patogênicos, o que garante que o ambiente possui as características necessárias para a manutenção desses patógenos.

Um fator importante que pode contribuir para a introdução de agentes patogênicos nessas áreas é a invasão por animais silvestres e exóticos que albergam esses microrganismos (CHAME, 2009). Essas invasões já foram observadas em várias UC's em todo o Brasil, no ParNa de Itatiaia, animais como javali ou javaporco (*Sus scrofa*), ratazana (*Rattus* sp.) e mico estrela de tufo preto (*Callithrix penicillata*) já foram registrados (REIS; CAMPOS, 2011; SAMPAIO; SCHMIDT, 2013).

#### 4 CONCLUSÃO

Carrapatos do gênero *Amblyomma* ocorrem em UC's dos estados do RJ, MG e ES, sendo este o primeiro relato para a maioria das áreas estudadas, com exceção do ParNa de Itatiaia – RJ, e serve de alerta para os visitantes e autoridades responsáveis pelas UC's, sobre o risco de infestações. Há também carrapatos infectados com *Rickettsia bellii* em UC's no ES, sendo ausente neste estudo DNA de *Borrelia* spp.

## **CAPÍTULO II**

**DETECÇÃO DE DNA DE BIOAGENTES EM CARRAPATOS DE AVES  
SILVESTRES DO MUNICÍPIO DE GUAPIMIRIM E PARQUE NACIONAL DA  
SERRA DOS ÓRGÃOS, ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL.**

## RESUMO

Os carrapatos são capazes de albergar diversos agentes infecciosos e parasitários, além disso, possuem a capacidade de transmitir esses agentes há diversos organismos hospedeiros. Este trabalho teve como objetivo detectar evidências moleculares da presença de hemoparasitos dos gêneros *Rickettsia*, *Borrelia*, *Babesia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia* em carrapatos coletados de aves silvestres no estado do Rio de Janeiro. Aves foram capturadas entre os meses de março e setembro de 2016 e observadas cuidadosamente a procura de ectoparasitos. Os carrapatos foram coletados com ajuda de pinças e encaminhados para extração de DNA. A pesquisa de DNA de hemoparasitos foi realizada por meio da Reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando oligonucleotídeos iniciadores que amplificam fragmentos dos genes *gltA* (*Rickettsia* spp.), *FlaB* (*Borrelia* spp.), *18S rDNA* (*Babesia* spp.), *16S rDNA* (*Anaplasma* spp.) e do gene *Dsb* (*Ehrlichia* spp.). As sequências obtidas foram analisadas e sua homologia comparada aos isolados disponíveis na base de dados da plataforma GenBank. Foram capturadas 33 aves, de 20 espécies diferentes, das quais 14 estavam parasitadas por ninfas de carrapatos que foram identificados como *A. longirostre* (n= 22). Foi detectado a presença de DNA de *Rickettsia* spp. em três amostras e de *Borrelia* spp. em uma amostra. Não foi detectado DNA de *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. Após sequenciamento, uma amostra apresentou 100% de identidade com *Rickettsia bellii*, duas amostras apresentaram 100% de identidade com *Rickettsia* sp. cepa Aranha e Cepa AL. A amostra positiva para *R. bellii* também apresentou positividade para *Borrelia* sp. que apresentou similaridade de 91% com *Borrelia turcica*. Bactérias dos gêneros *Borrelia* e *Rickettsia*. podem ser encontradas em *A. longirostre* que parasitam aves. Esta é a primeira descrição de *Borrelia* sp. em carrapatos do gênero *Amblyomma* na América do Sul.

Palavras-chaves: Unidades de conservação, ectoparasitos, riquetsias, *Borrelia*

## ABSTRACT

Ticks are capable of harboring various infectious and parasitic agents, and they can transmit these agents to various host organisms. This work aimed to detect molecular evidences of the presence of *Rickettsia*, *Borrelia*, *Babesia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* hemoparasites in ticks collected from wild birds in the state of Rio de Janeiro. Birds were caught between March and September 2016 and carefully watched for ectoparasites. The ticks were collected with the help of tweezers and sent for DNA extraction. DNA polymerase chain reaction (PCR) using oligonucleotide primers that amplify fragments of the genes *gltA* (*Rickettsia* spp.), *FlaB* (*Borrelia* spp.), *18S rDNA* (*Babesia* spp.), *16S rDNA* (*Anaplasma* spp.) and *Dsb* (*Ehrlichia* spp.). The sequences obtained were analyzed and their homology compared to the available isolates in the database of the GenBank platform. Thirty - nine birds were captured from 20 different species of which 14 were parasitized by tick nymphs that were identified as *A. longirostre* (n = 22). The presence of *Rickettsia* spp. in three samples and *Borrelia* spp. in a sample. No DNA from *Babesia* spp., *Anaplasma* spp. and *Ehrlichia* spp. After sequencing, one sample showed 100% identity with *Rickettsia bellii*, two samples showed 100% identity with *Rickettsia* sp. Aranha strain and strain AL. The positive sample for *R. bellii* also showed positivity for *Borrelia* sp. which showed 91% similarity with *Borrelia turcica*. Bacteria of the genus *Borrelia* and *Rickettsia*. can be found in *A. longirostre* parasitizing birds. This is the first description of *Borrelia* sp. in ticks of the genus *Amblyomma* in South America.

Keywords: Conservation units, ectoparasites, *Rickettsia*, *Borrelia*

## 1 INTRODUÇÃO

As aves são hospedeiras de ampla diversidade de carrapatos, especialmente nos estágios de larva e ninfa, desempenhando um importante papel na epidemiologia de várias doenças de importância para saúde pública (LABRUNA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2010; SANCHES et al., 2013; CAPLIGINA et al., 2014). Essas doenças são causadas por diversos agentes de origem infecciosa ou parasitária e que encontram no carrapato das aves condições biológicas e ecológicas para servirem de vetores ou reservatórios (HUBÁLEK, 2004; PALOMAR et al., 2012).

Nos últimos anos, estudos da associação carrapatos-aves tem aumentando exponencialmente devido sua importância na dispersão e manutenção de diferentes espécies de carrapatos, e consequentemente de seus agentes patogênicos (HUBÁLEK, 2004; LOSS et al., 2016; BUDACHETRI et al., 2017). No Brasil, estudos sobre a diversidade de carrapatos em aves têm sido realizados em diversos biomas, sendo confirmada uma predominância de *Amblyomma* spp. nesses hospedeiros (LABRUNA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2010; OGRZEWALSKA et al., 2011; LUZ et al., 2012; LUZ; FACCINI, 2013; SANCHES et al., 2013; OGRZEWALSKA; PINTER, 2016). Apesar de não haver relatos confirmados da transmissão de agentes infecciosos de carrapatos parasitando aves para humanos, são necessários estudos para preencher as lacunas relacionadas ao risco de transmissão, uma vez que as formas imaturas infectadas podem dar origem a ninfas e/ou adultos também infectados.

No Brasil *Rickettsia* spp. é transmitida por *Amblyomma* spp., e por este motivo, estudos sobre agentes infecciosos concentram-se principalmente em microrganismos deste grupo (OGRZEWALSKA et al., 2008; ELFVING et al., 2010). Agentes responsáveis pela borreliose, anaplasmose e erliquiose também podem ser transmitidos por carrapatos de diferentes gêneros. Na América do Norte e em parte da Europa o DNA desses agentes já foi detectado nesses artrópodes, que foram coletados de aves (SCOTT, et al., 2010; PALOMAR et al., 2012; ERWIN et al. 2016). Além disso, as espécies de carrapatos encontrados em aves também podem infestar seres humanos (GUGLIELMONE et al., 2006). Por estes motivos, existe a necessidade de estudos que caracterizem os microrganismos que infectam carrapatos encontrados em aves, para um melhor entendimento da diversidade e ecologia das zoonoses transmitidas por esses artrópodes.

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi detectar através de técnicas moleculares, hemoparasitos presentes em carrapatos oriundos de aves do município de Guapimirim e do Parque Nacional da Serra dos Órgãos no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Aspectos Éticos

O estudo foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e foi conduzido com a permissão do IBAMA; número de processo 43917/3/2505369 (Anexo B).

### 2.2 Descrição dos Locais do Estudo

O estudo foi realizado no município de Guapimirim (latitude: 22° 31' 14"/ longitude: 43° 00' 52"; altitude 256 metros) e no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (latitude: 22° 31' 43"/ longitude: 43° 00' 12"; altitude 256 metros), ambos localizados no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Um total de três visitas de campo, com duração de quatro dias cada, foram realizadas entre março e setembro de 2016 ao local de estudo.

### 2.3 Métodos de Captura das Aves e Coleta de Carrapatos

As aves foram capturadas entre 06:00 e 17:00 horas do dia, utilizando-se de 5-20 redes ornitológicas modelo mist (12m de comprimento X 3m de largura, malha de 16mm e 36mm), foram fotografadas e identificadas seguindo as recomendações de Sigrist (2013), usando nomenclatura aprovada pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO, 2014). Cada pássaro foi examinado quanto à presença de carrapatos, e quando presentes, foram removidos com pinça e colocados em tubos de polipropileno de 1,5 mL, contendo álcool 70% para identificação. As amostras foram inicialmente armazenadas à temperatura ambiente por até 4 dias. Após a coleta das amostras, as aves foram anilhadas e soltas vivas no mesmo local de captura.

### 2.4 Identificação e Armazenamento dos Carrapatos

Após a chegada ao laboratório, os carrapatos foram examinados microscopicamente para identificação, sendo realizada utilizando chave dicotômica segundo Martins et al. (2010) com o auxílio de um microscópio estereoscópico. Após identificação, os artrópodes foram armazenados em RNA later® e congelados até serem processados para análises moleculares.

### 2.5 Preparo das Amostras e Extração de DNA

Os carrapatos mantidos conservados em RNA later® foram lavados em água destilada por três vezes e re-hidratados em 200 µL de PBS (*phosphate buffered saline*), os ixodídeos foram acondicionados individualmente em tubos de polietileno de 1,5 mL. Em seguida, adicionou-se sete esferas de óxido de zircônio de 2 mm e 80 mg de esferas de vidro de 0,1 mm, ambas autoclavadas, para a trituração em Minibeadbeater BIOSPEC® por 1 minuto.

A lise celular foi efetuada com a adição de 250 µl de solução de digestão (20 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% *sodium dodecyl sulfate*, 10mM CaCl<sub>2</sub>) com 20 µl de proteinase k (20 mg/ml) em incubação *overnight* à temperatura de 56° Celsius. O DNA foi extraído por um tratamento com fenol e outro tratamento com fenol-clorofórmio seguido de precipitação com isopropanol. O pellet de DNA (formado após centrifugação de 16000 xg) foi

lavado duas vezes com álcool 70% e ressuspenso em 100 µl de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA pH 9,0) em “overnight” à 4°C (SANTOLIN et al., 2013).

## 2.6 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi testado por uma bateria de ensaios de PCR visando microrganismos dos gêneros *Rickettsia*, *Borrelia*, *Ehrlichia* e protozoários do gênero *Babesia*. E para isso, utilizou iniciadores específicos para cada agente citado, seguindo o protocolo original de cada iniciador (Tabela 1).

Nas reações foi utilizado reagentes da marca PROMEGA®, e em cada reação continha 3 µL de DNA, 14,2 µL de água, 2 µL de *primers* (10 µM F+R), 2,5 µL de tampão (10X concentrado), 1,25 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM) e 2 µL de dNTP's (2,5 mM) e 0,15µL Taq DNA polimerase (PROMEGA®) em um volume final de 25µL.

Como controles positivos foram utilizadas amostras de DNA obtidas dos agentes mantidos em laboratório, para *Rickettsia* spp., foi utilizado DNA controle positivo de *R. parkeri* cepa At24 mantida em cultivo de células VERO. Já os controles positivos de *Borrelia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Babesia* spp. foram obtidos a partir de isolados mantidos em nitrogênio líquido no Laboratório de Doenças Parasitárias-UFRRJ. Como controles negativos para as reações, foram utilizadas amostras de DNA de carrapatos mantidos em laboratório e previamente testados e para o controle de contaminação foi utilizado água ultrapura.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e visualizados em Transiluminador-UV.

**Tabela 1.** Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados, seus respectivos genes alvos e o tamanho do fragmento amplificado.

Iniciador	Gene	Organismo	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Tamanho do fragmento	Referência
CS239 F CS1069 R	<i>gltA</i>	<i>Rickettsia</i> spp.	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	834 pb	Labruna et al. (2004)
BorFlaF1 BorFlaR1 BorFlaF2 BorFlaR2	<i>flaB</i>	<i>Borrelia</i> spp.	TACATCAGCTATTAATGCTTCAAGAA GCAATCATWGCCATTGCRGATTG CTGATGATGCTGCTGGWATGG TCATCTGTCATTRTWGCATCTT	740 pb (1) 410 pb (2)	Blanco et al. (2017)
Hptf HptR	<i>hpt</i>	<i>Borrelia</i> spp.	GCAGAYATTACAAGAGARATGG CYTCRTCACCCCATTTGAGTTCC	433 pb	McCoy et al. (2014)
glpQ + 1 Glpq - 1	<i>glpQ</i>	<i>Borrelia</i> spp.	GGGGTTCTGTTACTGCTAGTGCCATTAC CAATTTTAGATATGTCCTTACCTTGTTGTTTATGCC	817 pb	Schwan et al. (2005).
BT-F3 BT-R3	18S rRNA	Ordem Piropasmida	TGGGGGGAGTATGGTCGCAAG CTCCTTCCTTTAAGTGATAAG	650 pb	Seo et al. (2013)
DSB-330 DSB-380 DSB-720	<i>Dsb</i>	<i>Ehrlichia</i> spp.	GATGATGCTTGAAGATATSAAACAAAT ATTTTTAGRGATTTTCCAATACTTGG CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC	349 pb	Almeida et al. (2013)
ge3A ge10R ge9f ge2	16S rRNA	<i>Anaplasma bovis</i> , <i>Anaplasma platys</i> e <i>Anaplasma phagocytophilum</i>	CACATGCAAGTCGAACGGAT TATTC TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG	546 pb	Massung et al. (1998)

pb – pares de base; (1) e (2): Nested-PCR

## 2.7 Sequenciamento e Análise Filogenética

As amostras positivas na PCR foram submetidas a sequenciamento e análises filogenéticas. Os “*contigs*” das amostras sequenciadas estão disponíveis no apêndice E.

O alinhamento de múltiplas sequências foi realizado a partir das sequências obtidas no presente estudo e sequências obtidas no GenBank, utilizando o algoritmo MUSCLE, no programa SeaView v.4 (GOUY et al., 2010). O melhor modelo evolutivo foi determinado por meio do programa MEGA versão 7, utilizando o critério de informação Bayesiana (KUMAR et al., 2016). As relações filogenéticas foram estimadas usando (a) inferência filogenética de máxima verossimilhança (ML), usando PhyML implementado no SeaView (GOUY et al., 2010) e (b) um método bayesiano de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) implementado no MrBayes v.3.2.6 (RONQUIST et al., 2012). As configurações do MCMC consistiam em duas corridas independentes simultâneas com 4 correntes cada, executadas por 10 milhões de gerações e amostradas a cada 100ª geração, gerando 100.000 árvores. Depois de eliminar 25% das amostras com *burn-in*, foi construída uma árvore de consenso. O suporte estatístico dos clados foi medido por uma pesquisa heurística com 1000 réplicas bootstrap e probabilidades bayesianas posteriores.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dados detalhados da associação carrapato-ave reportado no atual estudo estão na Tabela 2. No total foram capturadas 33 aves, representando três ordens, sete famílias e 20 espécies, dos quais 14 (42%) espécimes, de 9 espécies (45%), estavam parasitadas por 22 formas imaturas de *Amblyomma* spp.

Aves da ordem Passeriformes foram as mais frequentes com 27 (82%) espécimes capturados, divididos em cinco famílias e 15 espécies. As ordens Columbiformes e Cuculiformes foram as menos frequentes nesse estudo.

Nenhum carrapato foi registrado nas seguintes espécies de aves: Passeriformes - *Myiozetetes similis*, *Coereba flaveola*, *Sicalis flaveola*, *Tangara cayana*, *Tangara sayaca*, *Troglodytes musculus*; Columbiformes - *Leptotila rufaxilla*, *Geotrygon montana*, *Columbina talpacoti*; Cuculiformes - *Piaya cayana*.

Após análises em laboratório, todos carrapatos foram identificados como ninfas de *Amblyomma longirostre*. No geral, as infestações encontradas nas aves foram baixas, não ultrapassando uma intensidade média de 2,5/ave. Todos carrapatos foram coletados na região da cabeça e pescoço.

O parasitismo por imaturos de *A. longirostre* em aves silvestres tem sido reportado por toda região Neotropical, especialmente em aves da ordem passeriformes (LABRUNA et al., 2007; NAVA et al., 2010; LUZ; FACCINI, 2013; OGRZEWALSKA; PINTER, 2016; LUZ et al., 2017). Esses achados reforçam a importância de aves silvestres na manutenção e dispersão deste ectoparasito, sendo o principal grupo de hospedeiros para formas imaturas de *A. longirostre* no meio silvestre. No entanto, o hospedeiro preferencial dos estágios adultos deste carrapato são mamíferos roedores arbóreos do gênero *Coendou*, *Chaetomys* e *Sphiggurus* (Erethizontidae) (NAVA et al., 2010; GUGLIELMONE et al., 2014). Os hábitos arborícolas de seus hospedeiros primários podem justificar a presença das formas imaturas nas aves que tendem a compartilhar hábitos semelhantes, sugerindo um ciclo arbóreo para *A. longirostre* (LABRUNA, et al., 2007).

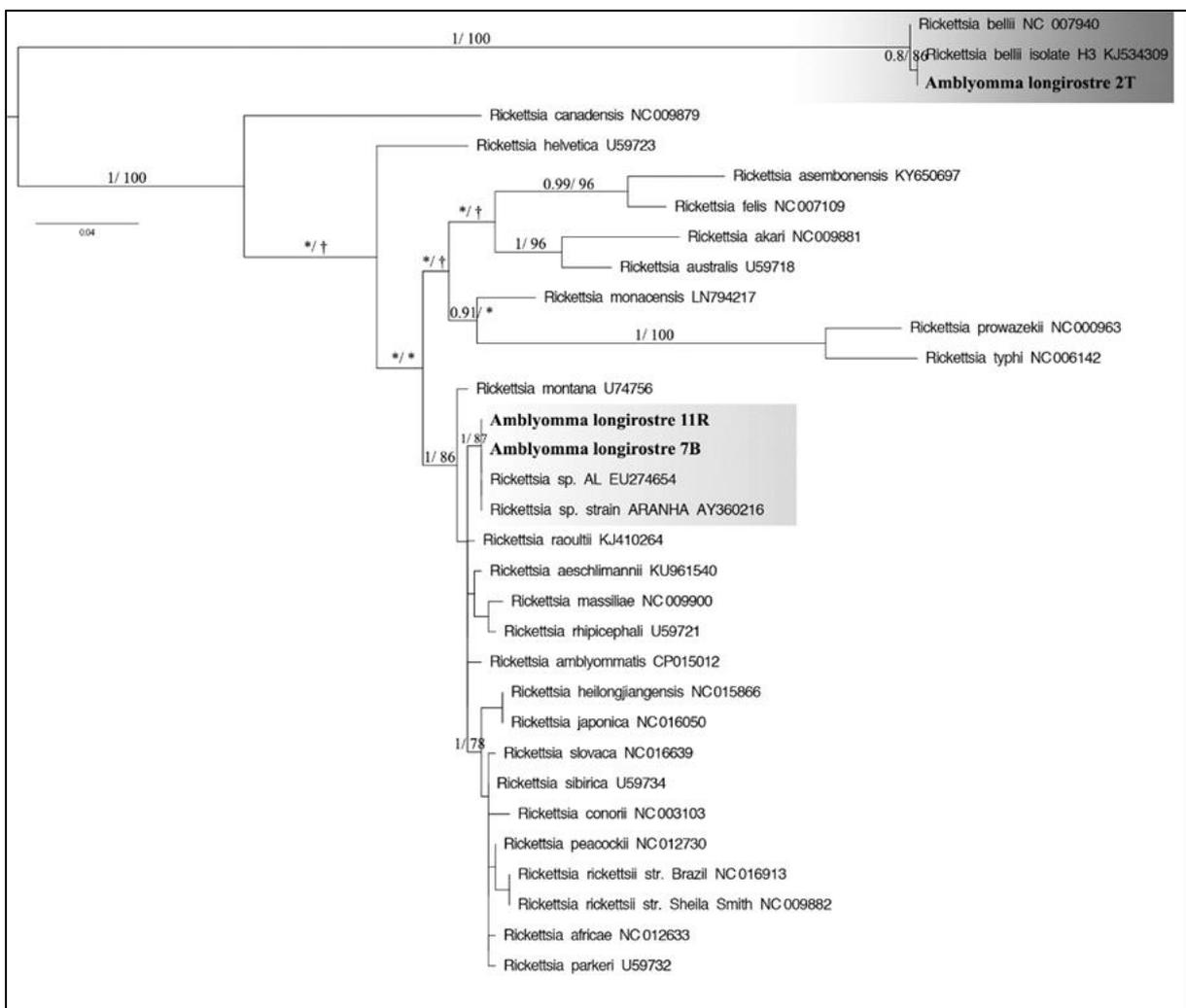
**Tabela 2.** Identificação das aves capturadas e carrapatos coletados em Guapimirim e no Parque Nacional da Serra dos Órgãos, Rio de Janeiro, Brasil, bem como a intensidade média de infestação de carrapatos encontrada nas aves.

ORDEM	FAMILIA	ESPÉCIES	AC	AI	PI (%)	NCC	IMI	ECI
Passeriformes	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	1	1	100 (%)	1	1	<i>Amblyomma longirostre</i>
		<i>Mionectes oleagineus</i>	1	1	100 (%)	2	2	<i>Amblyomma longirostre</i>
		<i>Myiozetetes similis</i>	1	0				
	Pipridae	<i>Manacus manacus</i>	3	3	100 (%)	5	1.6	<i>Amblyomma longirostre</i>
	Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i>	1	1	100 (%)	1	1	<i>Amblyomma longirostre</i>
		<i>Turdus leucomelas</i>	4	2	50 (%)	5	2.5	<i>Amblyomma longirostre</i>
	Thraupidae	<i>Turdus amaurochalinus</i>	2	1	50 (%)	1	1	<i>Amblyomma longirostre</i>
		<i>Coereba flaveola</i>	1	0				
		<i>Sicalis flaveola</i>	1	0				
		<i>Tachyphonus coronatus</i>	4	2	50 (%)	3	1.5	<i>Amblyomma longirostre</i>
		<i>Tangara seledon</i>	3	2	66 (%)	2	1	<i>Amblyomma longirostre</i>
		<i>Tangara cayana</i>	2	0				
		<i>Tangara sayaca</i>	1	0				
	Columbiformes	Troglodytidae	<i>Saltator similis</i>	1	1	100 (%)	2	2
<i>Troglodytes musculus</i>			1	0				
Columbidae		<i>Leptotila rufaxilla</i>	2	0				
		<i>Geotrygon montana</i>	1	0				
		<i>Columbina talpacoti</i>	2	0				
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Piaya cayana</i>	1	0				

**AC:** número de aves capturadas; **AI:** aves infestadas; **PI:** Prevalência de infestação; **NCC:** número de carrapatos coletados; **IMI:** Intensidade média de infestação; **ECI:** Espécie de carrapato identificado.

A análise molecular pelos iniciadores CS239/CS1069 revelou uma amplificação de 838 pb do gene *gltA* de *Rickettsia* spp. em três amostras de *A. longirostre* coletadas em aves de três espécies diferentes: *Saltator similis*, *Turdus leucomelas* e *Tangara seledon*.

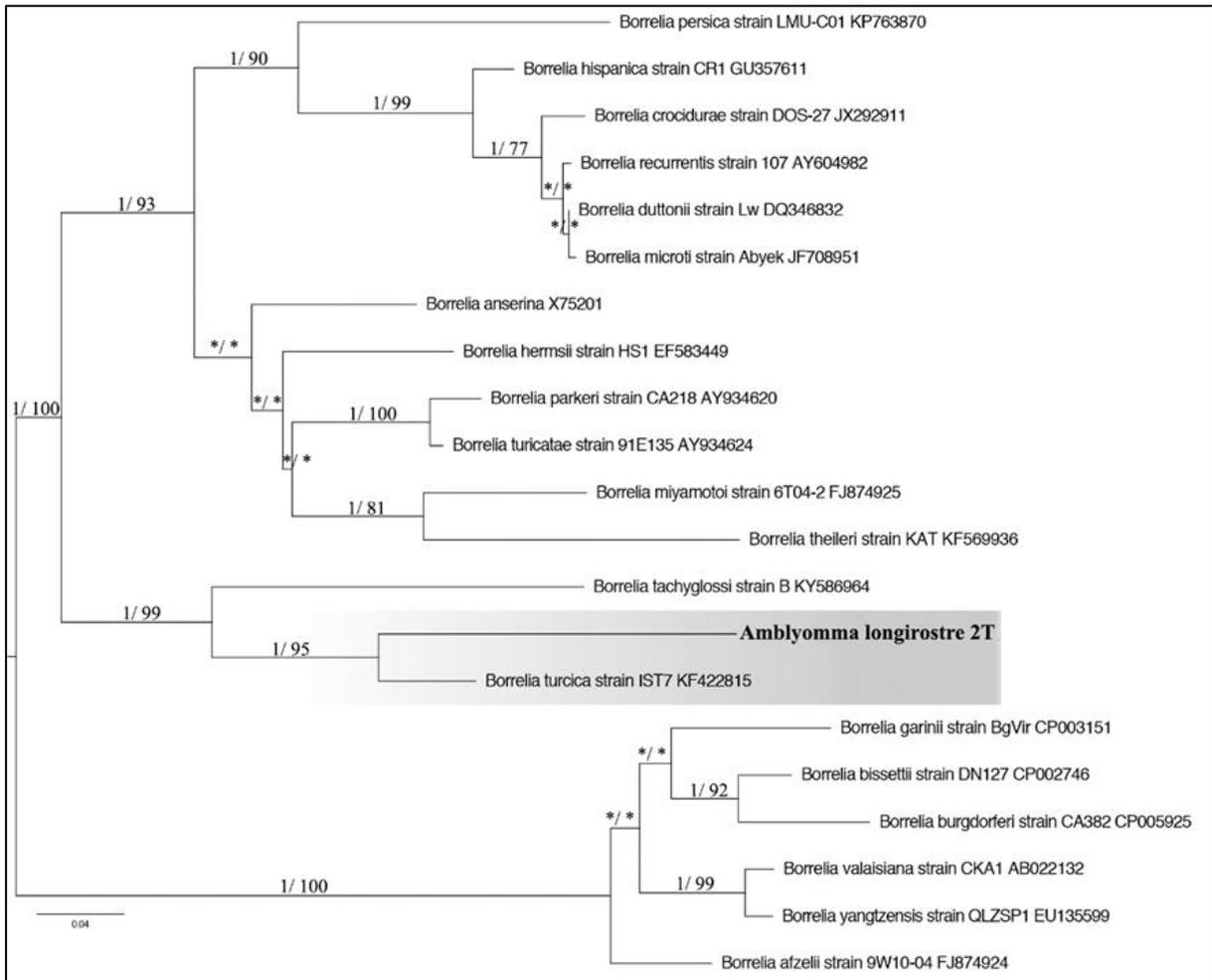
Os produtos sequenciados de uma amostra (*A. longirostre* 2T, acesso genbank: MN064678), apresentaram 100% de identidade com *Rickettsia bellii* isolado H3 (acesso no GenBank: KJ534309), e nas outras duas (*A. longirostre* 11R e 7B, acesso genbank: MN064676 e MN064677 respectivamente), a identidade era de 100% com *Rickettsia* sp. cepa AL e *Rickettsia* sp. cepa Aranha (acesso no GenBank: EU274654 e AY360216, respectivamente) ambas correlacionada atualmente como *Rickettsia amblyommatis* (KARPATHY et al., 2016; OGRZEWSKA et al., 2011), como mostrado na Figura 1, esses agentes já foram descritos no Brasil por Ogrzewalska et al. (2008) e Labruna et al. (2004) no mesmo vetor *A longirostre*, porém, em aves de espécies diferentes.



**Figura 1.** Posição filogenética de *Rickettsia* spp. (*A. longirostre* 2T (*Tangara seledon*), *A. longirostre* 11R (*Turdus leucomelas*), *A. longirostre* 7B (*Saltator similis*)), com base nas sequências nucleotídicas obtidas do gene *gltA*.

Uma amostra de *A. longirostre* coletada em *Tangara seledon* que já havia sido positiva para *Rickettsia bellii* (*Amblyomma longirostre* 2T), também foi positiva utilizando os iniciadores BorFlaF1/BorFlaR1 e BorFlaF2/BorFlaR2 que amplificam 740 pb do gene *flagelina B* de *Borrelia* spp. (acesso genbank: MN064675). Essa amostra apresentou 91% de identidade

com *Borrelia turcica* IST7 (acesso genbank: KF422815) (Figura 2), descrita em *Hyalomma aegyptium* por Wodecka (2013), dados não publicados. A sequência parcial do gene *flaB* também apresentou 99% de similaridade (cobertura de 47% e 41%) com *Borrelia* sp. TX-Amac2 e *Borrelia* sp. F3 (número de acesso KP861337 e KF395231), ambos achados em *A. maculatum* que infestavam seres humanos nos Estados Unidos da América, porém após análise chegou-se à conclusão de que esta *Borrelia* era mais próxima de clados de espiroquetas reptilianas, de que de espiroquetas associadas a doença de Lyme (MITCHELL et al., 2016).



**Figura 2.** Posição filogenética de *Borrelia* spp. (*A. longirostre* 2T, acesso genbank: MN064675), com base nas sequências nucleotídicas obtidas do gene *flaB*.

Os iniciadores que tem como alvos os genes *hpt* e *glpQ* de *Borrelia* spp. não amplificaram produtos como esperado, provavelmente por tratar-se de PCR convencional e a amostra não possuir DNA em concentração suficiente para a amplificação. Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os resultados encontrados por Mitchell et al. (2016) e Lee et al. (2014), e apesar de *A. longirostre* ter sido descrito infestando seres humanos em seus estágios imaturos (GUGLIELMONE et al., 2006), não se pode afirmar que a transmissão possa ocorrer, uma vez que se desconhece a existência de potencial patogênico desta bactéria. Este achado tem grande importância para a literatura, pois relata pela primeira vez a presença de *Borrelia* spp. em *A. longirostre*. Não foi detectado DNA de *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp. e protozoários da ordem Piroplasmida infectando os carrapatos do presente estudo.

#### 4 CONCLUSÃO

Conclui-se que, bactérias dos gêneros *Borrelia* e *Rickettsia*, podem ser encontradas em *A. longirostre* que parasitam aves de duas localidades no estado do Rio de Janeiro.

### 3 CONCLUSÕES GERAIS

De acordo com os resultados obtidos pode-se concluir que:

- Carrapatos em estágio de larva são mais frequentes nos parques visitados e no ParNa de Itatiaia, encontram-se em maior número nos meses de inverno.
- Carrapatos do gênero *Amblyomma* foram os únicos encontrados nos parques.
- Tanto *Rickettsia* spp. quanto *Borrelia* spp. foram encontradas no estudo, e apesar de não pertencerem a espécies notavelmente patogênicas, sua presença indica condições favoráveis do ecossistema para manutenção de patógenos.
- Bactérias do gênero *Borrelia* são descritas pela primeira vez em *A. longirostre*.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, I. S.; MARZAGÃO, G.; YOSHINARI, N. H.; SCHUMAKER, T. T. S. *Borrelia*-like Spirochetes Recovered from Ticks and Small Mammals Collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia County, State of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 621-4, 2000.

ALEIXO, A. L. P.; ALBERNAZ, A. L. K. M.; GRELLE, C. E. V.; VALE, M. M.; RANGEL, T. F. Mudanças climáticas e a biodiversidade dos biomas brasileiros: passado, presente e futuro. **Natureza & Conservação**, 8(2), p.194-196, 2010.

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S.; SILVA, L. J. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in Southeastern Brazil: clinical aspects. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n. 1078, p. 252-254, 2006.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759-843, 1936.

ARZUA, M.; DA SILVA, M. A. N.; FAMADAS, K. M.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. **Experimental & applied acarology**, v. 31, n. 3-4, p. 283-296. 2003.

BARROS-BATTESTI, D.M. Introdução. In: Darci M. Barros-Battesti, Marcia Arzua, Gervásio H. Bechara. (Org.). **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical**. 1 ed. São Paulo: ICTTD - Instituto Butantan. p. 1-4. 2006.

BRASIL, 2012. **Parque Nacional do Itatiaia registra queda de neve**. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), disponível em: [icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/3377-parque-nacional-do-itatiaia-registra-queda-de-neve](http://icmbio.gov.br/portal/ultimas-noticias/20-geral/3377-parque-nacional-do-itatiaia-registra-queda-de-neve)> acesso em: 17/08/2018 às 11:00 horas.

BRASIL, 2017. **Dados de Visitação 2007 – 2016**. Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), disponível em: [icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/noticias/2017/dados\\_de\\_visitacao\\_2012\\_2016.pdf](http://icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/noticias/2017/dados_de_visitacao_2012_2016.pdf)> acesso em: 20/08/2018 às 21:00 horas.

BRASIL, 2018a. **Unidades de Conservação**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), disponível em: [mma.gov.br/areas-protegidas/unidades-de-conservacao](http://mma.gov.br/areas-protegidas/unidades-de-conservacao)> acesso em: 20/08/2018 às 16:00 horas.

BRASIL, 2018b. **Unidades de Conservação: O que são**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), disponível em: [www.mma.gov.br/areas-protegidas/unidades-de-conservacao/o-que-sao](http://www.mma.gov.br/areas-protegidas/unidades-de-conservacao/o-que-sao)> acesso em : 20/08/2018 às 17:46 horas.

BRASIL, 2018c. **Febre maculosa - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Rio de Janeiro**. Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, disponível em: <

<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/febremaculosarj.def>> acesso em: 25/08/2018 às 18:00 horas.

BRASIL, 2019. **Biodiversidade Brasileira**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), disponível em: <[mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira](http://mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira)> acesso em: 16/03/2019 às 12:47 horas.

BRASIL, 2019b. **Dados Georreferenciados**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), disponível em: <[mapas.mma.gov.br/i3geo/datadownload.htm](http://mapas.mma.gov.br/i3geo/datadownload.htm)> acesso em: 16/03/2019 às 14:06 horas.

BRASIL. **Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC**. Ministério do Meio Ambiente (MMA), publicação 240, 16p. 2011.

BUDACHETRI, K.; WILLIAMS, J.; MUKHERJEE, N.; SELLERS, M.; MOORE, F.; KARIM, S. The microbiome of neotropical ticks parasitizing on passerine migratory birds. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 170-173, 2017.

CAPLIGINA, V.; SALMANE, I.; KEIŠS, O.; VILKS, K.; JAPINA, K.; BAUMANIS, V.; RANKA, R. Prevalence of tick-borne pathogens in ticks collected from migratory birds in Latvia. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 1, p. 75-81, 2014.

CBRO – Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. 2014. **Listas das aves do Brasil**. 10 ed. Disponível em<<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 10/11/2017, 13:30 horas.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), 2014. **Tickborne Diseases of the U.S**. Disponível em <[cdc.gov/ticks/diseases/](http://cdc.gov/ticks/diseases/)> Acesso em 07/11/2014 às 13:00 horas.

CHAME, Marcia. Espécies exóticas invasoras que afetam a saúde humana. **Ciência e Cultura**, v. 61, n. 1, p. 30-34, 2009.

COCATE, G.; ABREU, T. C. K.; ROSA, C. A.; PUERTAS, F. H.; FONSECA, A. H.; Passamani, M. Ocupação da espécie exótica *Sus scrofa* e da espécie nativa *Hydrochoerus hydrochaeris* no Parque Nacional do Itatiaia e entorno. **Resumo, Anais do XII Congresso de Ecologia do Brasil**, São Lourenço, Minas Gerais. 2015.

CONFALONIERI, U.E.C; MARINHO, D. P. Mudança climática global e saúde: perspectivas para o Brasil. **Revista Multiciência**, v. 8, p. 48-64, 2007.

CORDEIRO, M. D. **Diagnóstico sorológico de *Rickettsia* spp. e *Borrelia* spp. em cães no município de Seropédica, Estado do Rio de Janeiro**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; LIA, R.P; CAPELLI, G.; OTRANTO, D. Efficiency of flagging and dragging for tick collection. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, n. 1, p. 119-127, 2013.

ELFVING, K.; OLSEN, B.; BERGSTRÖM, S.; WALDENSTRÖM, J.; LUNDKVIST, A.; SJÖSTEDT, A.; NILSSON, K. Dissemination of spotted fever rickettsia agents in Europe by migrating birds. **PLoS One**, v. 5, n. 1, e8572, 2010.

ERWIN, J. A.; FITAK, R. R.; DWYER, J. F.; MORRISON, J. L.; CULVER, M. Molecular detection of bacteria in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in northern crested caracaras (*Caracara cheriway*). **Ticks and tick-borne diseases**, v.7, n. 3, p. 470-474. 2016.

FACCINI; BARROS-BATTESTI, D.M. Aspectos gerais da biologia e identificação de carrapatos. In: Darci M. Barros-Battesti, Marcia Arzua, Gervásio H. Bechara. (Org.). **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical**. 1 ed. São Paulo: ICTTD - Instituto Butantan. p. 5-8. 2006.

FIOL, F. D. S. D.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P. D.; TOLEDO, M. I. D.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, 27, 461-466, 2010.

FONSECA, A.H.; SALLES, R.S.; SALLES, S. A. N., MADUREIRA R C.; YOSHINARI, N. H. Borreliose de Lyme *simile*: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p. 171-8, 2005.

FUXELIUS, H. H.; DARBY, A.; MIN, C. K.; CHO, N. H.; ANDERSSON, S. G. The genomic and metabolic diversity of *Rickettsia*. **Research in Microbiology**, v.158 p.745-753, 2007.

GALO, K.R.; FONSECA A.H.; MADUREIRA R.C.; BARBOSA NETO J.D. Frequência de anticorpos homólogos anti-*Borrelia burgdorferi* em equinos na mesorregião metropolitana de Belém, Estado do Pará. **Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 29, n. 3, p. 229-232. 2009.

GOUY M; GUINDON S; GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**. v. 27, p. 221–224, 2010.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PENÑA, A.; HORAK, I. G. The hard ticks of the world. **Springer, Dordrecht**. doi, v. 10, p. 978-94, 2014.

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

HUBÁLEK, Z. An annotated checklist of pathogenic microorganisms associated with migratory birds. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 40, n. 4, p. 639-659, 2004.

KARPATY, S.E.; SLATER, K.S.; GOLDSMITH, C.S.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in North and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 66, p. 5236-5243, 2016.

KUMAR, S; STECHER, G; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**. v. 33, p. 1870–1874, 2016.

LA SCOLA B.; RAOULT D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current proaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, p. 2715-2727, 1997.

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

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. Rickettsiology and Rickettsial. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Diseases-Fifth International Conference, 2009.

LABRUNA, M. B.; SANFILIPPO, L. F.; DEMETRIO, C.; MENEZES, A. C.; PINTER, A.; GUGLIELMONE, A. A.; SILVEIRA, L. F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 2, p. 147, 2007.

LEE, J. K.; SMITH, W. C.; MCINTOSH, C.; FERRARI, F. G.; MOORE-HENDERSON, B.; VARELA-STOKES, A. Detection of a *Borrelia* species in questing Gulf Coast ticks, *Amblyomma maculatum*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 4, p. 449-452, 2014.

LOSS, S. R.; NODEN, B. H.; HAMER, G. L.; HAMER, S. A. A quantitative synthesis of the role of birds in carrying ticks and tick-borne pathogens in North America. **Oecologia**, v. 182, n. 4, p. 947-959, 2016.

LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H. Parasitismo por carrapatos em anuros no Brasil. Revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v. 20, 100-111. 2013.

MARTINS, T. F.; FECCHIO, A.; LABRUNA, M. B. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) on wild birds in the Brazilian Amazon. **Systematic and Applied Acarology**, v. 19, n. 4, p. 385-392. 2014.

MANGOLD, A. J., BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastrata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, 84(6), 478-484, 1998.

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

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas, comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.

MITCHELL, E. A.; WILLIAMSON, P. C.; BILLINGSLEY, P. M.; SEALS, J. P.; FERGUSON, E. E.; ALLEN, M. S. Frequency and distribution of *Rickettsia*, *Borrelia*, and

*Ehrlichia* detected in human-parasitizing ticks, Texas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 2, p. 312, 2016.

MORSHED, M. G.; SCOTT, J. D.; FERNANDO, K.; BEATI, L.; MAZEROLLE, D. F.; GEDDES, G.; DURDEN, L. A. Migratory songbirds disperse ticks across Canada, and first isolation of the Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi*, from the avian tick, *Ixodes auritulus*. **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 4 p. 780-790. 2005.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA M. B.; CACERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* (Koch, 1844) and *Amblyomma sculptum* (Berlese, 1888) (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 2014.

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

OGRZEWALSKA, M.; PINTER, A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 1-31, 2016.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in an Atlantic Forest area in the State of São Paulo, Brazil, with isolation of *Rickettsia* from the tick *Amblyomma longirostre*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 4, p. 770-774, 2008.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology research**, v. 106, n. 4, p. 809-816, 2010.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology research**, v. 108, n. 3, p. 665-670. 2011.

OLIVER, J.R.; JAMES H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 397-430, 1989.

ONOFRIO, V. C.; VENZAL, J. M.; PINTER, A.; SZABÓ, M. P. J. Familia Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros. In: Darci M. Barros-Battesti, Marcia Arzua, Gervásio H. Bechara. (Org.). **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical**. 1 ed. São Paulo: ICTTD - Instituto Butantan. p. 5-8. 2006.

PACHECO, R.; ROSA, S.; RICHTZENHAIN, L.; SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from southern Brazil. **Revista MVZ Córdoba**, v. 13, n. 2, p. 1273-1279, 2008.

PALOMAR, A. M.; SANTIBÁÑEZ, P.; MAZUELAS, D., RONCERO, L.; SANTIBÁÑEZ, S.; PORTILLO, A.; OTEO, J. A. Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain. **Emerging infectious diseases**, v. 18, n. 7, p. 1188. 2012.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, n. 41, n. 3, p. 324-332, 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 523-529, 2006.

REIS, M. L.; CAMPOS, B. C. **Revisão do Plano de Manejo do Parque Nacional do Itatiaia: Relatório de Mastofauna**. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), 2011.

RIBEIRO, K. T.; DA SILVA ROCHA, G. F.; SARAIVA, D. G.; DA SILVA, A. P.; DA ROCHA VILELA, D. A.; LIMA, P. C. S.; BRAGA, I. Das capivaras e carrapatos a uma proposta de comunicação e manejo no parque nacional da Serra do Cipó para redução de riscos à saúde. **Oecologia Australis**, 14(3): 668-685, 2010.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D.L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J.P.; MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, p. 539–542, 2012.

RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. Unidades de conservação brasileiras. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 27-35, 2005

SAMPAIO, A.; SCHMIDT, I. B. Espécies exóticas invasoras em unidades de conservação federais do Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 2, p. 32-49, 2014.

SANCHES, G. S.; MARTINS, T. F.; LOPES, I. T.; COSTA, L. F. D. S.; NUNES, P. H.; CAMARGO-MATHIAS, M. I.; LABRUNA, M. B. Ticks infesting birds in Atlantic Forest fragments in Rio Claro, State of Sao Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 6-12., 2013.

SANTOLIN, Í. D. A. C.; FAMADAS, K. M.; MCINTOSH, D. Detection and identification of *Rickettsia* agents in ticks collected from wild birds in Brazil by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. Supl. 2, p. 68-73, 2013.

SANTOLIN, Í. D. A. C.; LUZ, H. R.; ALCHORNE, N. M.; PINHEIRO, M. D. C.; MELINSKI, R. D.; FACCINI, J. L. H.; FAMADAS, K. M. Ticks on birds caught on the campus of the Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 213-218. 2012.

SCOFIELD, A.; BAHIA, M.; MARTINS, A. L.; GÓES-CAVALCANTE, G.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B. *Amblyomma dissimile* Koch (Acari: Ixodidae) attacking *Primolius*

*maracana* Vieillot (Psittaciformes: Psittacidae) in the Amazon region, state of Pará, Brazil. **Neotropical entomology**, v. 40, n. 4, p. 509-511. 2011.

SCOTT, J. D., LEE, M. K., FERNANDO, K., DURDEN, L. A., JORGENSEN, D. R., MAK, S., MORSHED, M. G. Detection of Lyme disease spirochete, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, including three novel genotypes in ticks (Acari: Ixodidae) collected from songbirds (Passeriformes) across Canada. **Journal of Vector Ecology**, v. 35, n. 1, p. 124-139. 2010.

SIGRIST, T. **Avifauna brasileira: guia de campo Avis Brasilis**. Avis Brasilis Editora, 2013.

SILVEIRA, A. K.; FONSECA, A. H. Distribuição, diversidade e sazonalidade de carrapatos em ambientes institucionais com diferentes graus de intervenção humana no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. Supl. 2, p. 1-12, 2013.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-9, 2013.

SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B.; CASTAGNOLLI, K.C.; GARCIA, M.V.; PINTER, A.; VERONEZ, V.A.; MAGALHÃES, G.M.; CASTRO, M.B.; VOGLIOTTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 4, p. 339-346, 2006.

SZEREMETA, B.; ZANNIN, P. H. T. A importância dos parques urbanos e áreas verdes na promoção da qualidade de vida em cidades. **Raega - O Espaço Geográfico em Análise**, 29, 177-193, 2013.

VENZAL, J. M. ONOFRIO, V. C; BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M. Família Argasidae: características gerais, comentários e chave para gêneros e espécies. In: Darci M. Barros-Battesti, Marcia Arzua, Gervásio H. Bechara. (Org.). **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical**. 1 ed. São Paulo: ICTTD - Instituto Butantan. p. 5-8. 2006.

YOSHINARI, N.H. Uma longa jornada para entender a *Borrelia burgdorferi* no Brasil. **Revista Brasileira de Reumatologia**. Editorial, v. 49, n 5, p. 483-486, 2009.

YOSHINARI N.H.; MANTOVANI E.; BONOLDI V.L.N.; MARANGONI R.G.; GAUDITANO G. Doença de Lyme-símile brasileira ou síndrome Baggio-Yoshinari: zoonose exótica e emergente transmitida por carrapatos. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 3, p. 363-9, 2010.

## APÊNDICE A

**Tabela 1.** Detalhamento dos locais e pontos de coleta no ParNa de Itatiaia no Rio de Janeiro

Local	Ponto	Coordenadas*		Altitude (m)
		Sul	Oeste	
<b>ParNa de Itatiaia</b>	1	-22.394199	-44.657110	2.198
	2	-22.392567	-44.666435	2.295
	3	-22.387552	-44.675360	2.316
	4	-22.385030	-44.669430	2.397
	5	-22.376083	-44.667058	2.517
	6	-22.362080	-44.665900	2.379
	7	-22.367933	-44.673952	2.405
	8	-22.384790	-44.678470	2.365
	9	-22.377803	-44.674219	2.539
	10	-22.366500	-44.647220	2.286
	11	-22.372980	-44.646200	2.333
	12	-22.377839	-44.693388	2.423
	13	-22.301672	-44.698572	1.396
	14	-22.305074	-44.702403	1.413
	15	-22.321560	-44.697820	1.496
	16	-22.330861	-44.705003	1.647
	17	-22.352472	-44.682734	1.987
	18	-22.351386	-44.677816	1.996
	19	-22.349035	-44.693924	1.893
	20	-22.375363	-44.699244	2.449
	21	-22.366444	-44.694424	2.494
	22	-22.373635	-44.689266	2.485

\*Coordenadas expressas em Graus (Datum 23K); m: metros; ParNa: parque nacional.

## APÊNDICE B

**Tabela 2.** Detalhamento dos locais e pontos de coleta na APA do Alto Taboão em Minas Gerais.

Local	Ponto	Coordenadas*		Altitude (m)
		Sul	Oeste	
APA do Alto Taboão	1	-20.31328	-42.03392	1.344
	2	-20.31187	-42.03246	1.469
	3	-20.30360	-42.02539	1.248
	4	-20.30120	-42.02569	1.411

\*Coordenadas expressas em Graus (23K); m: metros; APA: área de proteção ambiental.

## APÊNDICE C

**Tabela 3.** Detalhamento dos locais e pontos de coleta no estado do Espírito Santo. (continua)

Local	Ponto	Coordenadas*		Altitude (m)
		Sul	Oeste	
<b>MoNa dos Picos dos Pontões</b>	1	-20.57213	-41.33189	784
	2	-20.56202	-41.33246	1.246
	3	-20.56232	-41.33213	1.177
	4	-20.56316	-41.33305	1.058
<b>PE Cachoeira da Fumaça</b>	1	-20.37478	-41.35523	428
	2	-20.37263	-41.36255	587
	3	-20.37211	-41.36352	642
	4	-20.37204	-41.36434	648
	5	-20.37369	-41.36218	633
	6	-20.37305	-41.36245	642
<b>PE Paulo César Vinha</b>	1	-20.36322	-40.24538	18
	2	-20.36230	-40.25163	15
	3	-20.36494	-40.25066	9
	4	-20.36356	-40.25193	15
	5	-20.33255	-40.24043	11
<b>APA de Setiba</b>	1	-20.34310	-40.25347	-7
	2	-20.34326	-40.25238	7
	3	-20.36004	-40.25407	6
	4	NM	NM	NM
<b>ReBio Duas Bocas</b>	1	-20.35565	-40.25405	2
	2	-20.16230	-40.28445	184
	3	-20.16299	-40.28527	188
	4	-20.16221	-40.29030	193
	5	-20.16049	-40.29061	211
<b>PE Pedra Azul</b>	1	NM	NM	NM
	2	-20.23535	-41.01147	1.260
	3	-20.24025	-41.01080	1.434
	4	-20.26120	-40.59562	1.322
	5	-20.26204	-41.00051	1.269
<b>PE do Forno Grande</b>	1	-20.23370	-41.01290	1.180
	2	-20.30402	-41.04551	1.136
	3	-20.31019	-41.05228	1.351
	4	-20.31089	-41.05120	1.177
	5	-20.30594	-41.05067	1.160
	6	-20.32233	-41.06518	1.201

\*Coordenadas expressas em Graus (24s); m: metros; ParNa - Parque nacional; PE - Parque estadual; ReBio - Reserva biológica; EB - Estação biológica; APA - área de proteção ambiental; MoNa - monumento natural; NM: Não marcado.

Tabela 3. continuação

Local	Ponto	Coordenadas*		Altitude (m)
		Sul	Oeste	
PE Mata das Flores	1	-20.61215	-41.17042	96
	2	-20.61949	-41.16481	97
	3	-20.62421	-41.16972	104
	4	-20.61081	-41.16713	159
	5	-20.61942	-41.17652	99
PE de Itaúnas	1	-18.22517	-39.46538	2
	2	-18.24106	-39.43435	2
	3	NM	NM	NM
	4	-18.24449	-39.42459	NM
	5	-18.25105	-39.43395	7
	6	-18.26026	-39.42404	8
ReBio Augusto Ruschi	1	-19.54403	-40.33227	NM
	2	-19.55156	-40.33123	677
	3	-19.54573	-40.33134	685
	4	-19.54216	-40.33129	719
	5	-19.53386	-40.32365	757
EB Santa Lúcia	1	-19.58258	-40.31448	NM
	2	-19.58258	-40.31448	653
	3	-19.58162	-40.31500	644
	4	-19.58264	-40.32114	668
ReBio de Sooretama	1	-19.02086	40.09306	65
	2	-18.57574	-40.07378	13
	3	-18.58146	-40.06481	14
	4	-18.59164	-40.02109	14
	5	-18.59432	-40.00105	5
	6	-19.00353	-39.59101	24
	7	-19.02271	-39.57506	20
MoNa dos Pontões Capixabas	1	-19.14158	-40.47410	90
	2	-19.14118	-40.47515	106
	3	-19.14090	-40.43060	105
	4	-19.14216	-40.43362	93
MoNa da Pedra da Fortaleza	1	-18.45399	-40.42159	970
	2	-18.45587	-40.42184	810
	3	-18.46013	-40.42258	713
	4	-18.46073	-40.42410	454

\*Coordenadas expressas em Graus (24s); m: metros; ParNa - Parque nacional; PE - Parque estadual; ReBio - Reserva biológica; EB - Estação biológica; APA - área de proteção ambiental; MoNa - monumento natural; NM: Não marcado.

**Tabela 3.** continuação

Local	Ponto	Coordenadas*		Altitude (m)
		Sul	Oeste	
ParNa do Caparaó	1	-20.24243	-41.50136	1.847
	2	-20.24243	-41.50206	1.888
	3	-20.24371	-41.50039	1.960
	4	-20.24501	-41.49326	2.102
	5	-20.25143	-41.48393	2.367
	6	-20.25064	-41.50356	NM
	7	-20.25110	-41.50434	NM
	8	-20.25430	-41.48089	2.624
	9	-20.24358	-41.50120	NM
	10	-20.30125	-41.49099	1.370
	11	-20.28529	-41.49438	1.871
	12	-20.28212	-41.49397	1.951
	13	-20.27273	-41.48301	2.201
	14	-20.28090	-41.44211	1.121
	15	-20.28030	-41.44008	1.093
	16	-20.28059	-41.43553	1.121
	17	-20.34573	-41.45359	NM

\*Coordenadas expressas em Graus (24s); m: metros; ParNa - Parque nacional; PE - Parque estadual; ReBio - Reserva biológica; EB - Estação biológica; APA - área de proteção ambiental; MoNa - monumento natural; NM: Não marcado.

## ANEXO A

- Autorização emitida pelo Sisbio para a realização do trabalho referente ao capítulo I.



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: 45198-2	Data da Emissão: 01/07/2015 18:02	Data para Revalidação*: 30/07/2016
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, 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.		

<b>Dados do titular</b>	
Nome: ADEVAIR HENRIQUE DA FONSECA	CPF: 453.792.977-49
Título do Projeto: Ocorrência de carrapatos e helmintos em capivara ( <i>Hydrochoerus hydrochaeris</i> Linnaeus, 1766) e em javali ( <i>Sus scrofa scrofa</i> Linnaeus, 1758) em Unidades de Conservação e entorno	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Cronograma de atividades			
#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	registro de ocorrência de capivaras e javali, coleta de carrapatos e fezes.	08/2014	08/2016

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, sendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passado, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exige 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, possessor 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 ICMBio nº 03/2014 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 <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (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 da 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, 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, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/icgen">www.mma.gov.br/icgen</a> .
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	O AGENDAMENTO de visitas ao Parque Nacional do Caparaó (PNC) deverá ser realizado com ANTECEDÊNCIA MÍNIMA DE 09 dias úteis.
1	Publicações, relatórios, ou similares, oriundos das visitas deverão ser remetidos para o PNC, inclusive em meio digital sempre que possível, bem como solicita-se a disponibilização de imagens porventura registradas no PNC a fim de serem utilizadas em atividades do Parque, garantindo-se a indicação da autoria na veiculação.
2	1- Observar o previsto na Cartilha do Pesquisador do PARNASO; 2- Avaliar possíveis locais de coleta em conjunto com o Setor de Pesquisa.
3	As campanhas de campo devem ser agendadas previamente com o gestor da unidade.
	A entrada em áreas particulares dependem da aquiescência do proprietário.

Equipe					
#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Advaldo Henrique da Fonseca	pesquisador	475.018.557-49	3182633 IFF-RJ	Brasileira
2	CLARISSA ALVES DA ROSA	pesquisadora	005.119.570-41	3079684548 SJS-RS	Brasileira
3	Isabela Vihena freire Martins	pesquisadora	089.394.547-80	104105762 IFF-RJ	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 23445119



Página 1/4

## ANEXO B

- Autorização emitida pelo Sisbio para a realização do trabalho referente ao capítulo II.



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

<b>Número:</b> 43917-4	<b>Data da Emissão:</b> 19/04/2017 14:10	<b>Data para Revalidação*:</b> 19/05/2018
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, 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: Hermes Ribeiro Luz	CPF: 088.990.417-09
Título do Projeto: Diversidade, relação parasito-hospedeiro e infecção por <i>Rickettsia rickettsii</i> , agente do Complexo Febre Maculosa Brasileira, em carrapatos associados com aves silvestres no estado do Rio de Janeiro.	
Nome da Instituição: REITORIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO	CNPJ: 63.025.530/0001-04

#### Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Capturas de Aves e coletas de ectoparasitas	04/2014	04/2018

#### 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 a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime 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, possessor 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 ICMBio nº 03/2014 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 <a href="http://www.ibama.gov.br">www.ibama.gov.br</a> (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	Este documento NÃO exime o pesquisador titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
6	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.
7	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, nos termos da legislação brasileira em vigor.
8	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, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .
9	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	Esta autorização não exime seu titular da necessidade de atender ao disposto na Instrução Normativa Ibama nº 27/2002, que regulamenta o Sistema Nacional de Anilhamento de Aves Silvestres.
---	---

#### Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	FLÁVIA GUIMARAES CHAVES	Pesquisadora/Aves	110.822.717-13	127167039 DETRAN-RJ	Brasileira
2	Bruna Barboza Bezerra	Auxiliar	360.534.358-99	459600498 ssp-SP	Brasileira
3	STANLEY NOBRE LIMA	Pesquisador	101.342.227-62	1.859.486 SSP-ES	Brasileira
4	HELIO FREITAS SANTOS	Pesquisador	530.741.657-15	4026906 IFF-RJ	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 26614273**



Página 1/4