

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

TESE

**Inovação Frugal Aplicada ao Desenvolvimento de
Recursos Moleculares para o Estudo Bioecológico de
Carrapatos Ixodídeos e Bactérias *Rickettsia* spp.
Associadas em Território Brasileiro**

Daniel Paiva Barros de Abreu

2019



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

**INOVAÇÃO FRUGAL APLICADA AO DESENVOLVIMENTO DE
RECURSOS MOLECULARES PARA O ESTUDO BIOECOLÓGICO DE
CARRAPATOS IXODÍDEOS E BACTÉRIAS *Rickettsia* spp.
ASSOCIADAS EM TERRITÓRIO BRASILEIRO**

DANIEL PAIVA BARROS DE ABREU

Sob a Orientação do Professor
Douglas McIntosh

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

Seropédica, RJ
Novembro 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)

A162i Abreu, Daniel Paiva Barros de, 1989-
Inovação frugal aplicada ao desenvolvimento de recursos moleculares para o estudo bioecológico de carrapatos ixodídeos e bactérias Rickettsia spp. associadas em território brasileiro / Daniel Paiva Barros de Abreu. - Seropédica, 2019.
162 f.: il.

Orientador: Douglas McIntosh. Tese(Doutorado). - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2019.

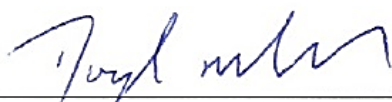
1. Carrapato. 2. Amblyomma. 3. Rickettsia. 4. PCR RFLP. 5. website. I. McIntosh, Douglas, 1964-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias III. Título.

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

DANIEL PAIVA BARROS DE ABREU

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

TESE APROVADA EM 21/ 11/ 2019



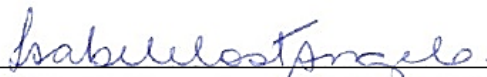
Douglas McIntosh, Ph.D. - UFRRJ
(Orientador)



Gilberto Sales Gazêta, DSc. – FIOCRUZ



Huarrisson Azevedo Santos, DSc. – UFRRJ



Isabele da Costa Angelo, DSc. – UFRRJ



Maria Halina Ogrzewalska, DSc. – FIOCRUZ

AGRADECIMENTOS

À minha mãe **Julia Paiva**, meu pai **Claudio de Abreu** (*in memoriam*), meu irmão **Pedro Paiva**, meus avós **Guilhermina dos Santos**, **Altina Gonçalves** (*in memoriam*) e **Claudio Gonçalves** (*in memoriam*) e a toda minha família, sem os quais esta etapa não seria possível.

Ao **Colégio Pedro II** e a **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro** e ao Brasil pelos dezoito anos de ensino público de qualidade e possibilidade de desenvolvimento pessoal e profissional. Obrigado também a todos os professores que direta ou indiretamente auxiliaram na minha formação no decorrer destes anos, destacando minha gratidão ao **Prof. Francisco de Assis Baroni** por sua contínua disponibilidade e auxílio.

Às amigas construídas durante todo o período e que foram mantidas mesmo com o inevitável distanciamento físico. Em especial a **Jorge Gabriel Cerqueira** e **José Philippe Matieli** que me acompanham desde o primeiro dia da graduação.

À **Keila Cristina**, **Maristela Peckle**, **Tassia Furtado**, **Tatiana Werneck** e **Vanessa Amaral** pela amizade e companhia durante os horários de almoço e intervalos. O convívio diário com vocês tornou o processo de doutorado muito mais agradável.

À **Lucas Aguiar** pelo auxílio na confecção do website apresentado no capítulo IV do presente documento.

À **Aguida Oliveira**, **Camila Oliveira**, **Cássia Motta**, **Claudia Bezerra**, **Irene Coelho**, **Maria Ogrzewalska**, **Mário Makita**, **Marisol Alvim**, **Maristela Peckle** e **Tassia Furtado** pelo tempo dispendido na etapa de validação e aprimoramento da ferramenta de busca do website desenvolvido.

À **Hermes Luz**, **Ísis Santolin**, **João Faccini**, **Mariana Oliveira**, **Ralph Maturano**, **Stanley Nobre**, **Tatiana Senra**, **Viviane Zeringóta**, **Walter Flausino** e todos os demais que auxiliaram na execução de levantamentos ecológicos nos anos anteriores e obtiveram a amostragem utilizada para etapas fundamentais do presente documento.

Aos membros da banca avaliadora **Gilberto Gazêta**, **Huarrison Santos**, **Isabele Angelo** e **Maria Ogrzewalska** pelo tempo dedicado ao aprimoramento do presente documento.

Ao **Prof. Douglas McIntosh** por demonstrar a relevância da pressão seletiva como condição indispensável para ocorrência de todo e qualquer processo evolutivo. Sua dedicação à pesquisa científica, critério para obtenção de resultados fidedignos e raciocínio crítico certamente servirão de exemplo para guiar meus passos no futuro.

Considerando o ininterrupto e infinito processo científico, agradeço a todos que me antecederam e produziram os conhecimentos necessários para a execução do presente trabalho.

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

Adicionalmente, gostaria de agradecer ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** pela bolsa de estudos recebida no decorrer de todo o desenvolvimento do projeto.

RESUMO GERAL

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Inovação Frugal Aplicada ao Desenvolvimento de Recursos Moleculares para o Estudo Bioecológico de Carrapatos Ixodídeos e Bactérias *Rickettsia* spp. Associadas em Território Brasileiro**. 2019. 162p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Os estudos acerca da ecologia de carrapatos tradicionalmente enfocaram nos agravos a saúde humana e de animais de companhia e produção, objetivando o desenvolvimento de medidas de prevenção e controle para enfermidades associadas. Recentemente, contudo, houve uma ampliação na aplicabilidade de tais estudos, buscando contextualizar estes ectoparasitas com demais componentes do ecossistema de forma mais abrangente. O parasitismo de animais selvagens e o potencial indicador para fatores bióticos e abióticos associados a emergência e reemergência de enfermidades infecciosas, estão entre as considerações em destaque atualmente. As metodologias empregadas para tais estudos foram também modificadas, ressaltando o acréscimo de ferramentas moleculares às análises morfológicas classicamente empregadas. Em nosso país, os conhecimentos associados a carrapatos e enfermidades por eles transmitidas foram consideravelmente ampliados nas últimas duas décadas, em grande parte devido a utilização de abordagens moleculares. Contudo, o atual período de austeridade na ciência brasileira resultou na estagnação de diversas áreas de pesquisa e desenvolvimento tecnológico em nível nacional, incluindo a ixodologia. Neste contexto, a inovação frugal, onde soluções para a escassez de recursos financeiros, tecnológicos e materiais são desenvolvidas, resultando em alternativas satisfatórias e menos onerosas, pode ser a resposta para enfrentar tais entraves. Assim, o projeto de pesquisa apresentado na presente tese objetivou o desenvolvimento, avaliação, validação e promoção de abordagens moleculares economicamente acessíveis, baseada em inovação frugal. Pretende-se, desta forma, possibilitar a continuidade e expansão de investigações bioecológicas de carrapatos e enfermidades transmitidas por carrapatos no Brasil. O principal resultado de tais esforços consistiu no estabelecimento de ferramentas moleculares altamente eficientes e de custo reduzido para a identificação em nível de espécie de carrapatos ixodídeos e bactérias do gênero *Rickettsia* associadas. Estas técnicas foram baseadas em dois métodos moleculares amplamente explorados – a reação em cadeia da polimerase (PCR) e o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) – representando uma alternativa robusta, reprodutível e altamente acessível para a identificação baseada no sequenciamento de nucleotídeos. O novo método pode ser aplicado para áreas chave de pesquisas em bioecologia, incluindo a distribuição de populações, determinação de hospedeiros acometidos e associações com potenciais patógenos, competência vetorial e determinação da influência da microbiota sobre a fisiologia e comportamento do ectoparasito. A fim de disseminar e promover a adoção destes recursos, uma plataforma on-line foi desenvolvida e será registrada sob a marca “TickCutter”. Com a disponibilização desta ferramenta, prevê-se melhor comunicação dentre os diferentes grupos atuantes em ixodologia e riquetsiologia no Brasil e países da América do Sul. Detalhes acerca do desenvolvimento e avaliação dos protocolos de identificação molecular são reportados no presente documento. Pretende-se, a partir da adoção das novas metodologias por outros grupos de pesquisa, estimular a expansão no estudo da bioecologia de ixodídeos no Brasil e assim, promover contribuições significativas para nossa compreensão nesta importante área de estudo.

Palavras-chave: Carrapato, *Amblyomma*, *Rickettsia*, PCR-RFLP, website

GENERAL ABSTRACT

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Frugal Innovation Applied on the Development of Molecular Tools for the Bioecological Study of Ixodid Ticks and Associated *Rickettsia* spp. Bacteria in Brazilian Territory.** 2019. 162p. Thesis (Doctorate in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The Studies on the ecology of ticks were traditionally conducted to generate information on health risks to humans and companion/production animals, with the principal objective of developing preventative and controlling measures. Recently, however, there has been an extension on the applicability of these ecological studies, with the contextualization of these ectoparasites with other ecosystem components. The role of ticks as parasites for wild animals and their potential to indicate biotic and abiotic drivers for the emergence and re-emergence of infectious diseases, are among the current considerations. The methodologies used for such studies were also modified, emphasizing the addition of molecular biology-based identifications of ticks and their associated microbes to the classical morphological characterization. In Brazil, the knowledge about ticks and tick-borne diseases was considerably expanded in the last two decades, primarily because of the molecular approaches applied. However, the budget cuts on scientific research currently existing in Brazil resulted in the stagnation of many areas of national research and technological development, including ixodology. In this context, “frugal innovation”, meaning a resource-scarce solution that is designed and implemented despite financial, technological, material or other resources constrains, could be the answer to overcome the barriers. Thus, the research presented in this thesis was elaborated with the objectives of developing, evaluating, validating and promoting the application of economically accessible molecular resources, based on frugal innovation. In this way, we aim to permit the continuation and expansion of bioecological investigations of Brazilian ticks and tick-borne pathogens. The principal outcome of this effort was the establishment of highly efficient and cost-effective molecular approaches for the species-level identification of ticks and bacteria of the genus *Rickettsia* associated with them. These techniques were based on two widely employed molecular methods, the polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism analysis (RFLP), representing a robust, reproducible and highly accessible alternative to nucleotide sequencing-based species-level identification. The novel methods can be applied to key areas of bioecological research, including the distribution of ticks population, determination of host range, detection of associations with potential pathogens, vector competence, and determination of the influence of the microbiota upon tick physiology and behavior. In order to disseminate and promote the adoption of these resources, an internet-based platform was designed and will be registered under the trademark of “TickCutter”. The existence of this web-based tool is predicted to result in increased communication between the different stakeholders involved in tick research within Brazil and neighboring countries in South America. Details of the development and evaluation of the systems are reported herein. It is envisioned that the adoption of this technology by other research groups will stimulate an expansion in the study of the bioecology of hard ticks in Brazil, and as such will make significant contributions to our comprehension of this important area of scientific study.

Keywords: Tick, *Amblyomma*, *Rickettsia*, PCR-RFLP, website

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

Tabela 1. Tamanhos de fragmentos previstos após restrição enzimática de produto de PCR do gene 16S rDNA de carrapatos ixodídeos reportados em território nacional p. 40

CAPÍTULO II

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores empregados para alinhamento em *in silico* com alvo nos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB* p. 58

Tabela 2. Composição dos “Master-mixes” e condições de termociclagem empregadas para amplificação dos genes *htrA*, *ompA* e *ompB* p. 60

Tabela 3. Tamanho de fragmentos de PCR-RFLP previstos para *Rickettsia* spp. associadas a carrapatos após restrição enzimática frente as regiões gênicas *htrA* (548 pb), *ompA* (357 pb) e *ompB* (857 pb) p. 63

CAPÍTULO III

Tabela 1. Amostras de carrapatos sabidamente positivas para *Rickettsia* grupo febre maculosa e selecionadas para a presente avaliação p. 75

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos diferentes genes para síntese de antígenos de superfície celular (*sca*) desenvolvidos no presente estudo p. 75

Tabela 3. Análise semi-quantitativa de carga bacteriana relativa (*Rickettsia bellii* e *Rickettsia* SFG) baseada na amplificação de PCR *sca9* e *ompA* empregando diluições seriadas de DNA extraído de carrapatos coinfectados p. 81

CAPÍTULO IV

Tabela 1. Informações encaminhadas para voluntários no decorrer da segunda etapa de validação da ferramenta de busca, com a adição do gabarito p. 91

Tabela 2. Informações encaminhadas para voluntários no decorrer da terceira etapa de validação da ferramenta de busca, com a adição do gabarito p. 92

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Estudos prévios avaliando relação pássaros-carrapatos, evidenciando o percentual de amostras coletadas e identificadas em nível de espécie p. 9

CAPÍTULO I

Quadro 1. Espécies de carrapato ixodídeos previamente reportadas em território brasileiro e consideradas no presente estudo p. 35

CAPÍTULO II

Quadro 1. Espécies de *Rickettsia* previamente associadas a carrapatos e descritas no Brasil e em países da América Latina p. 57

Quadro 2. Números de acesso das sequências empregadas para avaliação *in silico* inicial e determinação dos perfis de digestão resultantes para cada espécie de *Rickettsia* p. 59

CAPÍTULO IV

Quadro 1. Representação esquemática das faixas de interpretação de bandas inseridas no banco de dados empregado na ferramenta de busca p. 91

Quadro 2. Perguntas contidas nos questionários realizados com voluntários para avaliação da plataforma on-line desenvolvida p. 94

Quadro 3. Representação esquemática das faixas de interpretação de bandas inseridas no banco de dados empregado na ferramenta de busca, após otimização p. 96

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO I

Figura 1. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de espécies do gênero *Amblyomma* previamente reportadas em aves em território nacional. Linhas: 01 – *Amblyomma aureolatum*; 02 – *A. auricularium*; 03 – *A. brasiliense*; 04 – *A. calcaratum*; 05 – *A. coelebs*; 06 – *A. geayi*; 07 – *A. humerale*; 08 – *A. longirostre*; 09 – *A. naponense*; 10 – *A. romarioi*; 11 – *A. nodosum*; 12 – *A. parkeri*; 13 – *A. parvum*; 14 – *A. triste*; 15 – *A. varium*. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M). A = Amplicon não clivado.

p. 43

Figura 2. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de espécies do gênero *Amblyomma* e demais gêneros de ixodídeos reportados em território nacional. Linhas: 16 – *Amblyomma dubitatum*; 17 – *A. oblongoguttatum*; 18 – *A. romitii*; 19 – *A. tigrinum*; 20 – *Dermacentor nitens*; 21 – *Haemaphysalis leporispalustris*; 22 – *Ixodes* spp. oriundo de ave; 23 – *Rhipicephalus microplus*; 24 – *Rhipicephalus sanguineus*. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M). A = Amplicon não clivado.

p. 44

Figura 3. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de componentes do complexo *Amblyomma cajennense* reportados em território nacional. Linhas: A – Amplicon não clivado; 25 – *Amblyomma cajennense sensu stricto*; 26 – *A. sculptum* (L52); 27 – *A. sculptum* (Colônia); 28 – *A. sculptum* (L80). Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

p. 44

Figura 4. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI*, *DraI* e *XbaI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de exemplares caracterizados como *Amblyomma ovale*. Linhas: A – Amplicon não clivado; 29 – *A. ovale* (L185); 30 – *A. ovale* (L215); 31 – *A. ovale* (L218). Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

p. 45

Figura 5. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de exemplares coletados de aves. Identificação de *Amblyomma longirostre* (linhas 01, 03, 10 e 17), *A. romarioi* (linhas 02, 07, 08, 12, 18 e 21), *A. ovale* (linha 04), *A. varium* (linha 05), *A. calcaratum* (linhas 06 e 09), *A. nodosum* (linha 11), *A. parkeri* (linhas 13 e 20), *A. aureolatum* (linha 14), *A. naponense* (linha 15), *A. sculptum* (linha 16) e *A. brasiliense* (linha 19). Linhas: A – Amplicon não clivado de fragmento 16S rRNA; B – *A. brasiliense*; L – *A. longirostre*; N – *A. romarioi*. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

p. 46

CAPÍTULO II

Figura 1. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *PstI* e *RsaI* em fragmento de *ompA* (OmpAdogF/OmpAdogR – 360 pb). Linhas: 01 – *Rickettsia amblyommatis*; 02 – ‘*Candidatus Rickettsia andeanae*’; 03 – ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’; 04 – *R. monteiroi*; 05 – *R. parkeri* (ARF); 06 – *R. rhipicephali*; 07 – *Rickettsia rickettsii*. Eletroforese executada em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) revelado em brometo de etídio. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

p. 64

Figura 2. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *AluI*, *MspI* e *RsaI* em fragmento de *ompB* (120-M59/120-807 – 857 pb). Linhas: 01 – *Rickettsia amblyommatis*; 02 – ‘*Candidatus Rickettsia andeanae*’; 03 – *R. felis*; 04 – *R. parkeri* (ARF); 05 – *R. rhipicephali*; 06 – *R. rickettsia*; 07 – *Rickettsia* sp. strain OF; A – Amplicon não clivado. Eletroforese executada em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) revelado em brometo de etídio. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M1) e Marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia) (M2).

p. 64

CAPÍTULO III

Figura 1. Amplificação de PCR obtidos para *htrA* (17KDF/17KDR – 407 pb), *sca3* (BSCA_3F/BSCA_3R – 654 pb), *sca8* (BSCA_8F/BSCA_8R – 723 pb), *sca9* (BSCA_9F/BSCA_9R – 728 pb) e *sca14* (BSCA_14F/BSCA_14R – 724 pb). Linhas: *Rickettsia bellii* 10⁻³-10⁻⁶; CN – Controle negativo. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em Marcador 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (M). Eletroforese executada em gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x).

p. 78

Figura 2. Amplificação de PCR obtidos para *sca9* (BSCA_9F/BSCA_9R – 728 pb) e *sca14* (BSCA_14F/BSCA_14R – 724 pb). Linhas: 01-07 - DNA total de exemplares de *Amblyomma rotundatum* sabidamente positivas para *Rickettsia bellii* (LUZ et al., 2018c); 08 - *Rickettsia bellii* (cepa Mogi); 09 - controle negativo. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M). Eletroforese executada em gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x).

p. 78

Figura 3A. Eletroforese em gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) de amplificação por PCR de fragmento do gene *sca9* (BSCA_9F/BSCA_9R – 728 pb) em DNA total de carrapatos sabidamente positivos para *Rickettsia* grupo febre maculosa (SFG). Linhas: 01 - 3133.19; 02 - 3122.16; 03 - 3160.1; 04 - 3130.8; 05 - L36; 06 - V22A; 07 - V5D; 08 - V7C; 09 - V7D; 10 - 3130.18; 11 - 35NAZ; 12 - 13bNAZ; 13 - *Rickettsia bellii* (cepa Mogi); 14 - Controle negativo. **3B.** Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) de padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonuclease de restrição *AluI* em fragmento do gene *sca9* obtido. Linhas: A – Amplicon não clivado; 01-13 – Amostras identificadas na figura 4A. Revelação de géis em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em Marcador 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

p. 80

Figura 4A. Eletroforese em gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) de amplificação por PCR de fragmento do gene *ompA* (OmpAdogF/OmpAdogR – 357 pb) em DNA total de carrapatos sabidamente positivos para *Rickettsia* grupo febre maculosa (SFG). Linhas: 01 - 3133.19; 02 - 3122.16; 03 - 3160.1; 04 - 3130.8; 05 - L36; 06 - V22A; 07 - V5D; 08 - V7C; 09 - V7D; 10 - 3130.18; 11 - 35NAZ; 12 - 13bNAZ; 13 - *Rickettsia monteiroi* (cepa 7P) 10^{-1} ; 14 - *R. monteiroi* (cepa 7P) 10^{-2} ; 15 – Controle negativo **4B.** Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) de padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonuclease de restrição *PstI* em fragmento do gene *ompA* obtido. Linhas: 1-13 – Amostras identificadas na figura 4A; A – Amplicon não clivado. Revelação de géis em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em Marcador 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (M1) e GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M2).

p. 80

CAPÍTULO IV

Figura 1. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de exemplares coletados de aves silvestres e empregados na terceira etapa de validação. Identificação de *Amblyomma longirostre* (linhas 01, 03, 04 e 10), *A. romarioi* (linhas 02, 07 e 08), *A. varium* (linha 05), *A. calcaratum* (linhas 06 e 09) e *A. nodosum* (linha 11). Linha A – Amplicon não clivado de fragmento 16S rRNA. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

p. 92

Figura 2. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de exemplares coletados de aves silvestres e empregados na quarta etapa de validação. Identificação de *Amblyomma romarioi* (linhas 12, 18 e 21), *A. parkeri* (linhas 13 e 20), *A. aureolatum* (linha 14), *A. naponense* (linha 15), *A. sculptum* (linha 16), *A. brasiliense* (linha 19). Linha B – *A. brasiliense*; L – *A. longirostre*; N – *A. romarioi*. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

p. 93

Figura 3. Logomarca desenvolvida para o website TickCutter (Autoria: Lucas Aguiar Rosa Machado).

p. 95

Figura 4. Página inicial da plataforma on-line TickCutter.

p. 95

Figura 5. Página individual da espécie *Amblyomma aureolatum*, evidenciando exemplares adultos de ambos os sexos, padrões de banda previstos, após a digestão enzimática e números de acesso consultados.

p. 96

Figura 6. Ferramenta de busca auxiliar para a identificação de carrapatos ixodídeos, baseada na ação de enzimas de restrição. Através da inserção dos dados resultantes, torna-se possível alcançar a identificação do exemplar de forma rápida.

p. 97

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C - Grau Celsius

µg - Micrograma

µl - Microlitro

µm - Micrmetro

µM - Micromolar

AG - Grupo Ancestral – “Ancestral Group”

AP - Amapá

BLAST - “Basic Local Alignment Search Tool”

BOLD System - “Barcode of Life Data System”

cm - Centímetro

COI - Citocromo C Oxidase I

DNA - cido desoxirribonucleico – “Deoxyribonucleic Acid”

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DPA - Departamento de Parasitologia Animal

DTC - Doença Transmitida por Carrapato

FIOCRUZ - Fundação Oswaldo Cruz

FMB - Febre Maculosa Brasileira

gltA - Citrato Sintase (gene)

h - Hora

htrA - Antígeno de membrana externa 17-kDa (gene)

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

ITS2 - Espaçador interno transcrito do DNA ribossomal nuclear

LMBM - Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular

Mb - Megabases

Mg - Miligrama

MG - Minas Gerais

min - Minuto

ml - Mililitro

mM - Milimolar

MNP - Polimorfismo de multinucleotdeos – “Multi-Nucleotide Polymorphism”

MS - Mato Grosso do Sul

NGS - Sequenciamento de Nova Geração – “Next-Generation Sequencing”

ompA - Proteína de membrana externa A 190-kDa (gene)

ompB - Proteína de membrana externa B 135-kDa (gene)

pb - Pares de base

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase – “Polymerase Chain Reaction”

PCR-RFLP - Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição – “Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism”

PA - Pará

PE - Pernambuco

PI - Piauí

pmol - picomolar

qPCR - PCR quantitativa – “Quantitative PCR”

rDNA - DNA ribossomal – “Ribosomal DNA”

RIFI - Reação de imunofluorescência indireta

RJ - Rio de Janeiro

RO - Rondônia

s - Segundo

sca - Antígeno celular de superfície (gene)

SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SNP - Polimorfismo de mononucleotídeos – “Single Nucleotide Polymorphism”

SFG - Grupo Febre Maculosa – “Spotted Fever Group”

SP - São Paulo

TAE - Tris-Acetato EDTA

TBE - Tris-Borato EDTA

TG - Grupo Tifo – “Typhus Group”

TRG - Grupo Transicional – “Transitional Group”

U - Unidade

UFJF - Universidade Federal de Juiz de Fora

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

USP - Universidade de São Paulo

V - Voltagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	p. 01
2 REVISÃO DE LITERATURA	p. 03
2.1 Carrapatos	p. 03
2.1.1 Gênero <i>Amblyomma</i>	p. 04
2.2 Ecologia de Carrapatos	p. 05
2.2.1 Aves como hospedeiros de carrapatos	p. 09
2.3 Desafios na Identificação de Carrapatos	p. 11
2.4 Abordagem Molecular na Identificação de Carrapatos	p. 13
2.4.1 PCR-RFLP	p. 15
2.5 Relevância de DTCs para Saúde Humana e Animal	p. 16
2.6 <i>Rickettsia</i> spp.	p. 18
2.6.1 Gênero <i>Rickettsia</i> no Brasil	p. 21
2.6.2 Levantamentos ecológicos/epidemiológicos com enfoque em <i>Rickettsia</i> spp.	p. 24
2.7 Interações Microbianas Relacionadas à DTCs	p. 27
CAPÍTULO I – Desenvolvimento e Avaliação da Técnica de PCR-RFLP para Identificação em Nível de Espécie de Membros do Gênero <i>Amblyomma</i> Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) Associadas a Aves em Região de Mata Atlântica no Brasil	p. 30
RESUMO	p. 31
ABSTRACT	p. 32
1 INTRODUÇÃO	p. 33
2 MATERIAL E MÉTODOS	p. 35
2.1 Levantamento de Bancos de Dados Moleculares	p. 35
2.2 Digestão Enzimática <i>in silico</i>	p. 36
2.3 DNA de Carrapatos para Validação do Protocolo	p. 36
2.4 Amplificação da região 16S rDNA	p. 37
2.5 PCR-RFLP <i>in vitro</i> para Validação do Protocolo	p. 38
3 RESULTADOS	p. 39
4 DISCUSSÃO	p. 47
CAPÍTULO II – Reavaliação e Atualização de PCR-RFLP Como Técnica para Identificação em Nível de Espécie de <i>Rickettsia</i> spp. Associadas a Carrapatos no Brasil	p. 52
RESUMO	p. 53
ABSTRACT	p. 54
1 INTRODUÇÃO	p. 55
2 MATERIAL E MÉTODOS	p. 57
2.1 Levantamento de Bancos de Dados Moleculares	p. 57
2.2 Digestão Enzimática <i>in silico</i>	p. 59
2.3 DNA de <i>Rickettsia</i> spp. para Validação do Protocolo	p. 59
2.4 Amplificação dos genes, <i>htrA</i>, <i>ompA</i> e <i>ompB</i>	p. 60
2.5 PCR-RFLP <i>in vitro</i> para Validação do Protocolo	p. 60
3 RESULTADOS	p. 62
4 DISCUSSÃO	p. 65

CAPÍTULO III – Coinfecção de *Rickettsia bellii* e *Rickettsia* do Grupo Febre Maculosa em Carrapatos *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) Coletados de Aves Silvestres no Brasil p. 69

RESUMO	p. 70
ABSTRACT	p. 71
1 INTRODUÇÃO	p. 72
2 MATERIAL E MÉTODOS	p. 74
2.1 DNA de Carrapatos Identificados e Positivos para <i>Rickettsia</i> SFG	p. 74
2.2 Desenvolvimento de PCR espécie-específico para <i>Rickettsia bellii</i>	p. 75
2.3 Análise Semi-quantitativa das Cargas de <i>Rickettsia</i> spp.	p. 77
2.4 Identificação dos Produtos de PCR	p. 77
3 RESULTADOS	p. 78
4 DISCUSSÃO	p. 82

CAPÍTULO IV – Desenvolvimento de Ferramenta On-line Auxiliar para Implementação de Protocolos de Identificação Molecular de Carrapatos Ixodídeos e *Rickettsia* spp. Reportados no Brasil p. 85

RESUMO	p. 86
ABSTRACT	p. 87
1 INTRODUÇÃO	p. 88
2 MATERIAL E MÉTODOS	p. 90
2.1 Desenvolvimento da Plataforma On-line	p. 90
2.2 Confecção do Banco de Dados	p. 90
2.3 Validação da Ferramenta de Busca	p. 91
3 RESULTADOS	p. 95
4 DISCUSSÃO	p. 98
3 DISCUSSÃO GERAL	p. 101
4 CONCLUSÕES	p. 108
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	p. 109

ANEXO A – Número de acesso das sequências de 16S rDNA disponíveis no banco de dados molecular GenBank e empregadas para determinação do protocolo PCR-RFLP para identificação de carrapatos ixodídeos reportados no Brasil p. 135

ANEXO B – Número de acesso das sequências de *htrA*, *gltA*, *ompA* e *ompB* disponíveis no banco de dados molecular GenBank e empregadas para determinação do protocolo PCR-RFLP para identificação de *Rickettsia* spp. associadas a carrapatos e previamente reportados no Brasil ou países fronteiriços p. 141

ANEXO C – Detalhamento de carrapatos avaliados no capítulo III. Informações relacionadas ao ano e local de coleta, estágio de desenvolvimento do exemplar, hospedeiro vertebrado (aves) e *Rickettsia* SFG detectado p. 146

ANEXO D – Two for the price of one: Co-infection with *Rickettsia bellii* and spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) ticks recovered from wild birds in Brazil p. 149

ANEXO E – Orientação para confecção de géis de agarose 2,5% para separação de bandas resultantes do protocolo de PCR-RFLP p. 156

ANEXO F – Tutorial para mensuração de fragmentos de banda resultantes da digestão enzimática, a partir de meios automáticos ou manuais p. 158

1 INTRODUÇÃO GERAL

A interconexão entre saúde humana, animal e o meio ambiente vem sendo extensamente considerada e debatida nos últimos anos. Estima-se que aproximadamente 60% dos agentes infecciosos que acometem humanos apresentam origem animal, evidenciando o potencial para a emergência e disseminação de agentes zoonóticos nos próximos anos. Tal fator é agravado pela ininterrupta ação antropogênica que resulta na maior exposição de indivíduos à reservatórios silvestres de agentes etiológicos, bem como no desbalanceamento de relações ecológicas anteriormente em equilíbrio. As enfermidades vetoriais apresentam particularidades epidemiológicas que as tornam especialmente suscetíveis a tais fatores agravantes. Adicionalmente, a ampla variedade de hospedeiros vertebrados suscetíveis ao parasitismo de determinadas espécies de carrapatos, por exemplo, faz com que este grupo de artrópodes promova a conexão com diversos nichos ecológicos durante seus estágios de desenvolvimento. Como resultado, agentes infecciosos podem romper barreiras interespecíficas e acometer novos hospedeiros suscetíveis.

No decorrer dos últimos anos, buscando melhor compreender as relações existentes entre hospedeiros vertebrados, carrapatos e os micro-organismos por eles albergados, muitos estudos ecológicos resultaram em considerável ampliação dos conhecimentos previamente estabelecidos. Através destes levantamentos, foi possível aprendermos mais a respeito do ciclo biológico de diversas espécies de ixodídeos, assim como suas predileções por hospedeiros, distribuições geográficas e demais fatores interferentes para sua maior ou menor ocorrência. O potencial para o carreamento e transmissão de agentes microbianos, de patogenicidade conhecida ou não, foi simultaneamente averiguado, fornecendo informações de elevada relevância epidemiológica acerca das doenças vetoriais e subsídios para o desenvolvimento de estratégias preventivas e de controle, caso necessário.

A partir de tais observações é possível compreender que a ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos (DTCs) está intimamente associada a interações ecológicas complexas, onde múltiplos fatores podem promover impactos diretos na saúde humana e animal. Diversas lacunas acerca destas relações ainda aguardam ser preenchidas, demonstrando que a continuidade de levantamentos extensos ainda se faz necessária.

Paralelamente, outro aspecto passa a ser considerado e amplia consideravelmente a complexidade das enfermidades vetoriais. A interação entre agentes patogênicos e outros componentes da microbiota do artrópode, interferem de modo direto na fisiologia do vetor, bem como em sua capacidade de aquisição, manutenção e transmissão de micro-organismos de interesse para saúde pública. Nosso conhecimento incompleto acerca desta área é comprovado pelo frequente relato de novas espécies e variantes do gênero *Rickettsia* em território brasileiro.

Inquestionavelmente, o desenvolvimento e aplicação de metodologias moleculares foi um dos responsáveis pelos progressos alcançados nas últimas décadas na área de ixodologia e epidemiologia das enfermidades vetoriais. Estas ferramentas foram capazes de contornar limitações frequentemente observadas, como a caracterização de espécimes imaturos (larvas e ninfas) de carrapatos do gênero *Amblyomma* e a detecção e identificação de bactérias por eles albergadas. Através da amplificação de alvos moleculares e sequenciamento, com posterior comparação das informações obtidas com os bancos de dados disponibilizados on-line, foi

possível esclarecer diversos ciclos biológicos e interações ecológicas relevantes para a epidemiologia das doenças transmitidas por carrapatos.

A necessidade de coleta e processamento de grande número de carrapatos, como é frequentemente verificado nos levantamentos ecológicos, somada a limitações referentes ao custeio e qualificação técnica requeridos para realização de sequenciamento e análise dos dados obtidos, é um dos limitadores para o prosseguimento nesta área. Os cortes orçamentários para execução de pesquisa científica no Brasil, como verificado nos últimos anos, podem resultar na estagnação de projetos de pesquisa que dependam de metodologias onerosas para sua continuidade. Assim, a elaboração de novos métodos moleculares alternativos e de custo reduzido para a caracterização de vetores e micro-organismos relacionados solucionam este entrave para a continuidade de estudos ecológicos amplos, especialmente em circunstâncias onde a identificação morfológica não é suficiente para a obtenção dos resultados almejados. Neste contexto, a denominada “inovação frugal” apresenta amplo potencial de aplicabilidade. Sendo um conceito relativamente recente, e ainda não totalmente caracterizado, tendo em vista as múltiplas definições presentes na literatura, esta abordagem baseia-se principalmente no desenvolvimento de soluções em circunstâncias de escassez de recurso financeiro, tecnológico, material, dentre outros, sendo uma excelente alternativa frente aos limitadores atuais e futuros.

Visando eliminar as limitações acima mencionadas, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de metodologias moleculares que auxiliem na identificação de espécies de carrapatos ixodídeos e bactérias do gênero *Rickettsia* associadas, através da elaboração de protocolos com custo reduzido. Realizando o levantamento de banco de dados moleculares, análise *in silico* e posterior validação *in vitro*, foi possível determinar combinações de alvos moleculares e enzimas de restrição com capacidade discriminatória dentre as espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* reportadas no Brasil (Capítulo I), assim como espécies de bactérias do gênero *Rickettsia* (Capítulo II). Buscando ainda a melhor compreensão das relações microbianas determinantes para a maior ou menor ocorrência de DTCs, sugere-se a implementação de pares de primers espécie-específico para a bactéria *Rickettsia bellii*, contribuindo com a detecção de quadros de coinfeção em carrapatos por múltiplas espécies de *Rickettsia* (Capítulo III). Adicionalmente, visando manter a funcionalidade dos protocolos de digestão aqui propostos, uma plataforma on-line foi desenvolvida para garantir a atualização dos perfis de digestão previstos, acompanhando novos dados moleculares ou modificações taxonômicas (Capítulo IV). Sugere-se que tal plataforma funcione ainda como um canal de comunicação e atualização para pesquisadores e grupos de pesquisa interessados em carrapatos e doenças vetoriais relacionadas. Desta forma, o presente documento busca dar continuidade aos estudos ecológicos responsáveis pelos avanços obtidos nas últimas décadas e ainda necessários para o esclarecimento das complexas relações associadas a ocorrência das DTCs no Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carrapatos

Carrapatos são artrópodes hematófagos que parasitam ampla gama de hospedeiros vertebrados, incluindo animais silvestres e domésticos. Sua relevância como agentes vetoriais de diversos agentes patogênicos impacta direta e indiretamente a saúde humana e animal (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; PAROLA et al., 2013; SZABÓ et al., 2013b; DE LA FUENTE et al., 2017). Mundialmente distribuídos, a maioria destes ectoparasitas apresentam predileção ou mesmo restrição por determinado grupo hospedeiros silvestres, com número limitado de espécies previamente reportadas parasitando animais domésticos e/ou humanos (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; GUGLIELMONE et al., 2006; WIKEL, 2018). Assim sendo, considerações acerca do ciclo biológico, ecologia e distribuição geográfica de carrapatos representam dados relevantes para a predição e prevenção das enfermidades por eles transmitidas (ESTRADA-PEÑA & DE LA FUENTE, 2014; ESTRADA-PEÑA et al., 2015; ESTEVE-GASSENT et al., 2016). A capacidade de carreamento e transmissão de patógenos é outro dado que apresenta particularidades de acordo com a espécie de artrópode, evidenciando a necessidade da correta identificação das espécies (LABRUNA, 2009; DANTAS-TORRES et al., 2012c; MCINTOSH et al., 2015; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016; ZERINGÓTA et al., 2017).

Ao menos 866 espécies de carrapatos são reconhecidas em todo o mundo (HORAK et al., 2002). Contudo, considerando as ramificações taxonômicas rotineiramente reportadas nesta área, a necessidade de estudos contínuos para melhor compreensão destes artrópodes é evidente (VENZAL et al., 2008; LABRUNA et al., 2008; NAVA et al., 2009, 2010a, 2014; DANTAS-TORRES et al., 2012b, 2019; BARROS-BATTESTI et al., 2015; LADO et al., 2016; BEATI & KLOMPEN, 2019; MARTINS et al., 2019). Avanços alcançados na área de filogenia e evolução de carrapatos, promoveram mudanças significativas em sua classificação taxonômica e nomenclatura e a ininterrupta busca pela melhor compreensão das DTCs certamente resultarão em alterações adicionais (OGDEN et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2019).

A família Ixodidae é composta pela maior parcela de espécies de carrapatos atualmente reconhecidas da fauna mundial. Também denominados “carrapatos duros”, esta família engloba os gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*, com espécies de grande relevância para a saúde humana e animal (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; TALAGRAND-REBOUL et al., 2018; YANG & HAN, 2018), além dos gêneros *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Margaropus* e *Rhipicentor* (HORAK et al., 2002). Os demais gêneros deste grupo de artrópodes encontram-se classificados dentro das famílias Argasidae, com espécies também capazes de promover agravos a saúde humana e animal (HORAK et al., 2002; SARWAR, 2017; DE OLIVEIRA et al., 2018), e Nuttalliellidae (1 espécie). Adicionalmente, a descrição da família Deinocrotinidae foi recentemente realizada, com base em fóssil do período Cretáceo (PEÑALVER et al., 2017).

É importante ressaltar que a região Neotropical do planeta, onde localiza-se o Brasil, comporta cerca de um quarto do total de espécies atualmente reconhecidas, evidenciando o desafio para correta identificação de carrapatos e o risco em potencial para ocorrência de DTCs (LABRUNA et al., 2016; APANASKEVICH & BERMÚDEZ, 2017; ASH et al., 2017; CHITIMIA-DOBLER et al., 2017; GUO et al., 2017; RIVERA-PÁEZ et al., 2018).

2.1.1 Gênero *Amblyomma*

Morfológicamente, espécies do gênero *Amblyomma* apresentam aparelho bucal longo, tendo seu segundo segmento dos palpos ao menos duas vezes mais comprido do que o terceiro. Olhos e festões estão presentes na maioria das espécies, sendo verificados em escudos ornamentados e usualmente de coloração diferente do restante do corpo. Adicionalmente, placas adanais não são verificadas nos machos. Há ainda a presença de estigmas respiratórios em forma de vírgula ou triângulo. Este gênero de carrapatos heteróxeos é difundido nas zonas tropicais e subtropicais (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; MONTEIRO, 2017).

No Brasil foram descritos, até o momento, 73 espécies da ordem Ixodida, sendo 26 pertencentes a família Argasidae e 47 da família Ixodidae (GIANIZELLA et al., 2018; MUÑOZ-LEAL et al., 2018), dentre as quais o gênero *Amblyomma* apresenta destaque, possuindo o maior número de espécies descritas em território nacional (DANTAS-TORRES et al., 2009, 2012b, 2019; NAVA et al., 2014; BARROS-BATTESTI et al., 2015; KRAWCZAK et al., 2015; MARTINS et al., 2019). Ressalta-se ainda a maior correlação deste gênero na infestação de hospedeiros humanos na América do Sul e, conseqüentemente, seu impacto na transmissão de agentes infecciosos (GUGLIELMONE et al., 2006; GUGLIELMONE & ROBBINS, 2018).

O ciclo biológico de carrapatos relaciona-se diretamente ao potencial de transmissão de patógenos e seu impacto para a saúde humana e animal. Ixodídeos podem apresentar em seu ciclo um, dois ou três espécies hospedeiras. Usualmente, componentes do gênero *Amblyomma* parasitam três hospedeiros distintos, resultando em um ciclo heteróxeo. Larvas ingurgitadas após o primeiro repasto sanguíneo, deixam o hospedeiro e sofrem a muda no ambiente. Posteriormente, ninfas localizam um segundo hospedeiro vertebrado, onde realizam o repasto sanguíneo e novamente voltam para o ambiente, sofrendo a segunda muda para o estágio adulto. Um terceiro hospedeiro é usualmente utilizado para a reprodução de machos e fêmeas, havendo ainda o ingurgitamento das fêmeas para o desenvolvimento de ovos (JONGEJAN & UILENBERG, 2004). No entanto, além das predileções por hospedeiros vertebrados distintos, particularidades biológicas são observadas dentre as muitas espécies que compõem este gênero. Como exemplo, a espécie *A. rotundatum*, habitualmente reportada parasitando répteis e anfíbios, apresenta reprodução partenogênica (ARAGÃO, 1936; LABRUNA et al., 2005b; RODRIGUES et al., 2010), com a provável descrição de ciclo dioxênico (dois hospedeiros) em condições controladas (RODRIGUES et al., 2010). O alcance de múltiplos hospedeiros vertebrados e ampla variedade de espécies parasitadas para a conclusão do ciclo biológico ampliam consideravelmente a possibilidade de aquisição e transmissão de patógenos e alcance a animais domésticos e humanos (ESTRADA-PEÑA et al., 2015; KAHL, 2018).

Como hospedeiros acidentais, humanos podem ser infestados em qualquer uma das etapas previamente descritas. A predisposição para tal ocorrência está estreitamente relacionada a fatores intrínsecos, ambientais e comportamentais do hospedeiro (GUGLIELMONE et al., 2006; ESTRADA-PEÑA et al., 2015). A realização de atividades ao ar livre e o estreito contato com material vegetal, como toras de madeira, exemplificam alguns dos fatores comportamentais relacionados a aquisição de carrapatos (LANE et al., 2004; DANTAS-TORRES et al., 2012c). A presença de animais domésticos amplia a possibilidade de exposição dos residentes do domicílio, uma vez que estes animais podem promover o carreamento de carrapatos de regiões peridomiciliares para o interior da residência (PINTER et al., 2008). E mesmo o sexo do hospedeiro parece ter efeito sob a atração de carrapatos. Demonstrou-se, recentemente, em experimentação controlada que a espécie *Amblyomma americanum* era

significativamente mais atraída pela respiração de mulheres, quando comparado a indivíduos do sexo masculino (JOSEK et al., 2019).

Em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil, múltiplas publicações na última década auxiliaram no melhor entendimento acerca da relação entre carrapatos e seus distintos hospedeiros vertebrados (OGRZEWALSKA et al., 2009b, 2010; LUZ et al., 2012, 2018a, 2018c; SPOLIDORIO et al., 2012; MATURANO et al., 2015; RAMOS et al., 2015; MICHEL et al., 2017; ZERINGÓTA et al., 2017). Contudo, o ciclo biológico de uma parcela das espécies de *Amblyomma* presentes na região Neotropical é parcialmente ou totalmente desconhecido, especialmente em suas fases imaturas, por possuírem ainda mais desafios relacionados a correta caracterização em nível de espécie (LABRUNA et al., 2007c; LUZ et al., 2018b). Assim sendo, a execução de estudos em larga escala para esclarecer a diversidade da ixodofauna brasileira, inserida na região Neotropical, bem como informações acerca do potencial de transmissão e reservatório de patógenos continuam sendo necessários para a melhor compreensão e desenvolvimento de medidas preventivas para DTCs (ZERINGÓTA et al., 2017; HAMER et al., 2018).

2.2 Ecologia de Carrapatos

O enfoque parasitológico em relação a carrapatos sempre foi prioritariamente voltado para o impacto a saúde humana e animal. Contudo, é necessário desenvolver uma percepção mais holística a respeito da relevância de parasitas para a estruturação e manutenção de populações, atuando como agentes reguladores em múltiplos níveis tróficos e como parte de ecossistemas naturais. Assim, carrapatos desempenham papel de relevância na coevolução de múltiplas espécies de hospedeiros (LAFFERTY et al., 2008; LAFFERTY & KURIS, 2012; DOUGHERTY et al., 2016).

A interação entre carrapatos, seus hospedeiros e os patógenos por eles transmitidos, compõem um bom exemplo da complexidade ecológica de associações parasitárias (ESTRADA-PEÑA et al., 2017a). Para melhor compreensão de tais interações, devemos tentar reconhecer os fatores que promovem a manutenção ou restringem tais ocorrências, bem como as implicações de aspectos ecológicos correlacionados a disseminação de patógenos (ESTEVE-GASSENT et al., 2016). Os focos de transmissão de DTCs são regulados pela disponibilidade de condições ambientais adequadas e hospedeiros vertebrados apropriados, que servem como fonte de alimento para os artrópodes e, em algumas circunstâncias, reservatório/amplificador dos agentes infecciosos (RANDOLPH & ROGERS, 2010). Diversos estudos acerca da distribuição ecológica e geográfica de carrapatos parasitando mamíferos silvestres (DE LA FUENTE et al., 2004; LABRUNA et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2012a; PADURARU et al., 2012; SARAIVA et al., 2012; GARCIA et al., 2013; LUZ et al., 2018a; GRUHN et al., 2019) e domésticos (DANTAS-TORRES, 2009; GONÇALVES et al., 2014; VIEIRA et al., 2018b), anfíbios e répteis (LUZ et al., 2018c; TORRES et al., 2018; OGRZEWALSKA et al., 2019) e aves (LABRUNA et al., 2007b; OGRZEWALSKA et al., 2010; TOLESANO-PASCOLI et al., 2010; TORGA et al., 2013; MATURANO et al., 2015; LUZ et al., 2017a; ZERINGÓTA et al., 2017) vêm sendo desenvolvidos nas últimas décadas, objetivando a melhor compreensão da ecologia deste importante grupo de artrópodes. Contudo, todos os constituintes determinantes para a ocorrência de tais interações ainda não estão totalmente esclarecidos (ESTRADA-PEÑA et al., 2015; CABEZAS-CRUZ et al., 2018, 2019; LUZ et al., 2018b).

Sabe-se que carrapatos não parasitam somente grupos de hospedeiros filogeneticamente próximos, mas que o compartilhamento de ambientes e o comportamento das espécies de

vertebrados também apresentam relevância na determinação de tais relações. Exemplificando tal afirmativa, dados de estudo avaliando as múltiplas redes de interação na região Paleártica ocidental demonstrou que mais de 70% dos carrapatos e patógenos compartilham hospedeiros com similaridades ambientais, mas não filogenéticas (ESTRADA-PEÑA et al., 2015). As estratégias ecológicas distintas podem ser facilmente ilustradas com as espécies de carrapato *Ixodes ricinus* e *I. arboricola*, reportadas na região Paleártica. Embora ambos parasitem aves, ocorre uma segregação das espécies, em função dos diferentes perfis comportamentais do hospedeiro. Enquanto o primeiro é associado a aves frequentemente avistadas no solo e filogeneticamente correlacionados, o segundo apresenta hábitos nidícolas, parasitando pássaros e/ou morcegos em ocos de árvore. Esta predileção correlaciona-se ainda com o período do dia em que o parasita se desprende do hospedeiro (HEYLEN & MATTHYSEN, 2010). A verificação de padrões de adaptabilidade diversos nas interações entre carrapatos, hospedeiros e patógenos sugerem a ocorrência de processos evolutivos de longo prazo, que resultaram na formação dos nichos ecológicos atualmente detectados. Estes apresentam diversificações, mesmo quando consideramos espécies agrupadas em um mesmo gênero (ESTRADA-PEÑA et al., 2015; DOUGHERTY et al., 2016).

A compreensão da complexidade ecológica envolvendo este grupo de ectoparasitas fornece embasamento para explicar observações práticas. Podemos utilizar a espécie *Amblyomma longirostre* para exemplificar esta afirmativa. Esta espécie foi amplamente descrita na região Neotropical, sendo reportado em 15 dos 33 países que compõem esta área (LUZ et al., 2018d). Os estágios imaturos desta espécie são rotineiramente associados a aves e, quando na fase adulta, apresentam porcos-espinhos (*Coendou* spp.), roedores tipicamente arborícolas e raramente observados em solo, como hospedeiro definitivo (EMMONS & FEER, 1997 apud LABRUNA et al., 2007a). Assim, pode-se sugerir que esta espécie de artrópode utiliza da copa de árvores para suas fases de vida livre. O amplo conhecimento deste ciclo é capaz de explicar por que, mesmo com os relatos prévios de estágios imaturos em aves (SCOTT et al., 2001) e uma fêmea de vida livre (NODEN et al., 2015) na América do Norte, *A. longirostre* nunca se estabilizou em países deste continente. Além dos fatores ambientais potencialmente adversos, a ausência de roedores da família Erethizontidae nesta região, pode limitar a estabilidade de uma nova população. Embora haja a disponibilidade de outros hospedeiros previamente relatados, como mamíferos das famílias Canidae e Cervidae, na Região Neártica, a capacidade da fêmea de produzir ovos após a realização de repasto sanguíneo neste perfil de hospedeiro ainda não foi confirmada (NAVA et al., 2010b). Tais relatos exemplificam ainda o papel desempenhado por aves migratórias na introdução de espécies parasitas invasoras e patógenos associados, como será posteriormente explorado.

As espécies *Amblyomma calcaratum* e *A. nodosum* apresentam biologia similar, sendo quase exclusivamente reportados em Tamanduás (*Tamandua tetradactyla* e *Myrmecophaga tridactyla*) em sua fase adulta (BARBIERI et al., 2013; GARCIA et al., 2013; MOERBECK et al., 2018). Desta forma, o parasitismo de aves usualmente observadas próximas ao solo por tais espécies de carrapatos é algo facilmente explicado (LABRUNA et al., 2007c; LUZ et al., 2012; OGRZEWALSKA et al., 2012; MATURANO et al., 2015), ressaltando ainda a relevância deste perfil de hospedeiro para os estágios imaturos destas espécies (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Da mesma forma, a co-infestação de *A. calcaratum* ou *A. nodosum* e *A. longirostre* em passeriformes, observada em estudo realizado no estado de São Paulo, poderia ser justificada pelos aspectos comportamentais do hospedeiro, uma vez que muitas destas aves encontram-se no solo, mas constroem seus ninhos em árvores (LABRUNA et al., 2007c). Dados acerca da co-infestação de hospedeiros por diferentes espécies de carrapatos passam a ganhar maior relevância ao considerarmos a capacidade de transmissão horizontal de agentes microbianos

em decorrência da realização de repasto sanguíneo simultaneamente em um mesmo hospedeiro (BELLI et al., 2017).

Fatores ambientais também resultam em pressão seletiva, induzindo a adaptação fisiológica e comportamental nos carrapatos. A elucidação dos reais efeitos destas mudanças adaptativas para a capacidade de transmissão de patógenos está apenas no início, sendo um fator crítico para o melhor entendimento das consequências epidemiológicas das DTCs de relevância para medicina humana e veterinária (ESTEVE-GASSENT et al., 2016). Contudo, alguns impactos diretos das mudanças climáticas e distribuição geográfica de carrapatos e doenças vectoriais são verificados. A expansão de *Ixodes scapularis* para o norte dos Estados Unidos e Canadá, a título de exemplo, poderia ser explicada pelos invernos menos rigorosos que possibilitam a sobrevivência do carrapato. Tal dado torna-se ainda mais preocupante ao considerarmos as projeções futuras para esta espécie. Estima-se que a população de vetores poderia dobrar até 2020, devido a influência da temperatura na reprodução de artrópodes (GREER et al., 2008; FERIA-ARROYO et al., 2014). Entretanto, estudos que antecipam a expansão de populações vectoriais como resultado de mudanças climáticas devem ser cautelosamente considerados, já que a real velocidade de evolução e adaptação das espécies ao aumento de temperatura provavelmente ocorrerá de forma imediata (OLIVEIRA et al., 2017).

A degradação ambiental e mudança da vegetação também agem diretamente na ixodofauna local. A recente descrição do complexo *Amblyomma cajennense*, anteriormente descrito como uma única espécie (NAVA et al., 2014), evidencia não somente as lacunas resultantes da caracterização morfológica usualmente implementada na parasitologia, mas também o impacto de fatores ambientais na distribuição de espécies distintas. Estudo realizado por Martins et al. (2016), descreveu de forma mais detalhada a distribuição geográfica de *A. cajennense sensu stricto* e *A. sculptum*, as únicas espécies do complexo reportadas em território brasileiro. Verificou-se que a primeira espécie está restrita basicamente ao bioma Amazônico, onde predomina o clima equatorial. Por outro lado, *A. sculptum* encontra-se amplamente distribuído em clima tropical (biomas Pantanal, Cerrado e Floresta Atlântica). Foi possível ainda determinar a expansão de *A. sculptum*, principal vetor brasileiro de *Rickettsia rickettsii*, no estado de Rondônia, cerca de uma década após extenso levantamento realizado entre os anos de 2000-2005 na mesma região (LABRUNA et al., 2004b). Considerando o potencial vectorial de *A. sculptum*, tal achado representa um alerta para a saúde pública e pode ser justificado pelos elevados níveis de degradação ambiental e desmatamento observados neste estado, o que potencialmente facilita o estabelecimento de populações desta espécie (SOUZA et al., 2013 apud MARTINS et al., 2016). Outros estudos evidenciaram ainda que a diversidade de carrapatos e o nível de preservação natural verificado no local de obtenção de amostras estão diretamente relacionados (OGRZEWALSKA et al., 2011a; LUZ et al., 2017a; BARBIERI et al., 2019). Assim, podemos estender a relevância de levantamentos ecológicos para além dos dados epidemiológicos obtidos, sugerindo que este pode ser um indicador do nível de degradação ambiental da região analisada, sabendo ainda que a fauna de animais vertebrados silvestres afeta diretamente a população de ectoparasitas (MARTINS et al., 2016; BARBIERI et al., 2019).

A metodologia empregada na identificação de carrapatos coletados é capaz de interferir também nos resultados obtidos, o que interfere no reconhecimento da dinâmica populacional. Na publicação de Zeringóta et al. (2017), em levantamento realizado em região de Mata Atlântica, descreveu-se a ocorrência superior de *A. parkeri* e *A. calcaratum*, fator discrepante ao observado em estudos anteriores. Adicionalmente, a predominância de exemplares de *Amblyomma romarioi*, previamente denominado *Amblyomma* sp. haplótipo Nazaré, foi outro

dado surpreendente. Sugeriu-se como justificativa para tal discrepância a localização da coleta, período do ano em que foram realizadas e a completa identificação da amostragem através de ferramentas moleculares (ZERINGÓTA et al., 2017). A identificação em nível de gênero, especialmente considerando os estágios imaturos de carrapatos, consiste em limitação frequente em estudos ecológicos de *Amblyomma* spp., dificultando a análise comparativa dos resultados (LUZ et al., 2017a). Tal limitador é inclusive apontado como um dos principais fatores que dificultam a melhor compreensão das associações entre aves e carrapatos na região Neotropical (MILLER et al., 2016). Diversos estudos relevantes para a ixodologia brasileira apresentaram este ponto limitante, como pode ser verificado na Tabela 1.

O conhecimento incompleto acerca da relação parasito-hospedeiro torna impossível a determinação precisa da relevância de tais interações para os ecossistemas, não permitindo ainda a realização de comparações significativas entre estudos em diferentes regiões e períodos (DOUGHERTY et al., 2016). Apenas com a realização de estudos a campo e levantamento da população de carrapatos de forma ativa seremos capazes de começar a preencher algumas das lacunas atualmente existentes acerca dos ciclos biológicos, distribuição geográfica, fatores ambientais relacionados e epidemiologia das DTCs (ESTRADA-PENÁ et al., 2015). Considerando a dimensão continental do nosso país e os diferentes biomas encontrados, tal desafio torna-se ainda maior para pesquisa da ixodofauna brasileira. Adicionalmente, com a redução nos financiamentos em pesquisa científica verificados atualmente no Brasil, após um investimento contínuo por parte das agências de fomento, a utilização otimizada dos recursos para obtenção da maior quantidade possível de informação dos projetos de pesquisa torna-se especialmente relevante (MOURA & CAMARGO JUNIOR, 2017).

Quadro 1. Estudos prévios avaliando relação pássaros-carrapatos, evidenciando o percentual de amostras coletadas e identificadas em nível de espécie

Autoria	Ano	Estado	id. em nível de espécie (n identificado/n total)	%
Marini et al.	1996	PR	129/129	0%
Labruna et al.	2007c	SP	251/568	44,19%
Ogrzewalska et al.	2009	SP	507/2339	21,67%
Ogrzewalska et al.	2010	PA	151/443	34,08%
Tolesano-Pascoli et al.	2010	MG	74/364	20,33%
Ogrzewalska et al.	2011b	BA	47/73	64,38%
Luz et al.	2012	MG	387/448	86,38%
Ogrzewalska et al.	2012	SP	448/736	60,86%
Santolin et al.	2012	RJ	26/44	59,09%
Amaral et al.	2013	RS	91/105	86,67%
Ogrzewalska et al.	2013	MS	4/9	44,44%
Torga et al.	2013	MG	28/56	50%
Martins et al.	2014	AM	16/24	66,66%
Lugarini et al.	2015	PB/BA	133/959	13,87%
Maturano et al.	2015	MG	88/2391	3,69%

2.2.1 Aves como hospedeiros de carrapatos

O parasitismo por carrapatos em diversas espécies animais, incluindo aves silvestres, representa um importante papel na epidemiologia das DTCs (PALOMAR et al., 2012; KADING et al., 2018). Em diferentes partes do mundo, aves foram previamente reportadas como hospedeiros para ampla variedade de carrapatos, servindo ainda como reservatórios de agentes patogênicos para homens e animais (DE LA FUENTE et al., 2015). A capacidade de deslocamento deste grupo de vertebrados e consequente disseminação de vetores impacta diretamente na distribuição de agentes infecciosos (SCOTT et al., 2001, 2016; LACHISH et al., 2012; PALOMAR et al., 2012; HASLE, 2013; PAROLA et al., 2013; SÁNDOR et al., 2014). Assim sendo, aves silvestres são relevantes na manutenção e ecologia de diversos micro-organismos de patogenicidade conhecida ou não (LUZ et al., 2017b; DI LECCE et al., 2018; TOKAREVICH et al., 2019) e estudos avaliando a infestação de pássaros apresentam importantes implicações (LUZ et al., 2012; GELLER et al., 2013; OGRZEWSKA et al., 2013, 2014; MARTINS et al., 2014; LITERAK et al., 2015; MATURANO et al., 2015; RAMOS et al., 2015; ZERINGÓTA et al., 2017).

Verifica-se ainda a relevância deste grupo de hospedeiros no ciclo biológico de diversas espécies de carrapatos. Sabe-se, por exemplo, que para os estágios de larva e ninfa, aves são consideradas hospedeiros primários para múltiplas espécies de ixodídeos localizados na região Neotropical (OGRZEWSKA & PINTER, 2016). Pássaros silvestres brasileiros, por

exemplo, são predominantemente parasitados pela fase imatura de carrapatos ixodídeos, com destaque para carrapatos do gênero *Amblyomma*. Há na literatura o registro de, ao menos, 19 das 33 espécies de *Amblyomma* spp. encontradas no Brasil (OGRZEWALSKA et al., 2013; MARTINS et al., 2014; MATURANO et al., 2015; RAMOS et al., 2015; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016; ZERINGÓTA et al., 2017; LUZ et al., 2018b). Representantes dos gêneros *Ornithodoros*, *Ixodes* e *Haemaphysalis* também já foram registrados em interações similares. Todavia, a relevância deste perfil de hospedeiros para o ciclo biológico do parasita parece variar de acordo com a espécie de carrapato (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Exemplares adultos da espécie *Ixodes paranaenses*, por exemplo, foram reportados em grande quantidade parasitando aves da família Apodidae, diferindo da ocorrência de estágios imaturos usualmente associados a este perfil de hospedeiro (LUZ et al., 2017a).

Lacunas a serem preenchidas ainda são observadas na bioecologia destes ectoparasitas, principalmente acerca de seus estágios imaturos rotineiramente capturados. Sabendo da estreita relação entre larvas e ninfas e o parasitismo em aves, a necessidade de estudos contínuos nesta área ainda é justificável (LABRUNA et al., 2007c; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016; ZERINGÓTA et al., 2017). A espécie *Amblyomma brasiliense*, inicialmente considerada um parasita acidental de aves, exemplifica as lacunas ainda presentes e a indispensabilidade dos levantamentos ecológicos (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Luz et al. (2017b), contrapuseram o caráter acidental sugerido, ao identificar esta espécie em aproximadamente 19% do total de 138 exemplares obtidos em estudo a campo com aves no estado do Rio de Janeiro (RJ). Posteriormente, com análise mais abrangente para a predição do ciclo biológico natural de *A. brasiliense*, Luz et al. (2018b) postularam que todas as fases deste carrapato parasitam porcos selvagens, tendo aves como hospedeiros alternativos para as fases imaturas (larvas e ninfas), especificamente em florestas com elevado grau de conservação e em alta altitude.

O papel proeminente das aves na disseminação de agentes infecciosos, como *Borrelia burgdorferi* e *Anaplasma phagocytophilum*, já foram previamente reportados por De La Fuente et al. (2015), através de estudos considerando a associação entre pássaros, carrapatos e patógenos. Sugere-se, contudo, que este grupo de hospedeiros vertebrados tenha uma baixa contribuição na disseminação de outros micro-organismos vetorizados por carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2015). Avaliação da infestação de carrapatos e agentes infecciosos correlatos em aves coletadas em arquipélago localizado a mais de 1.400 km do continente europeu exemplifica o potencial de disseminação destes hospedeiros vertebrados. Detectou-se em tal estudo a ocorrência de *Turdus merula* infestado por *Ixodes frontalis* albergando *Borrelia turdi*. Tal micro-organismo foi inicialmente descrito em carrapatos oriundos de aves em continente asiático e considerado incomum na Europa. Sugere-se atualmente uma distribuição muito mais ampla para esta bactéria (FUKUNAGA et al., 1996; LITERAK et al., 2015).

No Brasil, os principais estudos da interação ave-carrapato-patógeno tiveram seu enfoque voltado para micro-organismos do gênero *Rickettsia* (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). A bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB) é o micro-organismo de maior relevância deste gênero e, até o presente momento, não foi detectado em carrapatos capturados de aves. Devemos considerar, entretanto, sua prévia detecção em *Amblyomma aureolatum* e *A. cajennense sensu lato*, ambos já reportados parasitando este perfil de hospedeiro (PAROLA et al., 2013; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Adicionalmente, com a descrição da espécie *A. sculptum*, integrante do complexo *A. cajennense*, e sua reconhecida relevância como vetor da bactéria *R. rickettsii*, sabemos que este artrópode também já foi detectado em associação com pássaros (LUZ et al., 2017b). Outros componentes do gênero *Rickettsia*, de patogenicidade conhecida ou não, foram previamente

reportados em carrapatos obtidos em aves no Brasil. As espécies *Rickettsia parkeri* (cepas NOD, e ARF), *R. amblyommatis*, ‘*Candidatus R. andeanae*’, *R. rhipicephali* e *R. bellii* (OGRZEWALSKA et al., 2011b, 2013; LUGARINI et al., 2015; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016; LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017). Considerando que diversos agentes infecciosos associados a carrapatos tiveram seu papel patogênico reconhecido apenas anos após sua descrição inicial, como ocorreu com *Neoerlichia mikurensis*, *Borrelia miyamotoi*, *R. helvetica* e *R. monacensis*, informações relacionadas a estes micro-organismos de patogenicidade até então desconhecida não devem ser desprezadas (TIJSSE-KLASSEN et al., 2014).

Ainda que não existam relatos confirmados da transmissão direta de DTCs a partir de aves para um posterior hospedeiro humano, não é possível excluir a possibilidade de tal ocorrência. Um carrapato em estágio imaturo pode, ao atingindo o nível de desenvolvimento seguinte e realizar novo repasto sanguíneo, transmitir agentes infecciosos adquiridos a partir de aves para um novo hospedeiro suscetível. Este poderá servir ainda como reservatório ou amplificador do micro-organismo para outros carrapatos, ampliando o risco de ocorrência da enfermidade na população (LUZ et al., 2017b).

Os avanços obtidos nas últimas duas décadas através de múltiplos levantamentos acerca do parasitismo de aves em território brasileiro foram responsáveis pela melhor compreensão a respeito da diversidade desta associação parasita-hospedeiro (LABRUNA et al., 2007c; OGRZEWALSKA et al., 2012; TORGA et al., 2013; MARTINS et al., 2014; MATURANO et al., 2015; RAMOS et al., 2015; LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017). Entretanto, ao considerarmos as dimensões continentais do Brasil e a extensa biodiversidade aqui encontrada, com ao menos 1.919 espécies de aves já descritas, nosso conhecimento acerca da interação entre aves-carrapatos-patógenos ainda é um trabalho em desenvolvimento e longe de concluído (PIACENTINI et al., 2015). O importante papel das aves na evolução e suporte ecológico de carrapatos e patógenos por eles transmitidos deve ser conceituado para implementação e aprimoramento de medidas de controle efetivas para DTCs (DE LA FUENTE et al., 2015).

O advento de técnicas moleculares para identificação de estágios imaturos utilizando marcadores moleculares como 16S rDNA e 12S rDNA mitocondriais, somado a publicação de chave de identificação de ninfas de *Amblyomma* spp., propiciaram boa parte dos avanços obtidos nos últimos anos (MANGOLD et al., 1998; BEATI & KEIRANS, 2001; MARTINS et al., 2010; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Ainda assim, o desenvolvimento e otimização de novas estratégias que permitirão o estudo em larga escala e de forma economicamente viáveis para a identificação de carrapatos, principalmente em seus estágios imaturos, torna-se uma etapa crítica para o esclarecimento da bioecologia de carrapatos e distribuição de DTCs (LUZ et al., 2017b).

2.3 Desafios na Identificação de Carrapatos

A correta identificação dos exemplares obtidos em estudos a campo apresenta-se como um dos grandes desafios na área de ixodologia, representando um entrave na melhor compreensão acerca da ecologia e epidemiologia das doenças zoonóticas (ESTRADA-PEÑA et al., 2013; USPENSKY, 2018).

Em parasitologia, a clássica avaliação de aspectos morfológicos para a caracterização dos diferentes tipos de organismos trabalhados foi implementada isoladamente durante anos, permitindo o alcance ao diagnóstico e recomendação da intervenção adequada, mesmo em países menos desenvolvidos (BARNISH et al., 2006). No estudo e identificação de carrapatos,

tal metodologia apresenta destaque, sendo extensamente utilizada mesmo em estudos mais recentes (OGRZEWALSKA et al., 2012, 2013, 2014; SARAIVA et al., 2012; GELLER et al., 2013; ZERINGÓTA et al., 2017; LUZ et al., 2018c). A descrição de novas chaves de caracterização morfológica e atributos que possibilitem a diferenciação de espécies através deste método exemplificam o dinamismo e progresso deste importante recurso para ixodologia mundial (LABRUNA et al., 2009; MARTINS et al., 2010, 2016; NAVA et al., 2018). Em recente publicação, Estrada-Peña et al. (2017) avaliaram a capacidade de identificação morfológica de carrapatos em diversos laboratórios na Europa e África, ressaltando a necessidade de treinamento de especialistas. De acordo com os autores, tal habilidade é necessária para realização de estudos epidemiológicos e determinação de riscos de espécies parasitárias invasivas.

Deve-se considerar, entretanto, as limitações da identificação fenotípica de carrapatos. Para a realização de tal procedimento é necessário o desenvolvimento prévio de expertise acarológica. Adicionalmente, a identificação pode ser especialmente desafiadora em espécimes danificados ou imaturos (PAROLA et al., 2013; MATURANO et al., 2015). A ausência de características diferenciais limita a identificação de exemplares em estágio larval ao nível de gênero (CLIFFORD et al., 1961 apud ZERINGÓTA et al., 2017). A partir do estágio ninfal, apenas recentemente se tornou possível a identificação em nível de espécie para componentes do gênero *Amblyomma* (MARTINS et al., 2010). A grande relevância dos estágios imaturos para a saúde pública, sendo responsáveis pela maioria dos episódios de parasitismo em humanos, torna esta restrição bastante deletéria para a compreensão das DTCs (GUGLIELMONE et al., 2006).

Uma alternativa para esta problemática consiste na coleta e manutenção de larvas e ninfas ingurgitadas nas instalações laboratoriais. A incubação destes exemplares vivos em temperatura e umidade adequadas possibilita a muda para o próximo estágio evolutivo, permitindo assim o alcance de níveis taxonômicos superiores (LABRUNA et al., 2007c; OGRZEWALSKA et al., 2009b; DANTAS-TORRES et al., 2012a; MATURANO et al., 2015; RAMOS et al., 2015; LUZ et al., 2018a). Tal estratégia limita-se a exemplares ingurgitados e, caso estes tornem-se inviáveis durante o transporte ou incubação, a caracterização ficará comprometida (LABRUNA et al., 2007c; OGRZEWALSKA et al., 2009b). Há ainda a necessidade de instalações laboratoriais específicas para este tipo de prática e aumenta-se o risco à biossegurança de laboratoristas, uma vez que desconhecemos os possíveis micro-organismos e patógenos albergados por este carrapato (THANGAMANI & BENTE, 2014).

A descrição do complexo *Amblyomma cajennense*, composto pelas espécies *A. cajennense sensu stricto*, *A. mixtum*, *A. sculptum*, *A. tonelliae*, *A. interandinum* e *A. patinoi*, ilustra as lacunas resultantes de décadas de caracterização morfológica (NAVA et al., 2014). Mesmo sendo considerado um dos principais vetores de *Rickettsia rickettsii* em regiões da América do Sul e Central, e objeto de estudo de diversos levantamentos (LABRUNA, 2009; PIRES et al., 2013), apenas com a análise associada de múltiplos marcadores moleculares foi possível demonstrar as diferenças populacionais, de acordo com a distribuição geográfica deste grupo de artrópodes e consequente descrição das espécies supracitadas (BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014). Dentre as espécies *A. cajennense sensu stricto* e *A. sculptum*, presentes em território brasileiro, é possível diferenciá-las apenas através da morfologia do aparelho genital de fêmeas, sendo impossível a correta discriminação de exemplares machos através de características morfológicas (MARTINS et al., 2016).

Outras espécies pertencentes a este gênero apresentam características morfológicas similares, sendo de difícil distinção através da análise estrutural externa. O complexo de

espécies *Amblyomma maculatum*, composto por *A. maculatum*, *A. triste* e *A. tigrinum*, são espécies morfológicamente e filogeneticamente relacionadas de difícil diferenciação (ESTRADA-PEÑA et al., 2005; NIERI-BASTOS et al., 2018). A identificação incorreta de um exemplar de *A. triste* como *A. tigrinum* por Aragão e Fonseca (1961) comprova os desafios para discriminação destas espécies (ESTRADA-PEÑA et al., 2005), bem como as possíveis complicações resultantes da identificação incorreta. A recente sugestão de que as espécies *A. maculatum* e *A. triste* devem ser consideradas sinônimas, com base na escassez de características morfológicas discriminatórias e análise filogenética, evidencia novamente as modificações taxonômicas rotineiramente verificadas nesta área do conhecimento e a necessidade de atualização constante de todo e qualquer sistema de identificação de carrapatos (fenotípico ou molecular) (LADO et al., 2018).

Fêmeas de *Amblyomma dissimile* e *A. rotundatum* também exemplificam os obstáculos relacionados a identificação morfológica de carrapatos, mesmo em estágio adulto. Adicionalmente, tais espécies compartilham aspectos ecológicos, sendo comumente reportadas parasitando anuros na região Neotropical, incluindo anfíbios do gênero *Rhinella* (GUGLIELMONE & NAVA, 2010; LUZ et al., 2018c).

Embora tenham hospedeiros primários distintos na fase adulta, sendo *Amblyomma geayi* reportado principalmente em bichos-preguiça (*Choloepus* spp.), e *A. longirostre* e *A. parkeri* usualmente descritos parasitando porcos-espinhos (*Coendou* spp.), a estreita relação filogenética entre estas espécies pode ser evidenciada pela similaridade morfológica (LABRUNA et al., 2009; MARTINS et al., 2013). Aspectos comportamentais são também compartilhados, como foi verificado por Luz et al. (2018d). Estes autores reportaram a fixação de exemplares de *A. longirostre* e *A. parkeri* através da formação de cimento nos espinhos de *Chaetomys subspiosus* e *Sphiggurus villosus*, respectivamente. A similaridade morfológica pode resultar na errônea identificação de exemplares capturados, afetando consequentemente a determinação de distribuição geográfica destas três espécies presentes em território nacional, como demonstrado por Labruna et al. (2009).

Assim sendo, a caracterização morfológica de carrapatos foi a base da ixodologia e de muitos dos estudos realizados até o presente momento, não devendo ser negligenciada na execução de estudos atuais e futuros. Contudo, a utilização de metodologias alternativas para solução das limitações detalhadas acima faz-se necessária para que os avanços nesta área sejam contínuos (ABDAD et al., 2018).

2.4 Abordagem Molecular na Identificação de Carrapatos

O desenvolvimento e otimização de abordagens moleculares foram capazes de revolucionar a sistemática e organização taxonômica de diversos organismos vivos, sendo aplicada também ao estudo de ectoparasitas (CRUICKSHANK, 2002; NAVA et al., 2009). A associação de metodologias fenotípicas e moleculares foi capaz de fornecer subsídios para os muitos avanços obtidos nas últimas décadas acerca da ixodofauna brasileira, sendo apresentada como uma alternativa para as limitações verificadas nos métodos clássicos de caracterização (LABRUNA et al., 2005a; SARAIVA et al., 2012; RAMOS et al., 2015; LUZ et al., 2017b, 2018b, 2018d; ZERINGÓTA et al., 2017; MACHADO et al., 2018; BARBIERI et al., 2019).

Importantes alterações taxonômicas ocorreram em decorrência do emprego de técnicas moleculares para a caracterização de carrapatos, com a descrição de novos complexos, espécies e haplótipos (BARROS-BATTESTI et al., 2003; LABRUNA & VENZAL, 2009; NAVA et al., 2010a; BURGER et al., 2014; MARTINS et al., 2019), mesmo em grupos de vetores

amplamente estudados anteriormente e de reconhecida relevância para saúde humana e animal, como o complexo *Rhipicephalus sanguineus* (LIU et al., 2013), complexo *Amblyomma cajennense* (NAVA et al., 2014) e complexo *A. maculatum* (ESTRADA-PEÑA et al., 2005; LADO et al., 2018).

Diversos alvos moleculares foram implementados na caracterização e determinação de relações filogenéticas de carrapatos, como as regiões mitocondriais 16S rDNA (MANGOLD et al., 1998), 12S rDNA (BEATI et al., 2012), Citocromo C Oxidase I (COI) (HEBERT et al., 2004) e fragmentos do segundo espaçador interno transcrito do DNA ribossomal nuclear (ITS2) (MCLAIN et al., 1995; ZAHLER et al., 1995; LV et al., 2014). Múltiplas características devem ser observadas na seleção do gene utilizado. Fatores como o número de cópias presentes no genoma, taxa de substituição, disponibilidade de primers universais e ampla utilização em outros estudos devem ser considerados para que se obtenha as informações almejadas. No entanto, nenhum marcador molecular será capaz de atender a todas as condições ideais, sendo necessária a seleção daquele que mais se adequa aos propósitos de estudos moleculares (CRUICKSHANK, 2002). Genes mitocondriais apresentam uma série de aplicações, sendo largamente implementados na sistemática molecular. O elevado número de cópias, somado a suas funcionalidades e particularidades hereditárias, os tornam especialmente interessantes para análises intraespecíficas, ou entre espécies filogeneticamente mais distantes (CRUICKSHANK, 2002; YANG et al., 2015; DE LIMA et al., 2017).

Extenso levantamento foi realizado por Lv et al. (2014), buscando determinar quais dos marcadores molecular citados acima (16S rDNA, 12S rDNA, COI e ITS2) seria indicado para a identificação de carrapatos pertencentes a ordem Ixodida. Considerando características importantes para que um alvo molecular exerça esta função, as seguintes características foram consideradas: poder de resolução para discriminação de espécies; grau de eficiência de primers usualmente utilizados; tamanho do fragmento, o que determina o número de reações de sequenciamento necessárias, e facilidade de alinhamento de múltiplas sequências de um mesmo gene, sem a geração de resultados ambíguos. Os resultados obtidos evidenciaram a superioridade dos genes mitocondriais 16S rDNA e COI para a identificação de carrapatos perante os outros marcadores moleculares testados (MANGOLD et al., 1998; LV et al., 2014). Suas implicações práticas na identificação e análise filogenética em diversos grupos de carrapatos fundamenta tal observação, sendo usualmente necessária a obtenção de sequências destas regiões para se alcançar os objetivos almejados (OGRZEWALSKA et al., 2012, 2014; LITERAK et al., 2015; RAMOS et al., 2015; MUÑOZ-LEAL et al., 2017; ZERINGÓTA et al., 2017; LUZ et al., 2018a, 2018b; MACHADO et al., 2018; RIVERA-PÁEZ et al., 2018). Como pode-se verificar, por exemplo, no estudo filogenético de carrapatos da espécie *Amblyomma parvum*. Através de sequências de 16S rDNA, foi possível esclarecer a relação deste importante carrapato Neotropical com espécies correlatas (*A. auricularium*, *A. pseudoconcolor* e *A. pseudoparvum*), ressaltando ainda elevada divergência nucleotídica entre exemplares oriundos da Argentina e Brasil, variando de 3,0 a 3,7% entre si (NAVA et al., 2008).

O desenvolvimento e popularização da Reação em Cadeia da Polimerase (“Polymerase Chain Reaction” – PCR) e os progressos alcançados no decorrer das últimas décadas possibilitou a implementação da abordagem molecular nas mais diversas áreas da pesquisa (MULLIS, 1990). Na acarologia e no estudo das doenças vetoriais, o sequenciamento de fragmentos genéticos é amplamente utilizado. Esta abordagem propiciou incontestável ampliação no conhecimento acerca da distribuição destes artrópodes e seu potencial vetorial (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). O sequenciamento do genoma completo de *Ixodes scapularis* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* exemplificam a ininterrupta evolução das técnicas moléculas e possibilitam melhor compreensão da sistemática e biologia destes e outros

importantes membros da família Ixodidae (DE LA FUENTE et al., 2016; GULIA-NUSS et al., 2016; BARRERO et al., 2017).

Mas, assim como na seleção do alvo molecular empregado, devemos ter em mente as questões a serem respondidas para a seleção da ferramenta a ser utilizada. Inquestionavelmente, a utilização de kits e metodologias automatizadas disponíveis para o sequenciamento de material genético, facilitou a produção de dados moleculares e análises filogenéticas (CRUICKSHANK, 2002). Porém, fatores como o custo e tempo para execução, bem como a qualificação técnica necessária para sua execução, limitam a ampla implementação destas ferramentas. Tais limitadores afetam principalmente países em desenvolvimento, como o Brasil (HELMY et al., 2016).

Os entraves associados a aquisição e implementação de novas tecnologias em países com baixa condição socioeconômica vêm sendo atualmente considerado no desenvolvimento de soluções inovadoras para diversas circunstâncias. O atual conceito de “inovação frugal” visa justamente a busca de alternativas de produtos, serviços, processos ou modelos de negócios planejados e empregados em configurações de restrição financeira, tecnológica e material. Ao final de tal processo, espera-se encontrar alternativas menos onerosas e suficientemente eficazes para atender as necessidades básicas do “consumidor” (HOSSAIN et al., 2016; HOSSAIN, 2018). No caso de metodologias científicas, tais consumidores seriam representados pelos múltiplos grupos de pesquisa que compartilhem de tal objeto de estudo.

Deve-se ressaltar ainda o agravamento gerado com os recentes cortes de investimento à pesquisa científica no Brasil que afetou praticamente todas as instituições de financiamento brasileiras em nível estadual ou federal. Desta forma, a aquisição e manutenção de equipamentos de laboratório, bem como o custeio de viagens para coletas a campo e obtenção de insumos necessários para execução das pesquisas científicas tornam-se ainda mais desafiadores (GIBNEY, 2015; MOURA & CAMARGO JUNIOR, 2017). Com a restrição orçamentária, o planejamento financeiro dos projetos atuais e futuros devem ser cautelosamente realizados e o desenvolvimento de metodologias alternativas faz-se ainda mais necessário para superar as limitações relacionadas ao sequenciamento de material genético (HELMY et al., 2016).

2.4.1 PCR-RFLP

A técnica de Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (“Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism” – PCR-RFLP) apresenta-se como uma alternativa para a genotipagem baseada no sequenciamento molecular, sendo empregada em diversas situações. Fundamenta-se na detecção de polimorfismo de mononucleotídeos (“Single Nucleotide Polymorphism” – SNP) e multinucleotídeos (“Multi-Nucleotide Polymorphism” – MNP), que estão usualmente associados ao ganho ou perda de sítios de reconhecimento das enzimas de restrição (NARAYANAN, 1991). Esta técnica é composta por múltiplas etapas, incluindo o desenvolvimento/seleção de primers para amplificação do alvo molecular de interesse, detecção de enzimas de restrição apropriadas, obtenção do produto de PCR, tratamento do produto amplificado com enzimas de restrição e observação dos fragmentos resultantes em eletroforese (BERG, 2012).

A amplificação de fragmentos que contenham regiões polimórficas detectáveis por enzimas de restrição específicas é a primeira etapa para a execução do PCR-RFLP. Uma vez que a presença ou ausência de sítios de restrição enzimáticas resultará na formação de

fragmentos de restrição de tamanhos distintos, a identificação destes pode ser realizada através da revelação dos fragmentos através da eletroforese (BERG, 2012). Tanto o desenvolvimento de primers e reconhecimento de regiões de interesse, como a detecção de enzimas de restrição capazes de promover a diferenciação de regiões polimórficas podem ser inicialmente realizados através de análises *in silico*, havendo ainda a disponibilidade de softwares gratuitos para tal execução (ROZEN & SKALETSKY, 2000; VINCZE et al., 2003). A detecção de uma única enzima de restrição pode ser suficiente para a diferenciação de espécies por PCR-RFLP (RODRIGUES et al., 2014; DOKIANAKIS et al., 2016; HOOSHYAR et al., 2017; TEIMOURI et al., 2018). Entretanto, normalmente a capacidade de diferenciação entre espécies estreitamente relacionadas requer a aplicação de mais de uma enzima de restrição (MEYER et al., 2003; THYSSEN et al., 2005; SANTOLIN et al., 2013; VESTERLUND et al., 2014; RAHIMIAN et al., 2018).

O baixo custo para sua execução, o não requerimento de equipamentos sofisticados para sua implementação e a não obrigatoriedade de treinamento extensivo em laboratório, estão entre as principais vantagens da técnica de PCR-RFLP. Deve-se considerar ainda que o planejamento de protocolos para realização desta técnica não possui elevada complexidade e sua reprodutibilidade é facilmente alcançada em diferentes laboratórios (BERG, 2012).

2.5 Relevância de DTCs para Saúde Humana e Animal

Ameaças recentes a saúde pública, como a influenza aviária, Ebola e Zika, evidenciam a grande relevância que doenças de origem animal emergentes possuem atualmente. Estima-se que cerca de 60% dos agentes infecciosos que acometem seres humanos compartilham desta origem (TAYLOR et al., 2001; JONES et al., 2008; WANG & ANDERSON, 2019). Carrapatos, como ectoparasitas hematófagos de múltiplas espécies de vertebrados, atuam como eixo importante na transmissão de diversas bactérias, vírus e protozoários que acometem o homem e animais. Das mais de 800 espécies atualmente reconhecidas, aproximadamente 10% possuem relevância médica e veterinária, seja pelo dano diretamente causado no momento do repasto sanguíneo, excreção de toxinas juntamente com a saliva, ou transmissão de agentes infecciosos (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; CABEZAS-CRUZ & VALDÉS, 2014; VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015b). Os principais vetores encontram-se taxonomicamente classificados dentro da família Ixodidae, sendo responsáveis pela transmissão de agentes como *Anaplasma phagocytophilum*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, vírus da febre hemorrágica Crimeia-Congo, encefalite viral transmitida por carrapatos, *Rickettsia* spp. e *Babesia* spp. (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; DE LA FUENTE et al., 2017). Contudo, não devemos desconsiderar a relevância de componentes da família Argasidae na transmissão de patógenos, como verificado na associação entre a espécie *Ornithodoros erraticus* e o vírus da peste suína africana (BOINAS et al., 2011).

Mundialmente, a atenção sobre doenças vetoriais e, especificamente as DTCs, aumentou consideravelmente no tocante a saúde pública e bem-estar de animais domésticos e silvestres (DANTAS-TORRES et al., 2012c; MENCKE, 2013; VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015b). Os impactos para saúde humana e animal em decorrência dos processos infecciosos resultantes da relação carrapato-hospedeiro são evidentes e, muitas vezes, incalculáveis. Adicionalmente, os impactos econômicos são também consideráveis e não devem ser ignorados. Estima-se que, no Brasil, aproximadamente US\$3,24 bilhões são anualmente perdidos na produção bovina, apenas pela ação do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os patógenos por eles transmitidos (GRISI et al., 2014).

Muitos destes patógenos foram descritos ou reclassificados no decorrer das últimas duas décadas, o que demonstra que estamos longe da total compreensão das DTCs. A sintomatologia verificada em muitos destes processos infecciosos é muitas vezes moderada e não específica, podendo ser facilmente confundida com outros agentes etiológicos. Por estas razões, possivelmente, DTCs são pouco diagnosticadas na rotina médica, apesar da abundância de carrapatos e hospedeiros reservatórios e amplificadores em muitas regiões (BLANTON, 2019). Os múltiplos fatores que definem a epidemiologia das DTCs, tornam o completo entendimento deste complexo grupo de enfermidades ainda mais difícil.

A circulação das DTCs encontra-se diretamente relacionada a dinâmica populacional humana e animal de determinada região, bem como as interações existentes nesta interface (ESTRADA-PEÑA et al., 2015). As populações de carrapatos resultantes destas interações apresentam capacidade distinta na transmissão de patógenos, o que causará efeito direto na prevalência destes agentes infecciosos (ESTEVE-GASSENT et al., 2016). A introdução de animais domésticos em novo ambiente, por exemplo, pode auxiliar na disseminação de carrapatos e DTCs. Estes viabilizam a interação entre populações que, em condições naturais, não teriam contato, promovendo o alcance de tais patógenos a novos nichos bióticos (ESTRADA-PEÑA et al., 2015).

Modificações na biodiversidade local também refletem diretamente na incidência de DTCs. Maior disponibilidade de espécies vertebradas distintas foram capazes de reduzir a taxa de carrapatos infectados pela bactéria *Borrelia burgdorferi*, por exemplo. Tal fator deve-se a menor relevância do roedor *Peromyscus leucopus*, principal reservatório da espiroqueta, para a conclusão do ciclo biológico do carrapato (OSTFELD & KEESING, 2000; LOGIUDICE et al., 2003; OSTFELD et al., 2018). Em contrapartida, a redução na população de predadores de pequenos mamíferos, como a raposa vermelha (*Vulpes vulpes*), pode promover efeitos em cadeia trófica que facilitam a emergência da enfermidade vetorial. A redução no número de predadores resulta no aumento populacional de reservatórios do micro-organismo, localizado em níveis tróficos inferiores (LEVI et al., 2012).

A análise de fatores climáticos também é capaz de fornecer dados de grande relevância para diversos agravos à saúde humana, animal e do meio ambiente, possibilitando o desenvolvimento de medidas preventivas e corretivas (ZINSSTAG et al., 2018). Esta variável é capaz de afetar diretamente a casuística das doenças vetoriais (WIKEL, 2018). A variabilidade climática interfere diretamente na distribuição e sobrevivência de carrapatos, influenciando ainda a transmissão de agentes infecciosos (GREER et al., 2008; COLWELL et al., 2011). Tais efeitos foram observados na ocorrência de encefalite viral transmitida por carrapatos na Europa, sendo associada com mudanças na distribuição de *Ixodes ricinus* resultante de mudanças climáticas no continente (GRAY et al., 2009). O mesmo pode ser esperado no continente Norte-Americano, com a expansão da distribuição espacial de *I. scapularis* e enfermidades associadas, devido ao aumento da temperatura ambiental (GREER et al., 2008), ou com a espécie *Amblyomma americanum*, também endêmica no continente Norte-Americano e responsável pela transmissão de doenças para humanos e animais (RAGHAVAN et al., 2019). Adicionalmente, reservatórios vertebrados relevantes para a ocorrência de enfermidades vetoriais, como o roedor *Peromyscus leucopus* para *Borrelia* spp., também podem ter sua distribuição territorial expandida, em virtude das mudanças climáticas previstas para os próximos anos (ROY-DUFRESNE et al., 2013).

Questões socioeconômicas e políticas também podem contribuir significativamente para a maior ou menor ocorrência de DTCs, destacando o caráter multifatorial associado a epidemiologia destas enfermidades. Detectou-se a correlação de indicadores de pobreza e o

ressurgimento de encefalite viral transmitida por carrapatos nas regiões Leste e centrais da Europa após o colapso da União Soviética, entre os anos de 1992 e 1993. Sugeriu-se que o maior contato entre pessoas e os vetores deveu-se a diversas razões, como a redução no uso de pesticidas e aumento no desemprego e pobreza (ŠUMILO et al., 2008).

O desenvolvimento de transportes globais mais velozes, a ampliação do comércio internacional e o surgimento de resistência a antiparasitários usualmente implementados para o controle de vetores, somados a questões biológicas e ecológicas previamente citadas, resultam também em oportunidades para o estabelecimento ou aumento de populações vetoriais já instaladas em determinada localidade (COLWELL et al., 2011; DANTAS-TORRES et al., 2012c; IBAÑEZ-JUSTICIA et al., 2017).

Considerando todos os possíveis fatores bióticos e abióticos que interferem diretamente na ocorrência de DTCs, faz-se necessária a realização de levantamentos e estudos interdisciplinares contínuos para melhor compreensão dos fatores ecológicos, fisiológicos e mecanismos genéticos que contribuem para a manutenção destas enfermidades, em um mundo de mudanças constantes (ESTEVE-GASSENT et al., 2016). A geração e interpretação de dados que considerem os vetores e patógenos como parte integrada na comunidade ecológica consistem em etapas fundamentais para a melhor compreensão deste grupo de doenças infecciosas (JOHNSON et al., 2015; ESTEVE-GASSENT et al., 2016; RYU et al., 2017). Contudo, assim como previsto para o controle de outras doenças vetoriais, pode-se afirmar que a correta identificação de espécies de carrapatos é o primeiro passo para prever a disseminação destes ectoparasitas, bem como determinar os agentes por eles albergados (WHO, 2010; DOKIANAKIS et al., 2016). A necessidade de caracterização dos vetores em nível de espécie apresenta-se também como fator determinante para análise de dados acerca das interações carrapato-patógeno-hospedeiro, uma vez que identificações supra específicas podem levar a conclusões incorretas (ESTRADA-PEÑA et al., 2015).

Fatores intrínsecos do carrapato também determinam o seu potencial como agente vetorial de agentes infecciosos. Como detalhadamente descrito por De La Fuente et al. (2017), a variedade de espécies e o número de hospedeiros potenciais que o artrópode entra em contato no decorrer do seu ciclo biológico interferem diretamente na capacidade de aquisição e transmissão de micro-organismos. Adicionalmente, as interações realizadas entre o agente infeccioso e a resposta imunológica do carrapato, bem como sua capacidade de atingir a glândula salivar do artrópode são outros critérios chaves que definem o ciclo de manutenção e transmissão (DE LA FUENTE et al., 2017).

Atualmente, novas inferências vêm sendo feitas também a respeito da microbiota de carrapatos, outro importante fator biótico diretamente relacionado à capacidade de transmissão e manutenção de patógenos dentro de uma população. A coinfeção destes artrópodes pode ter grandes consequências para a viabilidade do vetor e epidemiologia das DTCs (ABRAHAM et al., 2017; GURFIELD et al., 2017). Através de novas metodologias, como o Sequenciamento de Nova Geração (“Next-Generation Sequencing” – NGS) somos capazes de melhor compreender os diversos componentes da microbiota de carrapatos e seu papel na biologia dos ectoparasitas (BONNET et al., 2017; GREAY et al., 2018).

2.6 *Rickettsia* spp.

O termo “*Rickettsia*” foi empregado durante longo período para descrever de forma genérica, bactérias de desenvolvimento intracelular não cultiváveis em meios de cultura axênicos e, conseqüentemente, não caracterizadas adequadamente. Assim sendo, micro-

organismos fastidiosos filogeneticamente distintos foram agrupados (MERHEJ & RAOULT, 2011). A classificação dentro da ordem Rickettsiales, anterior a implementação de ferramentas moleculares, baseava-se em características que incluíam o potencial patogênico para humanos, distribuição geográfica, associação com hospedeiros vertebrados e artrópodes (BEIER-SEXTON et al., 2015). Esta sistemática resultou na inclusão de três famílias distintas nesta ordem: Rickettsiaceae (então composta por componentes dos gêneros *Rickettsia*, *Coxiella*, *Rochalimaea* e *Ehrlichia*); Bartonellaceae (englobando os gêneros *Bartonella*, *Haemobartonella*, *Eperythrozoon* e *Grahamella*), e Anaplasmataceae (composta somente pelo gênero *Anaplasma*) (MERHEJ & RAOULT, 2011; BEIER-SEXTON et al., 2015). Com o avanço tecnológico ininterrupto associado às técnicas moleculares, a classificação taxonômica de micro-organismos é frequentemente revisada. Como resultado, conceitos e relações previamente estabelecidos são modificados. Com a possibilidade de acessar características genéticas, como sequências da região 16S rDNA, foi possível reclassificar micro-organismos que anteriormente pertenciam a ordem Rickettsiales, como o gênero *Eperythrozoon*, reclassificado como *Mycoplasma* spp. (ordem Mycoplasmatales) e *Rickettsiella grylli*, transferido para ordem Legionellales (ROUX et al., 1997; NEIMARK & KOCAN, 2006; SZOKOLI et al., 2016).

A família Rickettsiaceae é atualmente composta apenas pelos gêneros *Rickettsia* e *Orientia*. Este último também exemplifica de forma prática as constantes mudanças taxonômicas, já que ele resulta da reclassificação da bactéria *Rickettsia tsutsugamushi* (TAMURA et al., 1995; SZOKOLI et al., 2016).

O gênero *Rickettsia* (Classe Alphaproteobacteria) é composto por micro-organismos Gram negativos de pequena dimensão (variando de 0,3 a 0,5 μm por 0,8 a 2,0 μm) morfologicamente caracterizadas como cocobacilos e que se desenvolvem obrigatoriamente no interior de células eucarióticas de diversos organismos vertebrados ou invertebrados. Apresentam ainda estreita associação com artrópodes (PAROLA et al., 2013; BEIER-SEXTON et al., 2015). Este gênero bacteriano é caracterizado ainda pelo seu genoma relativamente pequeno (1,1 – 1,5 Mb), como resultado evolutivo do nicho intracelular ocupado por estes micro-organismos (BLANTON, 2019). Curiosamente, verifica-se que as espécies com maior potencial patogênico, quando comparadas as cepas menos virulentas ou espécies não patogênicas, são as que, no decorrer do processo evolutivo, tiveram seu genoma drasticamente reduzido ou degradado. Neste processo, dentre outros componentes do genoma, ocorre a elevada preservação de sistemas toxina-antitoxina, importante fator de virulência do micro-organismo (LOBATO-MÁRQUEZ et al., 2016; DE LA FUENTE et al., 2017).

Destaca-se que mesmo em nível taxonômico hierarquicamente inferior, como na classificação de espécies, há a necessidade de constante atualização quanto ao número de elementos agrupados neste gênero. Atualmente, 32 espécies bem definidas estão listadas no gênero *Rickettsia*, somada a um número crescente de novas espécies ou cepas possivelmente relacionadas e sem descrição completa, validação e/ou cultivo (“List of Taxonomy Names with Standing in Nomenclature” - <http://www.bacterio.net/index.html>) (PARTE, 2018; SHPYNOV et al., 2018). A descrição de novas espécies é usualmente baseada no sistema proposto por Fournier et al. (2003), sendo este considerado o mais adequado e empregado atualmente. Para ser considerado um componente do gênero *Rickettsia*, um isolado deve apresentar sequências de 16S rDNA e gene Citrato Sintase (*glbA*) com identidade $\geq 98,1\%$ e $\geq 86,5\%$, respectivamente, com ao menos uma espécie pré-existente (FOURNIER et al., 2003). Contudo, análise filogenética mais abrangente, a partir do alinhamento do genoma bacteriano de diversos componentes da ordem Rickettsiales, ressaltou a possibilidade de drástica redução no número de espécies atualmente reconhecidas dentro do gênero *Rickettsia*, evidenciando novamente os

desafios para a classificação taxonômica deste grupo (CHUNG et al., 2018). O potencial patogênico dentre muitas destas espécies é inexistente ou desconhecido. Contudo, sabe-se que ao menos 15 espécies do gênero são capazes de causar danos diretos a saúde humana e animal (BEIER-SEXTON et al., 2015; BLANTON, 2019), como *R. rickettsii*, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *R. akari*, *R. felis*, *R. conorii* e *R. sibirica*, por exemplo (LABRUNA et al., 2011b; PAROLA et al., 2013; BEIER-SEXTON et al., 2015; DELISLE et al., 2016; BLANTON, 2019).

Ainda acerca da classificação de espécies deste gênero, devemos novamente considerar que o número limitado de características fenotípicas disponíveis para este fim. Primariamente, o grupamento de espécies de *Rickettsia* foi realizado de acordo com características bioquímicas, morfológicas e reatividade antigênica cruzada, o que dividia as espécies em dois grupamentos: grupo tifo (“Typhus Group” – TG), que engloba os agentes infecciosos *R. prowazekii* (agente etiológico do tifo epidêmico e vetorizado por piolhos) (BLANTON, 2019) e *R. typhi* (agente etiológico do tifo murino e vetorizado por pulgas) (RAUCH et al., 2018) e grupo febre maculosa (“Spotted Fever Group” – SFG), que compreende o maior número de espécies de interesse para a saúde humana e animal, dentre os quais *R. conorii* (agente etiológico da febre maculosa do Mediterrâneo vetorizada por carrapatos) (GOMEZ-BARROSO et al., 2019) e *R. rickettsii* (agente etiológico da febre maculosa brasileira/das montanhas rochosas vetorizado por carrapatos) (POLO et al., 2018). Posteriormente, Stothard et al. (1994) basearam-se nas sequências dos genes 16S rDNA e 23S rDNA das espécies *R. rickettsii*, *R. prowazekii* e *R. bellii* para a proposição de grupamento ancestral (“Ancestral Group” – AG), composto pelas espécies *R. bellii* e *R. canadenses*. Tal grupamento seria o resultado de divergências que antecederam a separação de SFG e TG, justificando a nomenclatura utilizada (STOTHARD et al., 1994; SHPYNOV et al., 2018). Considerando ainda dados genômicos de *R. felis* e a presença de plasmídeo conjugativo (pRF), sugeriu-se ramificação taxonômica adicional, com a criação do grupo transicional (“Transitional Group” – TRG), composto pelas espécies *R. felis* e *R. akari* (GILLESPIE et al., 2007). Estes pertenciam previamente ao SFG, mesmo que associados a pulgas e ácaros, respectivamente. Embora não tenha ocorrido uma ampla aceitação desta última classificação (MERHEJ & RAOULT, 2011), os quatro grupamentos vêm sendo considerados em estudos recentes (BEIER-SEXTON et al., 2015; CHUNG et al., 2018; BLANTON, 2019). Através do sequenciamento da região 16S rDNA e quatro genes codificadores de proteína (gene D, *gltA*, *ompA*, *ompB*) seria possível caracterizar os componentes de TG, SFG e AG (FOURNIER et al., 2003). Contudo, como este sistema de classificação precedeu a descrição do grupamento transicional, este ainda não possui critérios para classificação (CHUNG et al., 2018). Destaca-se desta forma a necessidade de atualização constante dos sistemas de identificação, de acordo com o aprimoramento taxonômico e descrição de novas espécies.

Embora tenham sido inicialmente reportados no início do século XX, juntamente com o papel vetorial de carrapatos (RICKETTS, 1909), informações completas acerca da biologia, patogênese e interação com hospedeiros vertebrados e artrópodes ainda não estão totalmente disponíveis. É evidente que, através da implementação de ferramentas moleculares, foi possível compreender alguns dos diversos fatores que afetam a epidemiologia e ocorrência do processo infeccioso como a correta identificação do micro-organismo (CHUNG et al., 2018) e distribuição geográfica de agentes infecciosos (PAROLA et al., 2013), fatores de virulência relevantes para o estabelecimento do processo (ELLISON et al., 2008) e interações relevantes para o processo evolutivo do gênero (OGATA et al., 2006).

É importante destacar, contudo, que os avanços verificados nas últimas décadas não se devem exclusivamente ao emprego de novas metodologias moleculares. Como previsto por Labruna et al. (2004a), referindo-se a baixa variabilidade de membros do gênero *Rickettsia* reportados na América do Sul, o número de espécies reconhecidas até aquele momento era

consequência do baixo número de levantamentos ecológicos conduzidos no continente. Anterior ao ano 2000, destaca-se que apenas a espécie *R. rickettsii*, agente etiológico da FMB, havia sido reportado em associação a carrapatos *Amblyomma cajennense sensu lato* e *A. aureolatum* no Brasil e demais países do continente sul-americanos (LABRUNA, 2009).

No momento do repasto sanguíneo de carrapatos, este importante agente zoonótico é transmitido pela via transcutânea, sendo posteriormente fagocitado por células dendríticas e transportado para linfonodos locais, através da via linfática. Após a replicação neste sítio, os micro-organismos podem acessar a circulação sanguínea e disseminar para outros órgãos. Sua patogênese está associada ao tropismo deste micro-organismo por células endoteliais de hospedeiros vertebrados, resultando em vasculite e posteriormente, devido a multiplicação intracelular, ruptura da junção entre células endoteliais e consequente formação de lacunas intracelulares. O aumento resultante da permeabilidade vascular pode cursar com quadros de erupção cutânea, edema e, devido a progressão e agravamento, podemos verificar a ocorrência de pneumonia intersticial, meningoencefalite, injúria renal aguda, falha múltipla de órgãos e óbito (WALKER, 2007; CHEN & SEXTON, 2008; MANSUETO et al., 2012; BLANTON, 2019).

Levantamentos ecológicos tornam-se especialmente relevantes ao considerarmos a epidemiologia e complexidade associada a enfermidades zoonóticas vetoriais. Através do conhecimento da capacidade vetorial, bioecologia e distribuição geográfica dos carrapatos associados a transmissão da FMB, é possível planejar medidas de prevenção e controle efetivas (LABRUNA et al., 2011b; DANTAS-TORRES et al., 2012c; PAROLA et al., 2013). A soma de tais levantamentos com metodologias de detecção e identificação mais eficazes, resulta ainda na descrição de novas espécies em território nacional, ampliando o número de *Rickettsia* spp. associadas a carrapato em nosso país (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016).

2.6.1 Gênero *Rickettsia* no Brasil

Após o início do século XXI, um número crescente de espécies vem sendo reportadas em território brasileiro, destacando que o número de bactérias do gênero *Rickettsia* presentes e seu possível impacto a saúde humana e animal são potencialmente maiores do que o inicialmente esperado (LABRUNA, 2009).

A bactéria *Rickettsia felis* foi a primeira a ampliar a lista de espécies descritas em nosso país. Reportada no estado de São Paulo em associação com *Ctenocephalides* spp., esta espécie é tradicionalmente associada com pulgas (BOUYER et al., 2001; HORTA et al., 2006a). Contudo, outros artrópodes já foram previamente reportados albergando esta bactéria, incluindo os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma humerale* (OLIVEIRA et al., 2008; SOARES et al., 2015). Diversas lacunas ainda existem acerca da patogênese desta bactéria, embora ela já esteja consolidada dentre as espécies de interesse para a saúde humana e animal do gênero *Rickettsia* (BROWN & MACALUSO, 2016).

A espécie *Rickettsia amblyommatis* foi proposta e aceita apenas em 2016, com base em dados moleculares complementares. Previamente, na literatura científica, esta foi denominada ‘*Candidatus Rickettsia amblyommii*’. Sua associação foi inicialmente reportada em *Amblyomma americanum*, com posterior confirmação de ampla distribuição no hemisfério ocidental, estando normalmente em associação com carrapatos deste gênero (KARPATY et al., 2016). No Brasil, esta espécie foi primeiramente reportada em *A. cajennense sensu lato* e *A. coelebs* coletados no estado de Rondônia (RO) (LABRUNA et al., 2004c). Baseado em resultados sorológicos e escaras no local de inoculação por carrapatos *A. americanum*, o

potencial patogênico desta bactéria foi sugerido nos EUA (BILLETER et al., 2007; APPERSON et al., 2008). Tal suspeita foi também levantada no Brasil, no estado de Pernambuco (PE) (SILVA et al., 2018). Em território brasileiro, através de estudos posteriores, verificou-se a detecção deste micro-organismo em espécies como *A. auricularium*, *A. geayi*, *A. longirostre* e *A. pseudoconcolor* (OGRZEWALSKA et al., 2010; LUGARINI et al., 2015; LUZ et al., 2017a; SILVA et al., 2018).

Também sendo reportada por Labruna et al. (2004a), a espécie *Rickettsia bellii* destacou-se pela detecção em cinco espécies de carrapato, oriundos de áreas ecológicas distintas e ciclos biológicos diversos, incluindo a predileção de hospedeiros vertebrados. Componente do grupo ancestral, este micro-organismo já foi associado a 16 espécies de carrapatos no Brasil e 28 no Novo Mundo (LUZ et al., 2018c; ABREU et al., 2019). E embora observações sugestivas tenham sido previamente realizadas (OGATA et al., 2006), esta é considerada não patogênica para humanos e animais (KRAWCZAK et al., 2018). Esta espécie poderia, em contrapartida, desempenhar um importante papel na ecologia e epidemiologia de riquetsias sabidamente patogênicas, como será abordado em seção posterior (MACALUSO et al., 2002; SAKAI et al., 2014).

No ano de 2005, a partir da amplificação e sequenciamento dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB* em exemplar adulto de *Haemaphysalis juxtakochi* de vida livre originário de RO, foi possível detectar a presença de bactéria estreitamente associada com *Rickettsia rhipicephali*, denominada *Rickettsia* strain R300 (LABRUNA et al., 2005a). Posteriormente, através de outro exemplar da mesma espécie coletado no estado de São Paulo (SP), ocorreu o isolamento e obtenção de dados moleculares adicionais (LABRUNA et al., 2007b) e, com base nos critérios propostos por Fournier et al. (2003) para a descrição de novas espécies de *Rickettsia*, foi possível afirmar que ambos os exemplares albergavam a espécie *R. rhipicephali*. Consecutivamente, através de levantamentos ecológicos em carrapatos de aves, houve a detecção deste micro-organismo em 40% (31/77) dos *Amblyomma* sp. haplótipo Nazaré (atualmente denominado *A. romarioi*) avaliados em estudo reportado por Zeringóta et al. (2017). Embora o impacto para a saúde humana e animal em infecções naturais seja indeterminado, alterações clínicas em *Microtus pennsylvanicus* foram descritas a partir da infecção experimental, utilizando isolados recuperados de *Rhipicephalus sanguineus*, com a ocorrência ocasional de óbitos (BURGDORFER et al., 1975).

Analisando a presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma triste* oriundos do estado de SP, Silveira et al. (2007) reportaram pela primeira vez a presença de *R. parkeri* no Brasil. Em outros países da América do Sul, esta bactéria demonstrou associação com carrapatos *A. aureolatum*, *A. ovale* e membros do complexo *Amblyomma maculatum*: *A. maculatum*, *A. tigrinum* e *A. triste*. Existem relatos deste agente em países como Uruguai, Argentina, Bolívia e Peru (ESTRADA-PEÑA et al., 2005; NIERI-BASTOS et al., 2018). Classificado como um agente infeccioso emergente, sua patogenicidade foi confirmada em humanos, podendo cursar com quadros de febre moderada, linfadenopatia e presença de escaras (STRAILY et al., 1991; PADDOCK et al., 2004). No Brasil, três casos clínicos associados a agente denominado '*R. parkeri* strain Atlantic Rain Forest' foram reportados entre os anos de 2010 e 2016, cursando com a presença de escaras no local de inoculação (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011; KRAWCZAK et al., 2016). Outras variantes genéticas de *R. parkeri* foram adicionalmente detectadas em *A. nodosum* (*R. parkeri* strain NOD) (OGRZEWALSKA et al., 2009a). O potencial patogênico reconhecido destas espécies, somado a maior complexidade em decorrência do número de variedades genéticas, ressalta a necessidade de continuidade dos estudos ecológicos que busquem melhor compreender as associações e distribuição de *R. parkeri*. O resultado de estudos aprofundados considerando tais espécies pode

ser representado pela recente descrição de ‘*Candidatus Rickettsia paranaensis*’, previamente considerada uma variedade de *R. parkeri* (strain ApPR) (PACHECO et al., 2012). Análises filogenéticas de múltiplos alvos moleculares demonstrou o agrupamento desta espécie com demais componentes do Velho Mundo (*R. africae* e *R. sibirica*), justificando a descrição da nova espécie (PECKLE et al., 2019).

A descrição de *Rickettsia monteiroi* ocorreu a partir da detecção e isolamento do micro-organismo de exemplares adultos de *Amblyomma incisum* coletados em vida livre no estado de SP (PACHECO et al., 2011). A partir da amplificação e sequenciamento de diversas regiões gênicas (*gltA*, *htrA*, 16S rDNA e *scal*), foi possível correlacionar esta nova espécie com ‘*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*’ e *R. canadenses*. Sua patogenicidade para vertebrados é desconhecida.

A espécie *Rickettsia asebonensis* foi inicialmente reportado no Quênia, associada a diversas espécies de pulga (JIANG et al., 2013), havendo relatos posteriores em diversos países, incluindo no Brasil, em *Ctenocephalides felis* obtidas a partir de cães domésticos (SILVA et al., 2017). Contudo, surpreendentemente, a primeira publicação relatando a ocorrência desta espécie em nosso país envolvia um exemplar de *Rhipicephalus sanguineus*, e não em associação com pulgas (DALL’AGNOL et al., 2017). Embora um genótipo desta espécie tenha sido detectado em amostra sanguínea de primata (*Macaca fascicularis*) a patogênese desta bactéria ainda não foi determinada, havendo a necessidade de estudos adicionais (TAY et al., 2015).

Alguns dos micro-organismos detectados em associação com carrapatos ainda não tiveram todas as suas características biológicas descritas, sendo inicialmente reportados como candidatos de espécie (‘*Candidatus*’). A obtenção de cultivo celular adequado para estas bactérias é um dos fatores determinantes para a execução de estudos biológicos e genéticos mais aprofundados acerca destes agentes, possibilitando sua ascensão ao nível de espécie (FERRARI et al., 2013). A detecção de ‘*Candidatus Rickettsia andeanae*’ em exemplares de *Amblyomma parvum* oriundos de regiões brasileiras distintas, nos estados do Mato Grosso do Sul (MS) e Piauí (PI), sugerem que a relação entre este endossimbionte e populações do artrópode haviam sido previamente estabelecidas (NIERI-BASTOS et al., 2014). Tal observação é corroborada pela posterior percepção de que esta bactéria está presente em outras regiões e espécies de carrapatos no Brasil (LUGARINI et al., 2015; WITTER et al., 2016). Este micro-organismo de patogenicidade desconhecida foi inicialmente reportado no Peru (BLAIR et al., 2004), tendo o reconhecimento de sua distribuição geográfica rapidamente expandido para outros países do continente americano (JIANG et al., 2012). Nos EUA, por exemplo, sugere-se que a elevada prevalência desta espécie promove a exclusão de *R. parkeri*, ressaltando possíveis implicações epidemiológicas (PADDOCK et al., 2015).

Reportada inicialmente a partir de exemplares de *Amblyomma dissimile* em associação com iguanas (*Iguana iguana*), a bactéria ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’ foi primariamente descrita na Colômbia (MIRANDA et al., 2012), com posterior detecção em território brasileiro. Este micro-organismo foi novamente associado a *A. dissimile* nos estados do Amapá (AP) (LUZ et al., 2018c) e Pará (PA) (OGRZEWALSKA et al., 2019). Embora seu potencial patogênico não tenha sido determinado, análises filogenéticas sugerem que esta bactéria pertença a mesma linhagem de *R. tamurae* e *R. monacensis*, espécies sabidamente patogênicas (JADO et al., 2007; IMAOKA et al., 2011).

Outro componente deste gênero bacteriano foi reportado durante a realização de levantamento ecológico considerando carrapatos de vida livre em Minas Gerais (MG). Neste

estudo, detectou-se a presença de bactéria denominada ‘*Rickettsia* sp. strain Pampulha’ em nove exemplares de *Amblyomma dubitatum*. Análises filogenéticas ressaltaram a correlação deste novo micro-organismo apenas com espécies reportadas no Velho Mundo, sugerindo tratar-se de uma nova espécie (ALMEIDA et al., 2011). Embora sua patogenicidade seja desconhecida e tenha sido reportada exclusivamente neste estudo, a ocorrência de parasitismo em humanos por esta espécie de carrapato e seu resultante potencial de transmissão não deve ser desconsiderada (LABRUNA et al., 2007a; ALMEIDA et al., 2011).

O aumento no número de espécies reconhecidas na América do Sul não está restrito ao nosso país, havendo também a ampliação de conhecimento relacionados a associação carrapatos-*Rickettsia* em países vizinhos ao nosso (LABRUNA, 2009; PAROLA et al., 2013). Na Argentina, empregando ferramentas moleculares para a detecção deste gênero bacteriano em carrapatos de cães, foi possível detectar a presença de *R. massiliae* em 20% das amostras avaliadas (CICUTTIN et al., 2004 apud CICUTTIN et al., 2014). Esta espécie já teve seu potencial patogênico comprovado, promovendo agravos a saúde humana e animal (GARCÍA-GARCÍA et al., 2010; BEELER et al., 2011). Adicionalmente, na Guiana Francesa, o endossimbionte ‘*Candidatus Rickettsia wissemannii*’, foi reportado em associação com carrapatos *Ornithodoros hasei* coletados de morcegos. Este micro-organismo apresenta correlação filogenética com a espécie não-patogênica *R. peacockii* (TAHIR et al., 2016). Como ocorreu com outras espécies atualmente reconhecidas em nosso território, a capacidade de detecção de *Rickettsia* spp. descritas em países da América do Sul devem ser também consideradas, uma vez que estes micro-organismos, seus vetores e hospedeiros vertebrados podem facilmente cruzar fronteiras territoriais (PAROLA et al., 2013; POLO et al., 2018).

Este número crescente de novas espécies ou cepas de *Rickettsia* reportadas em associação com carrapatos no Brasil, amplia paralelamente a listagem de potenciais patógenos emergentes para humanos e animais. Até o presente momento, contudo, apenas as espécies *R. rickettsii* e ‘*R. parkeri* strain Atlantic Rain Forest’ tiveram sua relevância epidemiológica comprovada no Brasil (LABRUNA et al., 2011b; SZABÓ et al., 2013b; NIERI-BASTOS et al., 2018). Deve-se ressaltar, porém, que o real impacto deste gênero frente a saúde humana e animal seja subestimado. A ausência de sintomatologia clínica específica, somada ao desconhecimento acerca das riquetsioses entre os profissionais da saúde faz com que as suspeitas diagnósticas sejam direcionadas para enfermidades mais comumente observadas, como dengue e leptospirose (DANTAS-TORRES et al., 2012c; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016; BLANTON, 2019).

Aprimorar nosso conhecimento a respeito da distribuição e patogênese das espécies presentes em nosso país, bem como os carrapatos associados a elas, são fundamentais para o controle e prevenção das enfermidades associadas (DANTAS-TORRES et al., 2012c), uma vez que estratégias como a vacinação animal e humana ainda estão em desenvolvimento e não são opções disponíveis no presente momento (ALHASSAN et al., 2018).

2.6.2 Levantamentos ecológicos/epidemiológicos com enfoque em *Rickettsia* spp.

O reconhecimento de agentes até então desconhecidos possibilita o que denominamos “descrição de patógenos reversa”, onde potenciais agentes etiológicos são detectados anterior a sua associação com quadros infecciosos com humanos e animais (PAROLA et al., 2013; TIJSSE-KLASSEN et al., 2014). Este fenômeno já foi descrito entre membros do gênero *Rickettsia*, como *R. felis*, *R. massiliae* e *R. parkeri* (BEIER-SEXTON et al., 2015). A possibilidade de emergência destes micro-organismos, como patógenos de relevância para a saúde humana e animal justifica a realização de inquéritos epidemiológicos e levantamentos

ecológicos que visem compreender as interações decorrentes da relação hospedeiro-carrapatos-micro-organismo (DANTAS-TORRES et al., 2012c).

Anterior a introdução de testes moleculares e mesmo após sua aplicação disseminada em riquetsiologia, metodologias sorológicas fornecem informações de grande relevância referentes a presença de *Rickettsia* em diferentes circunstâncias (BEZERRA et al., 2017; PORTILLO et al., 2017; ABDAD et al., 2018; BLANTON, 2019). A reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é a mais amplamente utilizada para este fim, onde soro sanguíneo de animais selvagens/domésticos ou humanos são diluídos de forma seriada, anterior a adição e incubação de antígenos preparados a partir de cultura de célula de *Rickettsia* spp. fixadas em lâmina de microscopia (as espécies *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali* e *R. bellii* são as mais comumente utilizadas). Após a incubação, realiza-se a lavagem para remoção de anticorpos não fixados e as lâminas são novamente incubadas com marcadores fluorescentes apropriados. Determina-se, então, a titulação do soro sanguíneo frente a cada preparação de antígeno. O propósito desta técnica é identificar os possíveis antígenos envolvidos em uma reação homóloga, sugerindo o agente responsável pela soroconversão, bem como sua presença no ambiente estudado (RAMACHANDRAN et al., 2017; ABDAD et al., 2018). Apesar de sua aparente simplicidade, a execução e interpretação destes testes requer elevado nível de habilidade técnica e acesso as preparações antigênicas padrão. Tais limitações contribuíram para a gradual redução no uso destas técnicas na maioria dos inquéritos epidemiológicos. Entretanto, sua contribuição na ampliação de nosso conhecimento acerca da ecologia e epidemiologia das enfermidades transmitidas por carrapatos, e principalmente para o diagnóstico das riquetsioses em hospedeiros vertebrados, é inquestionável (BIGGS et al., 2016; PORTILLO et al., 2017; ABDAD et al., 2018; BLANTON, 2019). Animais domésticos são frequentemente testados neste tipo de inquérito epidemiológico, devido a maior exposição destes aos possíveis vetores. Publicações prévias empregaram amostras de cães (PINTER et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2013; COSTA et al., 2015, 2017b) e equinos (TAMEKUNI et al., 2010; VIEIRA et al., 2018a) para execução destes estudos, embora espécimes obtidos de animais silvestres (PACHECO et al., 2007; GRUHN et al., 2019) e humanos também já tenham sido empregados (PINTER et al., 2008; BEZERRA et al., 2017).

Técnicas moleculares para o estudo ecológico de *Rickettsia* no Brasil tornaram-se predominantes nas últimas duas décadas, sendo muitas vezes a única ferramenta empregada para detecção e caracterização deste gênero bacteriano. É possível afirmar que os estudos com abordagem molecular foram responsáveis por muitos dos novos dados correlacionando este gênero bacteriano a carrapatos nos últimos 15 anos (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Este modelo de estudo fornece informações de interesse que podem ser diretamente aplicadas na determinação de risco para a saúde humana e animal, com o reconhecimento de regiões endêmicas para agentes com potencial patogênico (ESTRADA-PEÑA et al., 2015). Estes ectoparasitas podem ser coletados quando em vida livre (LABRUNA et al., 2004a, 2004c, 2007b), ou parasitando diversos perfis de hospedeiros vertebrados. Estudos prévios averiguaram mamíferos silvestres (LABRUNA et al., 2004a; DANTAS-TORRES et al., 2012a, 2012b; MCINTOSH et al., 2015; COSTA et al., 2017a; MOERBECK et al., 2018) e domésticos (COSTA et al., 2017b; VIEIRA et al., 2018b), aves (OGRZEWALSKA et al., 2009b; TOLESANO-PASCOLI et al., 2010; LUGARINI et al., 2015; LUZ et al., 2017a; ZERINGÓTA et al., 2017), anfíbios (HORTA et al., 2015; LUZ et al., 2018c) e répteis (OGRZEWALSKA et al., 2019), salientando as variadas relações ecológicas possíveis nos complexos ciclos biológicos dos carrapatos. A presença e transmissão de *Rickettsia* nas diferentes regiões do Brasil e sua associação com carrapatos e nossa fauna diversificada deve ser ainda mais abordada, objetivando identificar o potencial de vetorização de agentes etiológicos de interesse.

A detecção e caracterização do gênero *Rickettsia* através de seu material genético possui sensibilidade, especificidade e tempo de execução requerido satisfatórios para serem empregadas em amostras clínicas e ambientais (artrópodes) (PORTILLO et al., 2017). No caso de carrapatos, após a extração de DNA total do parasita, este é utilizado como molde para reações de detecção dos genes *gltA* (LABRUNA et al., 2004a) e *htrA* (LABRUNA et al., 2004a; SANTOLIN et al., 2013). Amostras positivas nesta triagem inicial são submetidas a novos ensaios moleculares, sendo almejada a amplificação dos genes *ompB* (ROUX & RAOULT, 2000) e *ompA* (LABRUNA et al., 2004a). Este protocolo de detecção e caracterização encontra-se instituído na área de riquetsiologia, com poucas sugestões de alterações, como a adição de regiões 16S rDNA e *sca4* (gene D) para diferenciação das espécies (FOURNIER et al., 2003; ABDAD et al., 2018).

A técnica de PCR convencional é frequentemente utilizada para detecção de DNA de *Rickettsia* spp., mas outras metodologias moleculares foram desenvolvidas e aprimoradas também com este fim (LUCE-FEDROW et al., 2015). Reações de nested-PCR foram desenhadas, por exemplo, para a detecção de *Rickettsia* SFG em amostras clínicas, com o objetivo de ampliar a sensibilidade e especificidade analíticas das reações, com base no gene *ompB* (CHOI et al., 2005). Entretanto, o maior risco de contaminação no decorrer da execução deste tipo de metodologia não deve ser ignorado (PORTILLO et al., 2017). A técnica de PCR quantitativa (“Quantitative PCR” – qPCR), também denominada PCR em tempo real, foi inicialmente desenvolvida para a detecção simultânea de *R. prowazekii* e *Borrelia recurrentis*, agentes etiológicos de interesse para saúde humana que compartilham o mesmo vetor (*Pediculus humanus*) (JIANG et al., 2003). Outros protocolos foram desenhados também para detecção de micro-organismos do gênero, bem como para identificação específica de *R. rickettsii* (KATO et al., 2013). De maneira mais abrangente, há ainda a descrição de painel para detecção dos principais patógenos transmitidos por carrapatos de relevância para saúde animal, incluindo novamente a espécie *R. rickettsii* (SHEN et al., 2018). Adicionalmente, com a implementação de ferramentas que permitem a avaliação do genoma de organismos, novos modelos para a sistemática e caracterização de *Rickettsia* spp. vêm sendo sugeridos (SHPYNOV et al., 2018).

A utilização de técnicas mais modernas é amplamente utilizada em países desenvolvidos, especialmente ao considerarmos o diagnóstico de enfermidades. Técnicas como o qPCR são consideradas financeiramente acessíveis, tendo seu uso extensamente difundido (RENVOISÉ et al., 2012). No Brasil e em outros países em desenvolvimento, onde possivelmente o impacto gerado pelas DTCs é subestimado (LABRUNA, 2009; PAROLA et al., 2013) e potencialmente superior ao verificado em países desenvolvidos, devemos considerar algumas limitações intrínsecas às condições socioeconômicas regionais para execução de pesquisas científicas (HELMY et al., 2016). Considerando o elevado número de carrapatos usualmente coletados em estudos a campo, a implementação de ferramentas moleculares pode tornar-se um fator limitante para levantamentos em larga escala. Tal observação deve-se à soma de fatores como o custo para processamento, nível de tecnificação e tempo necessários para execução e análise dos dados gerados (SANTOLIN et al., 2013; HELMY et al., 2016).

Com o intuito de reduzir alguns destes entraves, muitos estudos ambientais realizam a junção de múltiplas amostras nos denominados “pools”, o que possibilita a determinação da taxa de infecção mínima (LABRUNA et al., 2004c; BERRADA et al., 2011; MIRANDA et al., 2012; SPOLIDORIO et al., 2012; RAMOS et al., 2015; LUZ et al., 2018c; MACHADO et al., 2018; MOERBECK et al., 2018). Contudo, este tratamento da amostragem obtida impossibilita a rastreabilidade e obtenção de dados adicionais referentes aos carrapatos positivos neste “pool”

de exemplares. Uma possível implicação desta prática pode ser verificada no primeiro relato de ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’ por Luz et al. (2018c). Esta bactéria foi detectada em um “pool” de 10 larvas identificadas como *Amblyomma* spp. e, através da amplificação e sequenciamento da região 16S rDNA (MANGOLD et al., 1998), foi possível alcançar a identificação de *A. dissimile*, informação compatível com outros relatos da literatura (MIRANDA et al., 2012; OGRZEWALSKA et al., 2019). Contudo, este dado poderia ser perdido, caso mais de uma espécie de *Amblyomma* estivesse presente nesta junção de exemplares.

Em microbiologia, a elaboração de metodologias alternativas para identificação molecular é interessante, mesmo para micro-organismos cultiváveis em meios de cultura axênicos. A utilização de enzimas de restrição para genotipagem de fungos, bactérias e protozoários de interesse médico e veterinário, por exemplo, é extensamente abordada na literatura (SILVESTER et al., 2017; RAHIMIAN et al., 2018; KORDALEWSKA et al., 2019). Sendo também verificada para a caracterização das espécies de *Rickettsia* associadas a carrapatos e descritas em território brasileiro (SANTOLIN et al., 2013). Com os alvos moleculares *htrA* (sob a ação das enzimas *MspI* e *RsaI*) e *ompB* (sob a ação das enzimas *MspI* e *RsaI*), foi possível caracterizar os nove componentes do gênero descritos no Brasil, até aquele momento. A aplicabilidade desta metodologia se mostrou eficaz em extensos levantamentos ecológicos posteriores (LUZ et al., 2017b, 2018c; ZERINGÓTA et al., 2017). Entretanto, como previamente mencionado, houve um aumento expressivo no número de espécies deste gênero bacteriano associadas a carrapatos e reportadas no Brasil e em países fronteiriços posterior ao desenvolvimento deste protocolo (CICUTTIN et al., 2004 apud CICUTTIN et al., 2014; NIERI-BASTOS et al., 2014; TAHIR et al., 2016; DALL’AGNOL et al., 2017; LUZ et al., 2018c; PECKLE et al., 2019). A atualização do protocolo de digestão, considerando estas novas espécies reportadas possibilitará a implementação continuada da técnica de PCR-RFLP em levantamentos ecológicos futuros.

2.7 Interações Microbianas Relacionadas à DTCs

Ao considerarmos as relações estabelecidas entre vetores, agentes infecciosos associados e hospedeiros vertebrados suscetíveis, verificamos os múltiplos fatores que interferem na ocorrência e estabelecimento de DTCs (ESTRADA-PEÑA et al., 2017b; WIKEL, 2018; CABEZAS-CRUZ et al., 2019). Contudo, outro importante ponto vem sendo adicionado nos últimos anos, ampliando ainda mais a complexidade destas relações: o papel da microbiota de carrapatos na competência vetorial de micro-organismos patogênicos (ESTEVE-GASSENT et al., 2016).

Em humanos, dentre outras funções, sabe-se que a população microbiana do organismo interfere em funções metabólicas, promove proteção contra patógenos e atua de forma associada com nosso sistema imunológico, afetando direta e indiretamente nossas funções fisiológicas. Assim sendo, a interação entre os diferentes componentes da nossa microbiota é capaz de modular a saúde humana (GOODRICH et al., 2014; SHREINER et al., 2015). Esta percepção da complexidade e relevância dos agentes microbianos associados a outros organismos animais, incluindo artrópodes vetoriais, foi facilitada com o advento e implementação de novas tecnologias, tais como o NGS (HAWLENA et al., 2013; VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015b; GREAY et al., 2018).

Acredita-se atualmente que o melhor entendimento acerca da microbiota de artrópodes pode fornecer subsídios para melhor compreendermos a sobrevivência de vetores e transmissão de patógenos, impulsionando a geração de novas estratégias de controle (NARASIMHAN et

al., 2014; ESTRADA-PENÑA et al., 2017b; CABEZAS-CRUZ et al., 2018). Adicionalmente, como previamente explanado, a detecção de micro-organismos albergados por carrapatos, anterior a comprovação de seu potencial patogênico, já foi reportado para espécies de *Rickettsia* spp. e outros agentes infecciosos (TIJSSE-KLASSEN et al., 2014; BEIER-SEXTON et al., 2015). A denominada descrição de patógenos reversa pode ganhar novas dimensões a partir do conhecimento completo da comunidade microbiana presente nestes artrópodes. Tal fator torna-se especialmente relevante, uma vez que múltiplas variáveis podem ampliar a exposição de hospedeiros suscetíveis (humanos e animais) a vetores, resultando na emergência de novos patógenos nos próximos anos (DANTAS-TORRES et al., 2012c; ESTRADA-PENÑA et al., 2015; VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015a).

Os modelos teóricos e experimentais para detecção molecular dos micro-organismos vetorizados por carrapatos são normalmente limitados a um número reduzido de agentes de maior relevância epidemiológica para determinada região. A utilização de primers específicos, desenvolvidos a partir de sequências conhecidas, objetivam muitas vezes a detecção de gêneros ou espécies específicas, limitando a detecção de coinfeção (CABEZAS-CRUZ et al., 2018). Esta limitação pode ser exemplificada com relatos de coinfeção envolvendo micro-organismos do gênero *Rickettsia*, onde a ocorrência de múltiplos agentes em um mesmo exemplar de carrapato é apenas esporadicamente reportada. A percepção de que exemplares de *Dermacentor variabilis* (WIKSWO et al., 2008; CARMICHAEL & FUERST, 2010) oriundos dos EUA e *Amblyomma ovale* (SZABÓ et al., 2013a) originário do Brasil pudessem albergar mais de uma espécie bacteriana deste gênero. Este evento foi inicialmente sugerido pela verificação de picos duplos em diversos pontos do eletroferograma, indicando a presença de mais de um amplicon no produto sequenciado. Uma vez que as reações empregadas (*gltA* e *htrA*) são específicas para todos os membros do gênero *Rickettsia* spp., a determinação das espécies envolvidas foi possível apenas após etapas posteriores, onde identificou-se a presença de *R. bellii* e *Rickettsia* SFG nos carrapatos citados (WIKSWO et al., 2008; CARMICHAEL & FUERST, 2010).

Ao considerarmos isoladamente o gênero *Rickettsia* e as múltiplas espécies que podem estar simultaneamente infectando carrapatos, pouco se sabe a respeito da função deste grupo de micro-organismos na fisiologia do artrópode e interações resultantes de sua presença. Relatos prévios evidenciam que as espécies com maior potencial virulento podem promover efeitos deletérios ao ectoparasita, como a redução na eficiência reprodutiva, oviposição e taxa de sobrevivência do artrópode (LABRUNA et al., 2011a; NIERI-BASTOS et al., 2013; SAKAI et al., 2014). Em contrapartida, sugere-se que a presença de bactérias deste gênero com menor grau de patogenicidade é capaz de inibir a transmissão vertical de micro-organismos com maior grau de virulência para gerações posteriores (BURGDORFER & HAYES, 1981; MACALUSO et al., 2002; SAKAI et al., 2014; PADDOCK et al., 2015). Embora tal inibição possa não ser somente resultado da coinfeção e sim a combinação de fatores múltiplos (TELFORD, 2009).

As interações microbianas, contudo, não se limitam apenas a membros de um mesmo gênero. Outros componentes da microbiota do carrapato afetam diretamente na instalação e manutenção de patógenos de interesse nas gerações atuais e futuras do vetor (ESTRADA-PENÑA et al., 2017b; CABEZAS-CRUZ et al., 2018). No carrapato *Ixodes scapularis*, por exemplo, verifica-se a influência da microbiota intestinal do artrópode na capacidade de colonização de *Borrelia burgdorferi*. A prevalência de gêneros como *Rickettsia*, *Thioclava* e *Delftia* promove uma ação deletéria para a manutenção da espiroqueta responsável pela Doença de Lyme (NARASIMHAN et al., 2014). Agentes sabidamente patogênicos também promovem alterações na microbiota e fisiologia do vetor. Budachetri et al. (2018), evidenciaram modificações resultantes da presença de *R. parkeri* em *Amblyomma maculatum* em análise comparativa entre carrapatos infectados e não infectados por esta espécie bacteriana. A

presença da riquetsia reduziu a quantidade do endossimbionte *Francisella*-like, um dos principais componentes da microbiota do vetor, promovendo ainda um aumento na regulação de selenoproteínas que protegem contra danos do estresse oxidativo (BUDACHETRI et al., 2018). Evidencia-se também as alterações promovidas na microbiota intestinal de carrapatos *Ixodes scapularis*, pela presença de *Anaplasma phagocytophilum*, o que amplia a eficácia da infecção e manutenção do agente etiológico da anaplasmoose granulocítica no vetor (ABRAHAM et al., 2017).

A partir de tais observações é possível concluir que a ocorrência de DTCs relaciona-se com múltiplas interações, não sendo estas limitadas apenas ao hospedeiro vertebrado e vetor. Ao adicionarmos a esta equação, os mecanismos associados aos patógenos e demais componentes da microbiota do artrópode, percebemos que a epidemiologia das doenças vetoriais depende de diversas variáveis (VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015b; ESTRADA-PEÑA et al., 2017b; CABEZAS-CRUZ et al., 2019). Somente através de uma abordagem integrada, que considere os diversos fatores relacionados a estas enfermidades, poderemos determinar os riscos e medidas preventivas e de controle estratégicas para redução dos impactos à saúde humana e animal (DANTAS-TORRES et al., 2012c; VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015a).

Devido a particularidades das doenças vetoriais, sua epidemiologia torna-se usualmente mais complexa do que o verificado para enfermidades infecciosas não transmitidas por vetores. Embora considerável avanço tenha sido alcançado nos últimos anos, como resultado de novas tecnologias e estudos ecológicos/epidemiológicos mais abrangentes, é possível afirmar que ainda estamos longe de compreender o papel de todos os agentes interferentes para a maior ou menor ocorrência de DTCs. Inquestionavelmente, os estudos a campo fornecem subsídios para o progresso da ixodologia e riquetsiologia em nosso país e a continuidade destes com enfoque nos diferentes hospedeiros vertebrados e biomas presentes no Brasil é fundamental para obtenção de novas respostas. Contudo, considerando limitações orçamentárias para realização de pesquisa em países em desenvolvimento, a elaboração de metodologias otimizadas que visem a redução dos custos e mantenham a qualidade dos resultados obtidos torna-se particularmente interessante. Adicionalmente, analisando o crescente número de espécies de carrapatos reportadas e descritas no território brasileiro, bem como bactérias do gênero *Rickettsia*, a atualização de sistemas de caracterização previamente instituídos faz-se necessária. Devemos ainda pensar nas interações decorrentes desta pluralidade de espécies, formulando alternativas que comecem a esclarecer os impactos resultantes para a saúde humana e animal.

CAPÍTULO I

DESENVOLVIMENTO E AVALIAÇÃO DA TÉCNICA DE PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO EM NÍVEL DE ESPÉCIE DE MEMBROS DO GÊNERO *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) ASSOCIADAS A AVES EM REGIÃO DE MATA ATLÂNTICA NO BRASIL

RESUMO

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Desenvolvimento e Avaliação da Técnica de PCR-RFLP para Identificação em Nível de Espécie de Membros do Gênero *Amblyomma*, Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) Associadas a Aves em Região de Mata Atlântica no Brasil.** 2019. 21p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Carrapatos ixodídeos compõem a maior parcela das espécies de carrapatos reportadas no Brasil, incluindo 33 representantes do gênero *Amblyomma*. O complexo ciclo heteróxico diversificado de muitas destas espécies, somado a fauna de animais vertebrados em nosso país de dimensões continentais são apenas alguns dos desafios apresentados para melhor compreensão da bioecologia deste grupo de parasitas. Mesmo ao considerarmos os grandes avanços alcançados nos últimos anos em decorrência dos numerosos estudos ecológicos publicados na área de ixodologia abrangendo diversos perfis de hospedeiros, ainda existem muitas lacunas a serem preenchidas. Dentre os principais fatores limitantes para os contínuos avanços desta área, verificamos as dificuldades na identificação morfológica de espécimes recuperados, principalmente em fases imaturas (larvas e ninfas). Ferramentas moleculares vêm sendo empregadas como uma alternativa para esta limitação, mas o custo de técnicas baseadas em sequenciamento molecular torna-se um outro entrave quando avaliamos um número grande de espécies, sendo necessário o desenvolvimento de ferramentas menos onerosas. A partir de levantamento de dados disponíveis acerca dos genes usualmente implementados para identificação de ixodídeos, realizou-se a análise *in silico* para seleção de enzimas de restrição com capacidade discriminatória dentre as espécies consideradas. A partir de 603 sequências do gene mitocondrial 16S rDNA foi possível distinguir por análise computacional todas as espécies selecionadas, empregando as enzimas *VspI* e *DraI*, com um total de 80 combinações de padrões de banda previstos. Uma validação preliminar da metodologia foi executada através da utilização de material genético de espécies variadas disponíveis em nossa coleção e 200 exemplares de carrapatos imaturos obtidos de aves e previamente identificados em estudos a campo anteriores. Adicionalmente, 300 exemplares imaturos de mesma origem, porém sem a prévia identificação, foram também submetidos ao protocolo de PCR-RFLP e posteriormente submetidos ao sequenciamento molecular para confirmação dos resultados. A correta identificação dos espécimes avaliados, através do protocolo reportado, comprova a aplicabilidade da metodologia. A técnica de PCR-RFLP apresenta-se como uma alternativa menos onerosa e mais rápida para a caracterização molecular de carrapatos ixodídeos reportados no Brasil, possibilitando a continuidade dos estudos ecológicos necessários para a melhor compreensão destes importantes agentes vetoriais.

Palavras-chave: Ixodídeos, *Amblyomma*, 16S rDNA, PCR-RFLP, Identificação

ABSTRACT

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Development and evaluation of the PCR-RFLP technique for species-level identification of members of the genus *Amblyomma*, Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) associated with birds in the Brazilian Atlantic Rain Forest.** 2019. 21p. Thesis. (Doctorate in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Ixodid ticks represent the largest portion of the tick species reported in Brazil, including 33 representatives of the genus *Amblyomma*. The diverse and complex heterogeneous cycle of several of these species, added to the vertebrate fauna available in our country of continental dimensions are just some of the challenges presented to achieve a better understanding on the bioecology of this ectoparasite group. Even considering the major advances made in recent years as a result of the numerous ecological studies published in the field of ixodology, assessing various host profiles, there are still some gaps to be filled. Among the main limiting factors for the continuous advances in this area, it is possible to highlight difficulties associated with the morphological identification of recovered specimens, especially in immature stages (larvae and nymphs). Molecular tools have been employed as an alternative methodology overcome this limitation, but the cost of molecular sequencing techniques becomes another obstacle when evaluating a large number of specimens. Based on this, the development of less expensive tools is necessary. After a survey on the available data about the genes usually implemented for the identification of ixodids, *in silico* analysis was performed to choose restriction enzymes with discriminatory potential among the species reported in Brazil. Using 603 sequences of the 16S rDNA mitochondrial gene, it was possible to distinguish by computer analysis all selected species, implementing the enzymes *VspI* and *DraI*, with a total of 80 predicted band patterns combinations. A preliminary validation of the methodology was performed using genetic material from multiple species available in our collection, and 200 specimens of immature ticks captured from birds and already identified in previous studies. Additionally, 300 immature specimens from the same origin, but without previous identification, were also submitted to the PCR-RFLP protocol and subsequently identified by molecular sequencing to confirm the results. The correct identification of all the evaluated specimens through the reported protocol, proves the applicability of the methodology. The PCR-RFLP technique is introduced as a less expensive and faster alternative for the molecular characterization of ixodid ticks reported in Brazil. This allows the continuity of the ecological studies necessary to achieve a better understanding of these important vector agents.

Keywords: Ixodids, *Amblyomma*, 16S rDNA, PCR-RFLP, Identification

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são artrópodes hematófagos e parasitam ampla gama de hospedeiros vertebrados, incluindo humanos, animais silvestres e domésticos (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; PAROLA et al., 2013; SZABÓ et al., 2013b; DE LA FUENTE et al., 2017). Mundialmente distribuídos, sabe-se que das mais de 800 espécies atualmente reconhecidas, aproximadamente 10% possuem relevância médica e veterinária, seja pelo dano diretamente causado no momento do repasto sanguíneo, excreção de toxinas juntamente com a saliva, ou pela ação vetorial de diversos agentes microbianos que afetam hospedeiros suscetíveis (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; CABEZAS-CRUZ & VALDÉS, 2014; VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015b). Tal impacto para saúde pública pode ser potencialmente ampliado nos próximos anos, ao considerarmos a ocorrência de doenças infecciosas emergentes. Verificou-se nas últimas décadas que aproximadamente 60% destes agentes patogênicos apresentavam origem animal e 22,8% enquadram-se como enfermidades vetoriais (JONES et al., 2008). Assim, carrapatos e seus complexos ciclos biológicos, que normalmente envolvem múltiplos hospedeiros vertebrados, podem funcionar como pontes entre diferentes nichos ecológicos, resultando na emergência de novos patógenos.

Considerações acerca da bioecologia, distribuição geográfica e capacidade de carreamento e transmissão de micro-organismos, representam dados relevantes para a predição e prevenção das enfermidades transmitidas por estes artrópodes. A predileção ou mesmo restrição a determinados grupos de hospedeiros e biomas encontram-se diretamente relacionados a relevância e o potencial de transmissão de agentes infecciosos (ESTRADA-PEÑA et al., 2017b). Adicionalmente, fatores comportamentais, como a agressividade de determinadas espécies, relacionada a busca por hospedeiros humanos, ampliam o potencial de transmissão e relevância para saúde pública. Na América do Sul, por exemplo, relatos de parasitismo em humanos são usualmente relacionados a membros da família Ixodidae, direcionando o enfoque de muitos dos estudos nesta área (GUGLIELMONE et al., 2006; GUGLIELMONE & ROBBINS, 2018).

Em território brasileiro, carrapatos desta família compõem a maior parcela das espécies reportadas, com representantes do gênero *Amblyomma* (33 espécies), *Dermacentor* (1 espécie), *Haemaphysalis* (3 espécies), *Ixodes* (9 espécies) e *Rhipicephalus* (2 espécies) (GIANIZELLA et al., 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019; MARTINS et al., 2019). A descrição e o relato de novas espécies e o reconhecimento de complexos de espécies estreitamente relacionadas nos últimos anos, evidenciam o dinamismo desta área e a relevância dos levantamentos ecológicos e ferramentas moleculares em complementação aos métodos de identificação tradicionalmente empregados (NAVA et al., 2010a, 2014; DANTAS-TORRES et al., 2012b; BARROS-BATTESTI et al., 2015; LADO et al., 2018).

O aprimoramento e execução de levantamentos de vetores consiste em uma das ações centrais para a redução dos riscos e impactos de enfermidades vetoriais, como previsto pelo “Global Vector Control Response 2017-2030” (WHO, 2017). Nos últimos anos, buscando melhor compreender as relações parasito-hospedeiro e os consequentes riscos para ocorrência de DTCs, muitos estudos executados tiveram enfoque na captura e coleta de carrapatos a partir de animais silvestres (LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017; TORRES et al., 2018; GRUHN et al., 2019; OGRZEWSKA et al., 2019). Sabe-se, contudo, que a caracterização

de exemplares em nível de espécie consiste em um dos pontos chave para a avaliação de dados acerca das relações entre carrapatos-patógenos-hospedeiros vertebrados. A determinação de níveis taxonômicos supra-específicos pode resultar em conclusões errôneas, dificultando ainda a comparação de dados obtidos em regiões geográficas distintas (ESTRADA-PENÑA et al., 2015).

Esta limitação é rotineiramente observada ao lidarmos com carrapatos em estágios imaturos, como os usualmente obtidos a partir de aves (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). A manutenção e desenvolvimento de larvas e ninfas ingurgitadas em laboratório, facilitando a discriminação morfológica dos exemplares obtidos consiste em uma das estratégias para suplantar esta limitação (LABRUNA et al., 2007c; OGRZEWALSKA et al., 2009b). Adicionalmente, a descrição de chave de caracterização morfológica de ninfas de *Amblyomma* spp. buscou solucionar parte deste entrave (MARTINS et al., 2010). Entretanto, a caracterização limitada ao nível de gênero para grande parcela das amostras reportadas em estudos mais recentes destaca a necessidade de soluções adicionais para esta problemática (MARTINS et al., 2014; LUGARINI et al., 2015; MATURANO et al., 2015). Especialmente ao considerarmos o potencial de aves na disseminação de vetores e agentes patogênicos associados, impactando diretamente na epidemiologia de DTCs (SCOTT et al., 2001, 2016; LACHISH et al., 2012; PALOMAR et al., 2012; HASLE, 2013; PAROLA et al., 2013; SÁNDOR et al., 2014) e o reconhecimento de que a maior parcela das espécies de carrapato em associação com aves em território brasileiro foi também reportada parasitando hospedeiros humanos (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016; GUGLIELMONE & ROBBINS, 2018).

O advento e implementação de metodologias moleculares para correta identificação de carrapatos foi um dos elementos responsáveis para o esclarecimento das interações entre este grupo de ectoparasitas e aves (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Esta abordagem baseia-se, habitualmente, na amplificação e sequenciamento de alvos como 16S rDNA (MANGOLD et al., 1998), 12S rDNA (BEATI et al., 2012), COI (HEBERT et al., 2004) e ITS2 (MCLAIN et al., 1995; ZAHLER et al., 1995), com posterior análise comparativa com bancos de dados disponíveis. Embora esta alternativa metodológica tenha sido amplamente empregada durante os últimos anos, o custo de técnicas de sequenciamento molecular pode ser considerado ainda um empecilho para países em desenvolvimento, como o Brasil (HELMY et al., 2016). A recente redução de financiamento para pesquisa científica atualmente em curso no país amplifica esta limitação, podendo resultar na interrupção desta e outras importantes áreas de interesse para saúde humana e animal (GIBNEY, 2015; MOURA & CAMARGO JUNIOR, 2017).

Objetivando solucionar esta restrição, o presente estudo propõe, através de análises em bioinformática e validação *in vitro*, um protocolo de caracterização molecular baseado em PCR-RFLP para identificação de carrapatos ixodídeos descritos no Brasil, com maior enfoque nas espécies usualmente registradas parasitando aves. Busca-se, assim, uma metodologia alternativa ao sequenciamento molecular rotineiramente empregado para este fim.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Levantamento de Bancos de Dados Moleculares

Considerando as espécies de ixodídeos reportadas no Brasil (Quadro 1), realizou-se o levantamento de informação disponível através do banco de dados de sequências gênicas GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (CLARK et al., 2016). Para o presente levantamento foram considerados os alvos moleculares usualmente empregados na caracterização de ixodídeos: as regiões mitocondriais 16S rDNA, 12S rDNA e COI, bem como a região nuclear ITS2. As informações obtidas foram tabeladas e armazenadas em formato FASTA, para posterior análise. Empregando ainda a ferramenta on-line “Basic Local Alignment Search Tool” (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) (ALTSCHUL et al., 1990), foi possível detectar sequências depositadas e não recuperadas através da ferramenta de busca padrão. Aditivamente, para sequências de COI, foi acessado ainda o “Barcode of Life Data System” (BOLD System) (<http://v3.boldsystems.org/>) (RATNASINGHAM & HEBERT, 2013). Dados oriundos de estudos anteriores e disponíveis no banco de dados interno do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LMBM), Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) foram também consultados.

Quadro 1. Espécies de carrapato ixodídeos previamente reportadas em território brasileiro e consideradas no presente estudo

<i>Amblyomma</i> spp. (33)	<i>A. latepunctatum</i>	<i>A. sculpturatum</i>	<i>Ixodes</i> spp. (9)
<i>A. aureolatum</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>A. sculptum</i>	<i>I. amarali</i>
<i>A. auricularium</i>	<i>A. naponense</i>	<i>A. tigrinum</i>	<i>I. aragaoi</i>
<i>A. brasiliense</i>	<i>A. nodosum</i>	<i>A. triste</i>	<i>I. auritulus</i>
<i>A. cajennense s. s.</i>	<i>A. oblongoguttatum</i>	<i>A. varium</i>	<i>I. fuscipes</i>
<i>A. calcaratum</i>	<i>A. ovale</i>	<i>A. yucumense</i>	<i>I. longiscutatus</i>
<i>A. coelebs</i>	<i>A. paca</i>		<i>I. loricatus</i>
<i>A. dissimile</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Dermacentor</i> spp. (1)	<i>I. luciae</i>
<i>A. dubitatum</i>	<i>A. parvum</i>	<i>D. nitens</i>	<i>I. paranaensis</i>
<i>A. fuscum</i>	<i>A. pictum</i>		<i>I. schulzei</i>
<i>A. geayi</i>	<i>A. pseudoconcolor</i>	<i>Haemaphysalis</i> spp. (3)	
<i>A. goeldii</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>H. cinnabarina</i>	<i>Rhipicephalus</i> spp. (2)
<i>A. humerale</i>	<i>A. romitii</i>	<i>H. juxtakochi</i>	<i>R. sanguineus</i>
<i>A. incisum</i>	<i>A. rotundatum</i>	<i>H. leporispalustris</i>	<i>R. microplus</i>

Implementando posteriormente o software Sequencher[®] versão 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann. Arbor, MI, EUA), promoveu-se o alinhamento das sequências armazenadas, de acordo com as espécies. Estas foram então avaliadas e corrigidas manualmente, sendo

possível a detecção e exclusão de sequências muito curtas ou com grande quantidade de nucleotídeos ambíguos, que indicassem baixa qualidade da sequência inserida no banco de dados.

Concluído o levantamento foi possível verificar que as sequências da região mitocondrial 16S rDNA possuíam o maior número de representantes dentre as espécies consideradas, sendo o marcador molecular selecionado para as análises posteriores.

2.2 Digestão Enzimática *in silico*

Tendo como base para a avaliação o produto de PCR com aproximadamente 460 pb obtido a partir da utilização dos iniciadores oligonucleotídeos descritos por Mangold et al., (1998), realizou-se a seleção das sequências que melhor representassem cada uma das espécies de carrapato consideradas no presente estudo. Assim, através do software Sequencher[®] versão 5.4.6, foram adicionados os nucleotídeos dos primers 16S rRNA forward (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T-3') e 16S rRNA reverse (5'-GCT CAA TGA TTT TTT AAA TTG CTG T-3') nas extremidades dos representantes escolhidos, editando-os manualmente apenas quando necessário. Obteve-se, desta forma, dados *in silico* que refletem os produtos obtidos após a execução da PCR.

A seguir, aplicando o painel de enzimas de restrição disponível no mesmo software, foi realizada a triagem *in silico* para determinação de enzimas com potencial discriminatório dentre as espécies de ixodídeos listadas no quadro 1. Priorizou-se a seleção de enzimas que possuíssem ao menos um sítio de clivagem no maior número de espécies consideradas no presente levantamento, com resultante geração de fragmentos de tamanho suficiente para discriminação interespecífica em gel de agarose. Fez-se necessário ainda determinar o grau de preservação dos sítios de ação das enzimas selecionadas em nível intraespecífico, frente as sequências disponíveis para cada unidade taxonômica. Tal informação foi obtida através do software gratuito MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>) (KUMAR et al., 2016), onde sequências de uma mesma espécie foram alinhadas e, através da ferramenta de busca do programa, os sítios de ação das enzimas pré-selecionadas foram pesquisados e destacados simultaneamente em todas as sequências alinhadas. Assim, foi possível determinar a ocorrência de polimorfismo que resultasse no ganho e/ou perda de sítios de ação e consequente modificação no perfil de bandas resultante.

2.3 DNA de Carrapatos para Validação do Protocolo

Objetivando validar os resultados obtidos através da análise *in silico*, amostras de DNA mantidas na Coleção de Ácidos Nucléicos de Artrópodes do LMBM/DPA/UFRRJ, foram empregadas. Pretendeu-se nesta etapa abranger o maior número possível de espécies distintas, empregando material genético de exemplares já identificados através do sequenciamento molecular. Foram incluídos na presente validação representantes de *Amblyomma aureolatum*, *A. auricularium*, *A. brasiliense*, *A. cajennense sensu stricto*, *A. calcaratum*, *A. coelebs*, *A. dubitatum*, *A. geayi*, *A. humerale*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. parkeri*, *A. parvum*, *A. romarioi*, *A. romitii*, *A. sculptum*, *A. triste*, *A. tigrinum*, *A. varium*, *Dermacentor nittens*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Ixodes* spp. oriundo de ave, *Rhipicephalus sanguineus* e *R. (Boophilus) microplus*.

Adicionalmente, amostras de DNA (n = 200) oriundas de estudos ecológicos previamente executados foram utilizadas, simulando a aplicação do protocolo de identificação em estudos a campo. Tais amostras foram identificadas através do sequenciamento molecular, no decorrer dos projetos prévios. Estas foram obtidas a partir de estudos ecológicos em aves no

Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – MG, entre os anos de 2014 e 2015 (SISBIO – protocolo número 29268) (ZERINGÓTA et al., 2017), bem como do Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Parque Nacional de Itatiaia – RJ, entre os anos de 2014 e 2015 (IBAMA – processo número 43917/3/2505369) (LUZ et al., 2017b). O executor da técnica não teve acesso ao código de identificação original de cada exemplar, assim como sua origem, impossibilitando a rastreabilidade e conhecimento prévio da identidade dos exemplares avaliados.

Uma terceira etapa da validação do protocolo consistiu na utilização de amostras de carrapatos em estágio imaturo (larvas e ninfas) oriundos de aves e não identificados previamente. Estes exemplares, totalizando 300 carrapatos (coletados entre 2015-2017 em aves no Jardim Botânico da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) – MG, (SISBIO – protocolo número 29268) ou do Parque Nacional de Itatiaia – RJ, (IBAMA – processo número 43917/3/2505369), foram submetidos a extração de DNA total pelo método bead-beater/fenol-clorofórmio, como descrito por Santolin et al. (2013). Apenas após a obtenção destes resultados, as amostras foram então submetidas ao sequenciamento molecular para confirmação das identificações obtidas por PCR-RFLP.

2.4 Amplificação da região 16S rDNA

A produção de amplicon para posterior digestão foi realizada a partir da implementação dos iniciadores 16S rRNA forward/16S rRNA reverse (MANGOLD et al., 1998), com a geração de produto esperado de aproximadamente 460 pb. As reações de PCR (25 µl), contendo 2,5 µl de Tampão Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Brasil), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 10 pmoles de cada primer, 0,5 U de Platinum Taq DNA Polymerase e 2 µl de DNA molde, foram submetidas a termociclagem. As amostras foram inicialmente aquecidas a 94 °C por 5 min para desnaturação da dupla fita de DNA, seguido de 35 repetições de ciclos de desnaturação a 94 °C por 15 s, anelamento a 60 °C por 20 s e extensão a 72 °C por 1 min, finalizando com uma etapa de extensão a 72 °C por 5 min. Em todas as reações, diluições seriadas (1:10, 1:100 e 1:1000) de controle positivo quantificados de *Amblyomma romarioi* (NAZ111) foram utilizadas para garantir o limite de detecção de cada PCR, fornecendo um meio para assegurar a reprodutibilidade dos ensaios. Adicionalmente, incorporou-se ainda dois controles negativos, onde o DNA molde foi substituído pela mesma quantidade de H₂O ultrapura. Uma das amostras negativas foi preparada em ambiente livre de DNA, onde os “Master-mixes” para cada reação de PCR foram confeccionadas e distribuídas. O segundo controle negativo foi finalizado juntamente com a adição de DNA molde em cada microtubo de reação, do lado externo da cabine de preparo. Desta forma, seria possível detectar casos de contaminação durante o processo de preparação da reação de PCR, desconsiderando os resultados então obtidos, e implementando medidas corretivas.

Para análise da amplificação resultante, um total de 5 µl do produto final de cada amostra foi submetido a eletroforese em gel de agarose (1,5%), utilizando o tampão de corrida Tris-Acetato EDTA (TAE) (0,5x = 20 mM Tris base; 10 mM ácido acético; 0,5 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 40 min. A determinação dos tamanhos do produto foi feita através da comparação visual com marcadores de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371, Thermo Scientific). Os géis foram corados por submersão em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), observados e digitalmente registrados em transiluminador. O volume sobressalente de cada reação foi estocado a -20 °C para análises moleculares posteriores.

2.5 PCR-RFLP *in vitro* para Validação do Protocolo

Dentre as enzimas de restrição avaliadas na etapa de digestão *in silico*, decidiu-se pela implementação de *VspI* (AT[^]TAAT) e *DraI* (TTT[^]AAA) em reações monoenzimáticas para identificação de carrapatos ixodídeos reportados em território nacional. Outras enzimas apresentaram aplicações pontuais e serão abordadas posteriormente.

As reações enzimáticas para clivagem de produtos de amplificação de 16S rDNA previamente obtidos ocorreu em um volume final de 12 µl, contendo de 4 a 9 µl do produto de PCR a ser clivado, de acordo com a qualidade da amplificação e intensidade da banda resultante em análise prévia, 1,2 µl do tampão de reação enzimática próprio para cada enzima, 1,2 U da enzima de restrição selecionada e 1,2 µl de soro albumina bovina (0,1 mg/ml), com posterior adição de H₂O ultrapura para alcançar o volume final desejado. As reações foram incubadas a 37 °C durante 3 h. Os padrões de PCR-RFLP resultantes após a digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2,5% com tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE) (44,5 mM Tris base; 44,5 mM borato; 1 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 120 min. O procedimento de coloração e registro dos géis ocorreu como descrito previamente para avaliação dos produtos de PCR.

Objetivando melhor predição do tamanho nos fragmentos resultantes, a análise comparativa foi feita com o auxílio de marcador de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371, Thermo Scientific). Complementarmente, material genético de exemplares previamente caracterizados através do sequenciamento molecular também foram submetidos à amplificação e digestão enzimática, objetivando um segundo parâmetro de comparação e determinação dos fragmentos obtidos pós-digestão. Foram usadas amostras de *Amblyomma calcaratum*, *A. brasiliense*, *A. longirostre*, *A. romarioi* e *A. parkeri*, devido a reconhecida população de ectoparasitas presente nas regiões de origem dos carrapatos empregados na validação. Estas amostras serviram ainda como controles de qualidade da reação de digestão, assegurando o desempenho enzimático e clivagem satisfatória do material genético.

As imagens resultantes foram avaliadas visualmente e com o auxílio do software Gel Analyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>) (SKOSYREV et al., 2013), empregando o marcador de peso molecular como parâmetro para a calibração do software e posterior predição dos tamanhos de fragmentos visualizados.

3 RESULTADOS

O levantamento por sequências representativas das espécies de ixodídeos reportadas no Brasil, considerando os alvos 16S rDNA, 12S rDNA, COI e ITS2, evidenciou que dados referentes a subunidade maior do ribossomo mitocondrial estão presentes não somente em quantidade superior, como também abrangem a maior variedade de espécies consideradas no presente estudo, totalizando 45/48 (93,75%) destas. Para os outros marcadores moleculares mitocondriais 12S rDNA e COI foi possível obter, respectivamente, sequências representativas para 70,83 (34/48) e 64,58% (31/48) das espécies. Considerando a região nuclear ITS2, apenas 50% (24/48) espécies foram localizadas nos bancos de dados consultados.

Um total de 603 sequências de 16S rDNA foram avaliadas. Das espécies avaliadas no presente levantamento, apenas representantes de *Amblyomma pictum*, *Haemaphysalis cinnabarina* e *Ixodes paranaensis* não foram localizados nos bancos de dados consultados. Considerando ainda a descrição do complexo *Amblyomma cajennense* (NAVA et al., 2014) e a resultante incerteza dos dados depositados anteriores ao reconhecimento deste complexo, foram analisadas apenas sequências de *A. cajennense sensu stricto* inseridas durante ou após o ano de 2015. Ressalta-se ainda que, em virtude do elevado número de sequências depositadas para *Rhipicephalus sanguineus*, foram selecionadas apenas informações oriundas do Brasil. Um fator limitador adicional decorrente das informações disponíveis nos bancos de dados correlaciona-se ao tamanho de fragmentos obtidos para a espécie *A. incisum*, o que impossibilitou a determinação com exatidão dos padrões de banda previstos na avaliação *in silico*. A listagem completa de números de acesso pode ser verificada no ANEXO A.

A partir dos perfis gerados *in silico*, baseados no ganho e/ou perda de sítios de restrição para as enzimas selecionadas, as sequências foram agrupadas. Estes grupamentos foram então nomeados, de acordo com a espécie em questão, seguida por código alfanumérico, onde as letras correspondem ao padrão de bandas esperado para *DraI* e números para *VspI* (Ex.: *Amblyomma aureolatum* – Aure_A1; *Amblyomma ovale* – Oval_A1, Oval_B1 e Oval_B2). Assim, um total de 80 grupos foram organizados ao final da análise *in silico*. Contudo, este número é reduzido para 59, ao desconsiderarmos os grupamentos compostos exclusivamente por dados externos ao Brasil. Os perfis previstos através da análise *in silico* podem ser verificados na Tabela 1.

Tabela 1. Tamanhos de fragmentos previstos após restrição enzimática de produto de PCR do gene 16S rDNA de carrapatos ixodídeos reportados em território nacional

Grupo	Espécie	Padrões de banda (pb)		Enzima de restrição adicional		Modelo	n
		<i>Dra</i> I	<i>Vsp</i> I	Enzima	Padrão de bandas (pb)		
Aure_A1	<i>Amblyomma aureolatum</i>	250, 160, 30, 15	222, 195, 38	<i>Hae</i> III	NC	KF179343	5
Auri_A1	<i>Amblyomma auricularium</i>	245, 193, 15	219, 190, 22, 22	<i>Eco</i> RI	424, 29	MK059463	10
Bras_A1	<i>Amblyomma brasiliense</i>	241, 97, 73, 30, 15	278, 178	<i>Hin</i> fI	NC	MH167938	7
Caje_A1	<i>Amblyomma cajennense s. s.</i>	345, 90, 15	234, 214, 4			MG194733	12
Caje_B1		196, 149, 91, 15	234, 214, 4			KX544819	1
Calc_A1	<i>Amblyomma calcaratum</i>	229, 197, 15, 11	232, 218			KU953953	6
Calc_B1		435, 15	232, 218			KF702342	2
Coel_A1	<i>Amblyomma coelebs</i>	194, 100, 97, 50, 15	238, 218	<i>Alu</i> I	333,123	GQ891948	11
Diss_A1	<i>Amblyomma dissimile</i>	210, 97, 59, 41, 30, 15	232, 175, 41, 4	<i>Dde</i> I	263, 174, 14	MG023156	10
Diss_A2*		210, 97, 59, 41, 30, 15	232, 199, 18, 4	<i>Dde</i> I	263, 174, 14	MH513262	2
Diss_B1*		209, 59, 49, 48, 41, 30, 15	232, 174, 41, 4	<i>Dde</i> I	263, 174, 14	KY389391	3
Dubi_A1	<i>Amblyomma dubitatum</i>	228, 198, 15, 12	222, 153, 72	<i>Nde</i> I	288, 165	GU301913	10
Dubi_A2		228, 198, 15, 12	222, 153, 40, 38	<i>Nde</i> I	288, 165	KU894373	2
Dubi_B1*		241, 200, 15	222, 153, 72	<i>Nde</i> I	288, 165	GU301911	2
Fusc_A1	<i>Amblyomma fuscum</i>	232, 168, 30, 15, 12	235, 178, 44			KU894375	2
Geay_A1	<i>Amblyomma geayi</i>	211, 91, 78, 30, 28, 15	249, 204			KM042851	4
Geay_B2		239, 91, 78, 30, 15	249, 151, 53			MH513264	3
Geay_B3*		239, 91, 78, 30, 15	NC			MK605933	2
Geay_C3		165, 91, 78, 74, 30, 15	NC	<i>Hin</i> fI	NC	EU805566	1
Goel_A1	<i>Amblyomma goeldii</i>	170, 168, 70, 30, 15	231, 193, 29			GQ891950	1
Goel_A2*		170, 168, 70, 30, 15	231, 222			MH513265	2
Hume_A1	<i>Amblyomma humerale</i>	307, 91, 30, 15, 14	188, 178, 42, 30, 19			GQ891952	6
Inci_A1	<i>Amblyomma incisum</i>	160, 151, 97, 30, 15 ou 190, 151, 97, 15	233, 220	<i>Ssp</i> I	177, 125, 166, 35	KM519939	3
Late_A1*	<i>Amblyomma latepunctatum</i>	164, 97, 75, 71, 30, 15	232, 178, 38, 4			MH513271	3
Long_A1	<i>Amblyomma longirostre</i>	242, 91, 78, 30, 15	210, 194, 52	<i>Hin</i> fI	255, 201	KM262207	38
Long_A2		242, 91, 78, 30, 15	265, 193	<i>Hin</i> fI	255, 201	EU805563	10

Napo_A1		178, 168, 65, 30, 15	236, 175, 45	<i>SspI</i>	244, 212	KY020990	3
Napo_A2	<i>Amblyomma naponense</i>	178, 168, 65, 30, 15	204, 175, 45, 24, 4, 4	<i>SspI</i>	244, 212	KY020991	2
Napo_B2		178, 97, 71, 65, 32, 16	207, 175, 45, 32	<i>SspI</i>	244, 212	MK705916	1
Napo_C2*		168, 163, 80, 30, 15	236, 175, 45	<i>SspI</i>	244, 212	MH513278	3
Nodo_A1	<i>Amblyomma nodosum</i>	246, 192, 15	233, 220	<i>EcoRI</i>	345, 107	KX999296	6
Oblo_A1	<i>Amblyomma oblongoguttatum</i>	162, 104, 70, 45, 30, 15, 12, 12, 6	237, 177, 38, 4			FJ424407	1
Oblo_B1*		192, 104, 82, 57, 15, 6	237, 177, 38, 4			MH513279	3
Oblo_B2		192, 104, 70, 57, 15, 11, 6	240, 215			MK704488	1
Oblo_C1*		192, 145, 104, 15	237, 177, 38, 4			MH513282	1
Oval_A1	<i>Amblyomma ovale</i>	243, 169, 30, 15	250, 153, 54	<i>XbaI</i>	355, 103	KU894383	19
Oval_B1		170, 169, 74, 30, 15	251, 153, 54	<i>XbaI</i>	355, 103	KX137898	10
Oval_B2		170, 169, 74, 30, 15	305, 153	<i>XbaI</i>	355, 103	KR605469	1
Oval_C3*		271, 170, 15	222, 153, 54, 27	<i>XbaI</i>	355, 103	MH513284	3
Paca_A1	<i>Amblyomma pacae</i>	267, 170, 15	NC	<i>EcoRI</i>	345, 107	KY020985	5
Park_A1	<i>Amblyomma parkeri</i>	168, 90, 78, 50, 30, 15, 15, 12	178, 152, 128	<i>HinfI</i>	241, 140, 77	JN800431	3
Parv_A1	<i>Amblyomma parvum</i>	162, 138, 110, 30, 15	220, 191, 26, 18	<i>HaeIII</i>	287, 169	MK059468	78
Parv_A2*		162, 138, 110, 30, 15	191, 153, 68, 26, 18	<i>HaeIII</i>	287, 169	EU306138	1
Parv_B1		138, 137, 110, 30, 25, 15	220, 191, 44	<i>HaeIII</i>	287, 169	EU306157	1
Parv_C1*		169, 168, 53, 30, 21, 15	220, 191, 44			KT820307	9
Parv_D1		272, 138, 30, 15	220, 191, 26, 18	<i>HaeIII</i>	287, 169	KT820305	10
Parv_E1		248, 162, 30, 15	220, 191, 26, 18	<i>HaeIII</i>	287, 169	MK059466	1
Pseu_A1*	<i>Amblyomma pseudoconcolor</i>	224, 185, 30, 15	191, 178, 42, 22, 21	<i>HinfI</i>	313, 141	AY628137	4
Roma_A1	<i>Amblyomma romarioi</i>	169, 160, 84, 30, 15	305, 153	<i>SspI</i>	213, 151, 94	KU953954	3
Romi_A1	<i>Amblyomma romitii</i>	236, 91, 77, 29, 15, 6	277, 177	<i>HinfI</i>	378, 77	MH513288	2
Rotu_A1	<i>Amblyomma rotundatum</i>	240, 198, 15	233, 175, 35, 10	<i>SspI</i>	212, 204, 37	MG023152	37
Scal_A1*	<i>Amblyomma scalpturatum</i>	238, 97, 72, 30, 15	277, 175	<i>HinfI</i>	235, 140, 77	MH513291	3
Scul_A1	<i>Amblyomma sculptum</i>	220, 97, 91, 30, 15	237, 212, 4	<i>DdeI</i>	364, 73, 14	MG523424	17
Scul_B1		315, 91, 30, 15	237, 212, 4	<i>DdeI</i>	364, 73, 14	KY172626	3
Tigr_A1	<i>Amblyomma tigrinum</i>	160, 97, 72, 50, 30, 23, 15, 8	NC	<i>HinfI</i>	379, 77	KX434747	32
Tigr_B1		160, 97, 74, 72, 30, 15, 8	NC	<i>HinfI</i>	379, 77	KU285007	1
Tris_A1	<i>Amblyomma triste</i>	161, 97, 80, 72, 30, 15	331, 124			MK059473	68
Tris_B1*		169, 161, 80, 30, 15	331, 124			KU284999	1

Vari_A1	<i>Amblyomma varium</i>	196, 169, 72, 15	232, 220	<i>DdeI</i>	264, 73, 70, 31, 14	KM262204	13
Yucu_A1	<i>Amblyomma yucumense</i>	242, 195, 15	233, 219	<i>EcoRI</i>	Sem digestão	MH282856	5
Nite_A1	<i>Dermacentor nitens</i>	319, 93, 30, 15	NC			KY020994	13
Nite_A2*		319, 93, 30, 27	190, 174, 64, 27			MF353108	2
Juxt_A1*	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	198, 166, 46, 30, 15	276, 169, 10			AY762324	3
Juxt_B2		176, 165, 45, 30, 22, 15	274, 179			MH513302	2
Lepo_A1	<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>	220, 189, 30, 18	243, 211			KU096986	3
Lepo_A2*		220, 189, 30, 16	243, 176, 35			L34309	1
Amar_A1	<i>Ixodes amarali</i>	166, 145, 48, 48, 30, 15	NC			JQ598168	1
Arag_A1	<i>Ixodes aragaoi</i>	273, 121, 48, 15	334, 124			KU894400	11
Arag_B1		395, 48, 15	334, 124			KU894407	7
Iaur_A1*	<i>Ixodes auritulus</i>	233, 130, 48, 30, 15	NC			FJ392274	2
Iaur_B1*		362, 48, 30, 15	NC			MH183252	3
Ifus_A1	<i>Ixodes fuscipes</i>	317, 49, 48, 30, 15	262, 169, 24, 4			KX231832	2
Ifus_B1		363, 48, 30, 15	254, 169, 33			KU894387	1
Ilon_A1	<i>Ixodes longiscutatus</i>	364, 48, 30, 15	279, 178			KX231833	2
Lori_A1	<i>Ixodes loricatus</i>	240, 72, 48, 48, 29, 15	NC			KU894391	10
Luci_A1*	<i>Ixodes luciae</i>	244, 120, 48, 30, 15	NC			MH513305	4
Schu_A1	<i>Ixodes schulzei</i>	312, 48, 48, 30, 15	NC			KU894389	2
Sang_A1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	194, 153, 92, 15	281, 173			KT382448	19
Sang_B2		233, 193, 15, 11	173, 151, 128			KX533942	2
Micr_A1	<i>Rhipicephalus microplus</i>	170, 160, 71, 30, 15, 7	279, 174			EU918178	4

* – Grupamento alfanumérico com exemplares exclusivamente externos ao Brasil

NC – Ausência de sítio de ação para enzima de restrição

Buscando facilitar a implementação do protocolo de identificação de carrapatos baseado na técnica de PCR-RFLP, enzimas de restrição secundárias foram selecionadas. Foi possível determinar a ação exclusiva de algumas enzimas frente a certas espécies, como a atividade de *NdeI* (CA[^]TATG) unicamente verificadas em todas as sequências de *Amblyomma dubitatum* e *XbaI* (T[^]CTAGA) para todos os grupamentos de *A. ovale*. Enzimas adicionais foram também selecionadas de acordo com sua capacidade discriminatória em situações específicas. Os padrões de bandas esperados para *A. aureolatum* (Aure_A1) e *A. parvum* (Parv_E1), por exemplo, são de difícil diferenciação através da eletroforese em gel de agarose. Desta forma, reações adicionais com a enzima *AluI* (AG[^]CT) fornecem um meio independente de sequenciamento molecular para identificação destes exemplares. O mesmo pode ser afirmado para as espécies *A. tigrinum* (Tigr_B1) e *A. geayi* (Geay_C3), onde a aplicação da enzima *EcoRI* (G[^]AATTC) esclarece qualquer dúvida referente a interpretação do gel de agarose e identificação do exemplar. A seleção das enzimas secundárias, suas ações específicas e padrões de banda previstos encontram-se também listados na Tabela 1.

A validação do protocolo a partir da análise *in vitro* foi inicialmente realizado com amostras previamente caracterizadas. Posterior à amplificação do alvo 16S rDNA e ação das enzimas de restrição, foi possível determinar a identidade de espécies do gênero *Amblyomma* previamente associadas ao parasitismo de aves no Brasil, como detalhadamente descrito por Ogrzewalska e Pinter (2016) (Figura 1), e demais espécies deste e outros gêneros ixodídeos (Figura 2), incluindo componentes do complexo *Amblyomma cajennense* reportados em território nacional (MARTINS et al., 2016) (Figura 3). Foi possível ainda avaliar a aplicabilidade de enzimas de restrição secundárias, como a ação de *XbaI*, frente a diferentes amostras de *A. ovale* disponíveis em nossa coleção de ácidos nucléicos (Figura 4).

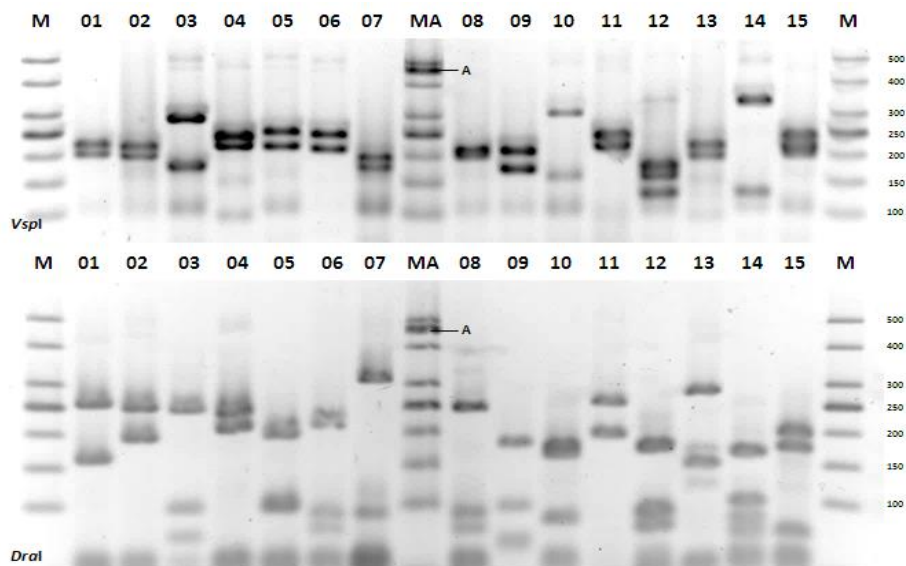


Figura 1. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de espécies do gênero *Amblyomma* previamente reportadas em aves em território nacional. Linhas: 01 – *Amblyomma aureolatum*; 02 – *A. auricularium*; 03 – *A. brasiliense*; 04 – *A. calcaratum*; 05 – *A. coelebs*; 06 – *A. geayi*; 07 – *A. humerale*; 08 – *A. longirostre*; 09 – *A. naponense*; 10 – *A. romarioi*; 11 – *A. nodosum*; 12 – *A. parkeri*; 13 – *A. parvum*; 14 – *A. triste*; 15 – *A. varium*. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M). A = Amplicon não clivado.

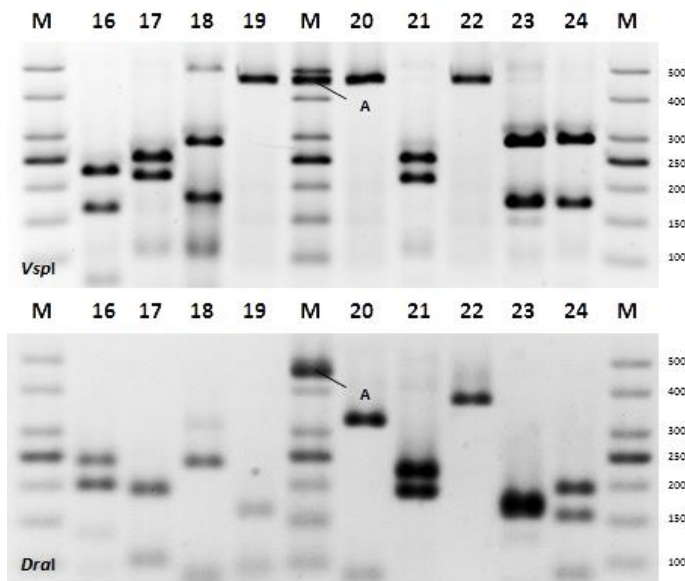


Figura 2. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de espécies do gênero *Amblyomma* e demais gêneros de ixodídeos reportados em território nacional. Linhas: 16 – *Amblyomma dubitatum*; 17 – *A. oblongoguttatum*; 18 – *A. romitii*; 19 – *A. tigrinum*; 20 – *Dermacentor nitens*; 21 – *Haemaphysalis leporispalustris*; 22 – *Ixodes* spp. oriundo de ave; 23 – *Rhipicephalus microplus*; 24 – *Rhipicephalus sanguineus*. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M). A = Amplicon não clivado.

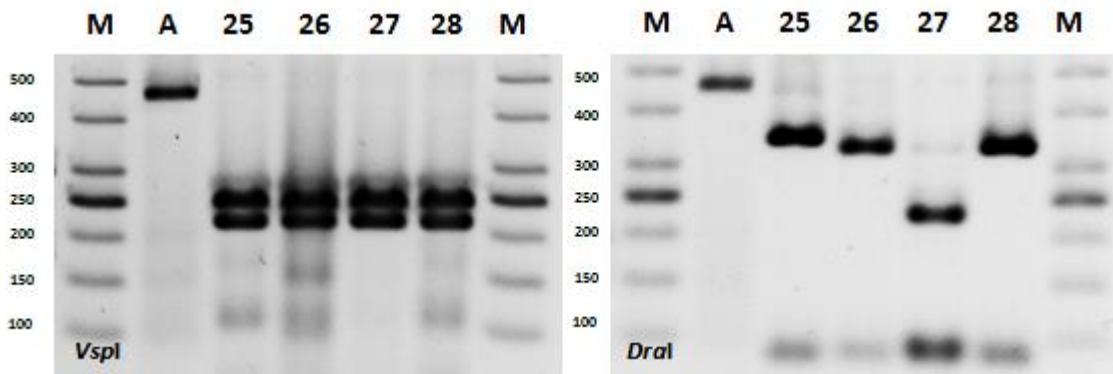


Figura 3. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de componentes do complexo *Amblyomma cajennense* reportados em território nacional. Linhas: A – Amplicon não clivado; 25 – *Amblyomma cajennense sensu stricto*; 26 – *A. sculptum* (L52); 27 – *A. sculptum* (Colônia); 28 – *A. sculptum* (L80). Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

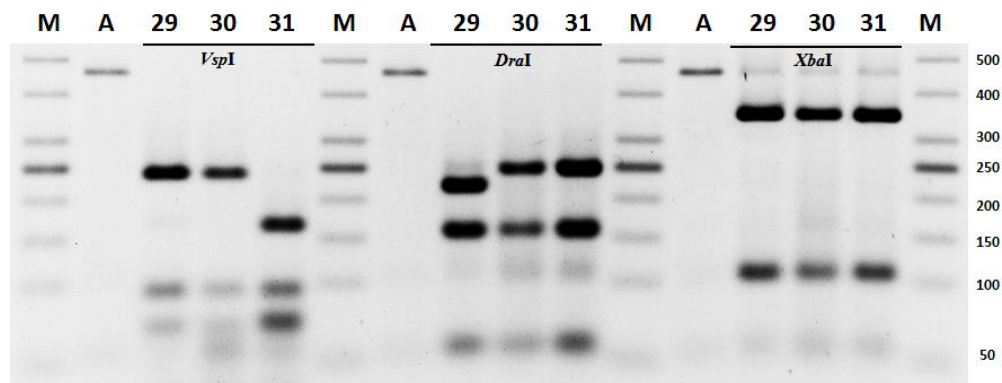


Figura 4. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI*, *DraI* e *XbaI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de exemplares caracterizados como *Amblyomma ovale*. Linhas: A – Amplicon não clivado; 29 – *A. ovale* (L185); 30 – *A. ovale* (L215); 31 – *A. ovale* (L218). Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

Uma etapa adicional de validação do protocolo consistiu na simulação do seu uso em levantamentos ecológicos. Desta forma, um total de 200 carrapatos coletados de aves em estudos prévios e já identificados por sequenciamento molecular dos alvos mitocondriais 16S rDNA e 12S rDNA (LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017), foram submetidos ao protocolo desenvolvido. Através da análise dos perfis de banda resultantes, foi possível alcançar 100% de acurácia ao identificar corretamente todos os exemplares avaliados, contendo as espécies *Amblyomma longirostre* (59/200 – 29,5%), *A. romarioi* (53/200 – 26,5%), *A. parkeri* (26/200 – 13%), *A. calcaratum* (24/200 – 12%), *A. brasiliense* (18/200 – 9%), *A. nodosum* (7/200 -3,5%), *A. sculptum* (4/200 – 2%), *A. aureolatum* (3/200 – 1,5%), *A. naponense* (3/200 – 1,5%), *A. ovale* (2/200 – 1%) e *A. varium* (1/200 – 0,5%). A adição de amostras identificadas como *A. brasiliense*, *A. longirostre* e *A. romarioi* ao gel de agarose foram úteis na caracterização de amostras desconhecidas, sendo especialmente interessante nos géis da enzima de restrição *VspI*. Verificou-se que a migração de bandas resultantes da clivagem por esta enzima ocorre em velocidade diferente da observada para os marcadores de peso molecular empregados. Um exemplo dos géis de agarose desta etapa de validação pode ser observado na Figura 5.

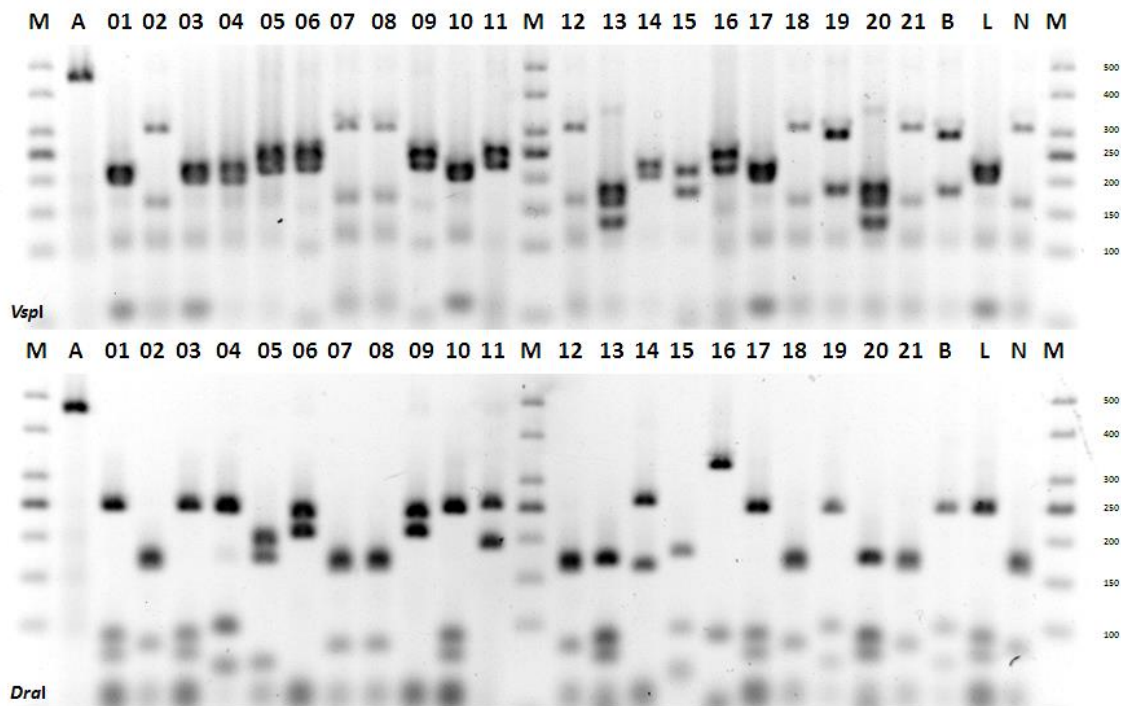


Figura 5. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de exemplares coletados de aves. Identificação de *Amblyomma longirostre* (linhas 01, 03, 10 e 17), *A. romarioi* (linhas 02, 07, 08, 12, 18 e 21), *A. ovale* (linha 04), *A. varium* (linha 05), *A. calcaratum* (linhas 06 e 09), *A. nodosum* (linha 11), *A. parkeri* (linhas 13 e 20), *A. aureolatum* (linha 14), *A. naponense* (linha 15), *A. sculptum* (linha 16) e *A. brasiliense* (linha 19). Linhas: A – Amplicon não clivado de fragmento 16S rRNA; B – *A. brasiliense*; L – *A. longirostre*; N – *A. romarioi*. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

A última etapa de validação consistiu na utilização do protocolo PCR-RFLP em exemplares em estágio imaturo até então não identificados e obtidos a partir de aves capturadas entre 2015-2017. Um total de 300 padrões de banda foram obtidos empregando as enzimas *VspI* e *DraI*, e identificados como *Amblyomma longirostre* (123/300 – 41%), *A. romarioi* (82/300 – 27,33%), *A. parkeri* (42/300 – 14%), *Ixodes* spp. (17/300 – 5,67%), *A. aureolatum* (14/300 – 4,67%) *A. calcaratum* (11/300 – 3,67%), *A. brasiliense* (6/300 – 2%), *A. nodosum* (4/300 – 1,33%), *A. dubitatum* (1/300 – 0,33%). Análise de sequenciamento molecular subsequente confirmou a identificação de 100% das amostras.

4 DISCUSSÃO

A etapa de identificação de carrapatos obtidos em estudos a campo torna-se crucial para a execução de estudos epidemiológicos e ecológicos a respeito deste grupo de ectoparasitas e micro-organismos associados. As características morfológicas discriminatórias serviram como base para muitos dos avanços alcançados nas últimas décadas e continuam sendo amplamente empregadas (ESTRADA-PEÑA et al., 2017a). Entretanto, apenas com o advento e popularização do sequenciamento de alvos moleculares, foi possível obter informações de forma mais completa, especialmente ao considerarmos exemplares imaturos e adultos de difícil diferenciação morfológica (MARTINS et al., 2016; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Contudo, as perceptíveis lacunas existentes nos bancos de dados moleculares evidenciam que mesmo o sequenciamento de fragmentos gênicos apresenta limitações. Ao considerarmos que apenas 50% das espécies de carrapatos possuem representação nos bancos de dados para a região ITS2, por exemplo, destaca-se a possibilidade de não identificação de espécies que ocorrem com menor frequência, caso este seja o único alvo molecular amplificável por PCR. A incapacidade de amplificação de determinadas regiões foi demonstrada por Luz et al. (2018b), onde fez-se necessário amplificar e sequenciar as regiões mitocondriais 16S rDNA, 12S rDNA e COI para que se alcançasse a identificação dos carrapatos em estágio imaturo. Desta forma, a inexistência de metodologias 100% eficazes para este fim é ressaltada. Contudo, destaca-se também que a soma de técnicas complementares possibilita a especiação de maior número de exemplares, reduzindo os possíveis equívocos relacionados a determinação de níveis taxonômicos supra-específicos e ampliando quantitativamente e qualitativamente os dados obtidos em levantamentos ecológicos (ESTRADA-PEÑA et al., 2015).

A observação de grande número de exemplares coletados em estudos a campo e identificados em nível de gênero é frequente. Tal limitação é ainda maior ao considerarmos pesquisas associadas ao parasitismo de aves silvestres, já que carrapatos em estágio imaturo são mais frequentemente obtidos (MARTINS et al., 2014; LUGARINI et al., 2015; MATURANO et al., 2015). A disponibilização de chave de identificação morfológica para ninfas do gênero *Amblyomma* buscou solucionar parcialmente este fator limitante (MARTINS et al., 2010). Contudo, este tipo de ferramenta não se encontra disponível para o estágio larval de muitas espécies, inviabilizando a implementação de análises morfológicas (GUGLIELMONE & ROBBINS, 2018). A manutenção de carrapatos ingurgitados em condições de umidade e temperatura controladas em nível laboratorial consiste em uma das alternativas, possibilitando sua transição para o estágio seguinte e facilitando a diferenciação morfológica (MATURANO et al., 2015; LUZ et al., 2018a). Esta abordagem pode ser implementada apenas à exemplares ingurgitados e que permaneçam viáveis durante todo o processo de desenvolvimento até o próximo estágio.

O protocolo de PCR-RFLP sugerido no presente estudo, tendo como base a região mitocondrial 16S rDNA, fornece subsídios para a diferenciação de ixodídeos reportados em território brasileiro de forma mais rápida e menos onerosa do que as abordagens moleculares até então empregadas. Protocolos baseados na ação de enzimas de restrição continuam sendo amplamente desenvolvidos e implementados em diferentes áreas de interesse para parasitologia (CALDEIRA et al., 2016; DOKIANAKIS et al., 2016; ZHENG et al., 2016; KANG et al., 2017; ANH et al., 2018; RAHIMIAN et al., 2018). A facilidade em seu desenvolvimento, somada a não obrigatoriedade de instrumentos dispendiosos e mão de obra extremamente qualificada para

sua execução, estão entre as principais vantagens desta técnica, sendo uma alternativa em países em desenvolvimento para a genotipagem de organismos de interesse (BERG, 2012; HELMY et al., 2016).

A seleção deste gene justifica-se não somente pela maior representatividade de dados consultados, mas também por características intrínsecas desta região mitocondrial. Análise comparativa dos alvos COI, 16S rDNA, 12S rDNA e ITS2, evidenciou que a eficácia dos primers empregados para a amplificação de 16S rDNA, o tamanho do fragmento resultante e, conseqüentemente, a qualidade e alinhamento das sequências obtidas, o destacou dos demais marcadores empregados na caracterização de carrapatos (LV et al., 2014). Sua velocidade de mutação reduzida torna-o ainda um alvo interessante para avaliação de divergências mais antigas, entre espécies ou subespécies de carrapatos (ARAYA-ANCHETTA et al., 2015).

Deve-se ter em mente que espécies parasitárias com ampla distribuição geográfica estão sujeitas a variações relacionadas ao contexto de adaptação, especiação e capacidade vetorial, o que pode ser refletido na distância genética populacional (ARAYA-ANCHETTA et al., 2015). Nossos resultados evidenciam esta observação, tendo em vista que 27,5% (22/80) dos grupamentos alfanuméricos formados no decorrer do estudo foram compostos exclusivamente por sequências externas ao Brasil. A espécie *Amblyomma parvum*, por exemplo, sabidamente apresenta elevado nível de divergência, de acordo com a região geográfica originária. Análise comparativa de populações de exemplares desta espécie do Brasil e Argentina demonstraram 3,7% de divergência entre sequências de 16S rDNA (LADO et al., 2016). Fator condizente com a determinação de seis combinações de padrões de banda obtidos na presente análise. O emprego da enzima de restrição *HaeIII* (GG[^]CC) e sua ação exclusiva em *A. parvum* (excetuando componentes do grupamento *Parv_C1*, que não possui representantes brasileiros) apresenta-se como uma alternativa para facilitar a identificação desta espécie.

O mesmo pode ser destacado para a espécie *A. ovale*, onde quatro combinações de padrões foram verificadas na análise enzimática *in silico*, concordante com a verificação de variabilidade genética desta espécie em território brasileiro. Bitencourth et al. (2019), acerca de *A. ovale*, sugeriram a execução de estudos morfológicos, ecológicos e comportamentais mais aprofundados para averiguar a possível ocorrência de espécies crípticas dentre os exemplares desta espécie. Novamente, empregando a enzima de restrição *XbaI* e conseqüente obtenção de padrões de banda exclusivos para esta espécie de carrapato, é possível discriminar de forma facilitada os diferentes grupamentos detectados para *A. ovale*.

Em menor escala, foi possível observar que das 21 sequências de *Rhipicephalus sanguineus* obtidas, apenas dois exemplares compõem o grupamento *Sang_B2* (MF477856 e KX533942). Estas duas sequências são oriundas do município de Barra do Quaraí, Rio Grande do Sul (Brasil), obtidos por diferentes grupos de pesquisa e em momentos distintos. Sugere-se que a distribuição geográfica influencia diretamente nos padrões de banda determinados, embora a maioria das sequências analisadas conservem os sítios de ação enzimático. A definição de haplótipos, baseado no sequenciamento de 16S rRNA, foi previamente realizada por Moraes-Filho et al. (2011), evidenciando a existência de um padrão único (denominado grupo E) composto por sequências originárias da região Sul e Uruguai. Tal fator é condizente com as observações feitas na análise *in silico*.

A validação dos perfis determinados *in silico* de 30 dos grupamentos sugeridos (Figuras 1, 2, 3 e 4), consistiu na primeira etapa de validação do protocolo de PCR-RFLP para caracterização de ixodídeos. Esta fase limitou-se as amostras de DNA total disponíveis em nossa coleção de ácidos nucléicos. A interpretação através de análise visual e empregando o

software Gel Analyzer 2010, possibilitou a correta identificação das amostras. Foi possível perceber, contudo, que a eletroforese de amostras digeridas com a enzima de restrição *VspI* sofre uma redução em sua velocidade, quando comparada ao marcador de peso molecular. Tal artefato deve-se, possivelmente, a composição do tampão de enzima empregado. Uma solução para esta problemática consistiu na adição de amostras com identidade conhecida, o que forneceu padrões referenciais para a análise comparativa na interpretação do gel. Adicionalmente, estas amostras funcionaram ainda como controles positivos para a clivagem enzimática. Mesmo considerando a ocupação de alguns poços por tais exemplares, o que reduz o número de amostras avaliadas por gel de agarose, esta solução torna a interpretação dos resultados mais fácil e confiável.

A segunda etapa da validação, simulando o emprego da técnica em amostras de carrapatos imaturos obtidos a partir da captura de aves silvestres, objetivou avaliar a aplicabilidade do PCR-RFLP para estudos a campo. Das 200 amostras previamente identificadas em nível de espécie através do sequenciamento molecular, e sem que o executor tivesse qualquer informação a respeito do espécime, foi possível identificar todos os exemplares utilizados, a partir dos padrões de banda resultantes. Ressalta-se que a amostragem selecionada para esta etapa de validação possui particularidades interessantes para o foco do presente estudo. O levantamento reportado por Luz et al. (2017b) descreveu a diversidade de espécies mais abundante dentre os estudos ecológicos que consideram o parasitismo de aves no Brasil (10 espécies bem definidas e dois haplótipos bem caracterizados). Na amostragem oriunda de MG, todas as identificações foram alcançadas através do sequenciamento de 16S rDNA, alvo molecular empregado na presente análise (ZERINGÓTA et al., 2017). Embora o executor da técnica não tenha acessado previamente a identificação de cada carrapato utilizado na segunda etapa de validação, pretendeu-se avaliar a maior variabilidade possível de espécimes obtidos nestes dois estudos.

A terceira etapa de validação, empregando o protocolo de digestão em carrapatos ainda não identificados, confirmou novamente o potencial de aplicação da técnica sugerida para estudos a campo. Destaca-se, assim como na etapa anterior, o elevado grau de homogeneidade dentre as amostras que compartilham a mesma origem geográfica. Tal característica, facilita a interpretação do gel de agarose e, conseqüentemente, a aplicação do protocolo PCR-RFLP.

Um fator a ser considerado são as informações ecológicas e biológicas previamente adquiridas para as espécies de carrapato reportadas no Brasil. Novamente utilizando as espécies pertencentes ao complexo *Amblyomma cajennense* como exemplo, é possível diferenciar os padrões de banda dentre *A. sculptum* e *A. cajennense*, como demonstrado na Figura 3. Em adição a esta informação, reconhece-se a distribuição geográfica distinta destas espécies em território nacional, havendo simpatria em apenas algumas localidades, o que pode auxiliar na identificação de exemplares capturados (MARTINS et al., 2016). Em circunstâncias onde a similaridade do padrão de bandas dificulta a identificação, como podemos observar entre as espécies *A. nodosum* (Nodo_A1) e *A. yucumense* (Yucu_A1), além da implementação de uma terceira enzima de restrição (*EcoRI*), é possível avaliar ainda a origem do carrapato processado. Sabe-se que a espécie *A. nodosum* relaciona-se principalmente a aves em estágios imaturos e tamanduás em sua fase adulta (PINHEIRO et al., 2015), enquanto a espécie *A. yucumense* foi associada a pequenos mamíferos (KRAWCZAK et al., 2015). Embora as relações parasito-hospedeiro não sejam necessariamente exclusivas ou excludentes, tais informações podem auxiliar na implementação do protocolo sugerido e ampliar a confiabilidade dos resultados obtidos.

Aditivamente, os estudos a campo usualmente limitam-se a determinada região geográfica e/ou perfil de hospedeiro, o que paralelamente interfere na variabilidade populacional esperada. Em um dos estudos que deram origem as amostras utilizadas na segunda etapa de validação, onde 100% das amostras foram identificadas através do sequenciamento molecular, 65,97% (126/191) dos exemplares correspondiam as espécies *A. longirostre* (45 larvas e 4 ninfas) e *A. romarioi*, então denominado *Amblyomma* sp. haplótipo Nazaré (77 larvas) (ZERINGÓTA et al., 2017). A homogeneidade desta amostragem certamente resultaria em géis de agarose de fácil interpretação, o que também pode ser esperado para levantamentos a campo futuros.

Assim, os presentes resultados fornecem subsídios para a execução de levantamentos ecológicos mais abrangentes, empregando metodologias moleculares menos onerosas. Recomenda-se, entretanto, que o sequenciamento de alvos moleculares continue sendo executado em uma parcela da amostragem, validando os resultados alcançados pela ação enzimática. Não devemos negligenciar ainda que a obtenção de sequências para o preenchimento das lacunas observadas para outros alvos moleculares deve ser um dos objetivos de estudos futuros.

A descrição de novas espécies de carrapatos no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2012b; NAVA et al., 2014; BARROS-BATTESTI et al., 2015; LADO et al., 2018; MARTINS et al., 2019), bem como micro-organismos associados (DALL'AGNOL et al., 2017; LUZ et al., 2018c, 2019; PECKLE et al., 2019), ilustram o dinamismo e as constantes modificações taxonômicas verificadas neste campo de estudo. Embora o presente protocolo considere a grande variedade de espécies reportadas no Brasil, a possibilidade de ampliação deste número em decorrência de estudos ecológicos e moleculares, bem como através da introdução de novos ectoparasitas no país, associados ao deslocamento de hospedeiros vertebrados, podem resultar na desatualização da metodologia aqui proposta. A criação de plataformas que possibilitem a atualização destes dados, e mesmo a ampliação do protocolo para outros países da América Latina e demais continentes, deve ser planejada para um futuro próximo, promovendo a manutenção e eficácia do PCR-RFLP para caracterização de ixodídeos.

A ampliação na relevância de enfermidades transmitidas por carrapatos e emergência de novos patógenos associados é um evento global (BOULANGER et al., 2019) e aspectos da ecologia de carrapatos devem ser considerados no planejamento e execução de estratégias de controle frente a carrapatos e DTCs (DANTAS-TORRES et al., 2012c). Sabendo dos impactos negativos resultantes da caracterização supra-específica de exemplares coletados a campo (ESTRADA-PEÑA et al., 2017b) e a relevância do sequenciamento molecular para identificação de espécimes imaturos (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016), este torna-se um dos principais limitadores para o avanço deste campo de estudo em países em desenvolvimento. A redução no investimento em pesquisa científica atualmente verificada no Brasil, torna a execução desta abordagem em grande número de amostras inviável, sendo um impeditivo para a continuidade dos avanços obtidos nas últimas duas décadas (MOURA & CAMARGO JUNIOR, 2017). A identificação através do sequenciamento de alvos de interesse pode custar aproximadamente R\$70,00 por exemplar, ao considerarmos o sequenciamento da dupla-fita por serviços terceirizados. Com a presente proposta, promovemos uma redução de 97,31% (R\$1,88 por amostra, considerando a digestão por duas enzimas) para obtenção deste dado molecular, possibilitando a identificação de centenas ou milhares de carrapatos em estudos a campo e, conseqüentemente, fornecendo subsídios para determinarmos intervenções eficazes para o controle de DTCs.

Assim, o protocolo PCR-RFLP aqui apresentado, baseado em alvo molecular amplamente utilizado na identificação de carrapatos, fornece meios moleculares para determinar todas as espécies de ixodídeos reportados no Brasil de forma rápida, robusta, reprodutível e menos onerosa. Espera-se que a disponibilidade desta metodologia alternativa ao sequenciamento molecular forneça meios para estimular a manutenção e ampliação de levantamentos ecológicos deste importante grupo vetorial de relevância para saúde humana e animal.

CAPÍTULO II

REAVALIAÇÃO E ATUALIZAÇÃO DE PCR-RFLP COMO TÉCNICA PARA IDENTIFICAÇÃO EM NÍVEL DE ESPÉCIE DE *Rickettsia* spp. ASSOCIADAS A CARRAPATOS NO BRASIL

RESUMO

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Reavaliação e Atualização de PCR-RFLP como Técnica para Identificação em Nível de Espécie de *Rickettsia* spp. Associadas a Carrapatos no Brasil.** 2019. 16p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Bactérias do gênero *Rickettsia* são micro-organismos com desenvolvimento obrigatório no interior de células eucarióticas e estreita relação com artrópodes. Apresenta relevância para a saúde humana e animal, devido a ocorrência de quadros infecciosos transmitidos por vetores. Contudo, o desconhecimento acerca do potencial patogênico de muitas das espécies que compõem o gênero, o possível subdiagnóstico destas enfermidades e a ausência de informações acerca da bioecologia e distribuição de muitos destes agentes, exemplifica algumas das lacunas ainda a serem preenchidas. Muitos avanços foram alcançados nos últimos anos, em decorrência de fatores como o desenvolvimento e aplicação de novas metodologias moleculares e a realização de numerosos estudos ecológicos extensos que objetivaram compreender melhor as relações entre artrópodes-hospedeiros-*Rickettsia*. Como resultado, podemos verificar no Brasil a descrição de novos representantes do gênero, demonstrando maior variabilidade de espécies do que o inicialmente conhecido. Tendo a biologia molecular como base para muitos destes estudos, o desenvolvimento de ferramentas mais rápidas e menos onerosas para a identificação de *Rickettsia* spp. presentes em território nacional consiste em um ponto chave para o desenvolvimento contínuo nesta área nos próximos anos. Desta forma, dados moleculares disponíveis acerca das espécies presentes no Brasil e países circunvizinhos e previamente associadas a carrapatos foram recuperados para determinação de alvos moleculares com capacidade discriminatória através da ação de enzimas de restrição. Empregando os genes *htrA* (sob a ação de *AluI* e *MspI*), *ompA* (sob a ação de *PstI* e *RsaI*) e *ompB* (sob a ação de *AluI*, *MspI* e *RsaI*) foi possível diferenciar as 15 espécies consideradas na presente análise, proporcionando uma ferramenta eficaz para a melhor compreensão deste gênero bacteriano. A descrição de espécies previamente não detectadas, somada as constantes modificações taxonômicas verificadas nesta e em outras áreas da pesquisa científica requerem a constante revisão e atualização dos métodos de identificação desenvolvidos. Aditivamente, a implementação de métodos menos onerosos para execução de pesquisas ecológicas possibilita a continuidade e maior abrangência de levantamentos com enfoque na relação carrapatos-hospedeiros-*Rickettsia*.

Palavras-chave: *Rickettsia*, *htrA*, *ompA*, *ompB*, PCR-RFLP

ABSTRACT

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Reassessment and Update of PCR-RFLP as a Technique for Species Level Identification of *Rickettsia* spp. associated with ticks in Brazil.** 2019. 16p. Thesis. (Doctorate in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Bacteria of the genus *Rickettsia* are microorganisms with obligatory intracellular development in eukaryotic cells and closely related to arthropods. It is relevant to human and animal health due to the occurrence of vector-borne infectious. However, the lack of knowledge about the pathogenic potential of many of the species within that genus, the possible underdiagnosis of these diseases and the lack of information about the bioecology and distribution of many of these agents, exemplifies some of the gaps still to be filled. Many advances have been achieved in recent years, due to factors such as the development and application of new molecular approaches, and the numerous extensive ecological studies that aimed to better understand the relationship between arthropods-hosts-*Rickettsia*. As a result, we could verify the description of new *Rickettsia* species in Brazil, demonstrating greater variability than initially thought. With molecular biology as the basis for many of these studies, the development of a faster and less expensive tools for the identification of *Rickettsia* spp. Reported in Brazilian territory is a key point for the development of this area in the coming years. Thus, the molecular data available about the species reported in Brazil and surrounding countries, and previously associated with ticks was collected. It was evaluated the discriminatory capacity of each molecular target through the action of restriction enzymes. Using *htrA* (with *AluI* and *MspI*), *ompA* (with *PstI* and *RsaI*), and *ompB* (with *AluI*, *MspI*, and *RsaI*) genes, it was possible to differentiate the 15 species considered in the present analysis, providing an effective tool for better understanding this bacterial genus. The description of previously undetected species and the constant taxonomic changes observed on this and other scientific fields, requires a frequent review and updating of the identification methods. In addition, the implementation of less expensive methods for carrying out ecological research enables the continuity and expansion of tick-host-*Rickettsia* surveys.

Keywords: *Rickettsia*, *htrA*, *ompA*, *ompB*, PCR-RFLP

1 INTRODUÇÃO

Bactérias do gênero *Rickettsia* são caracterizadas quanto a suas características morfológicas e tintoriais como pequenos cocobacilos não formadores de esporos Gram-negativos com dimensões variando de 0,3 a 0,5 μm por 0,8 a 2,0 μm . São micro-organismos intracelulares obrigatórios de células eucarióticas associados a diversos artrópodes, e relacionados a quadros moderados a severos de enfermidade em humanos e outros animais (MERHEJ & RAOULT, 2011; BEIER-SEXTON et al., 2015). Membros da família Rickettsiaceae são mantidos na natureza através de ciclos biológicos complexos envolvendo artrópodes como vetores e reservatórios vertebrados diversos (PAROLA et al., 2013; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016).

Atualmente, o gênero *Rickettsia* é composto por 32 espécies bem definidas, e por um número crescente de novas espécies ou cepas possivelmente relacionadas e sem descrição completa, validação e/ou cultivo (“List of Taxonomy Names with Standing in Nomenclature - <http://www.bacterio.net/index.html>) (PARTE, 2018). A aplicação de novas estratégias para o crescimento microbiano e ferramentas moleculares possibilitou o isolamento e caracterização de espécies bacterianas de difícil desenvolvimento em laboratório, incluindo riquetsias, otimizando a obtenção de dados para sua classificação e resultando na contínua descrição de novas espécies de micro-organismos (FOURNIER et al., 2015). Outro fator que resultou na melhor compreensão deste importante grupo de agentes patogênicos foi o elevado número de estudos a campo que buscaram melhor compreender a relação entre os micro-organismos, artrópodes e variados perfis de hospedeiros vertebrado (SPOLIDORIO et al., 2012; MARTINS et al., 2014; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016; LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017; MACHADO et al., 2018; MOERBECK et al., 2018; BARBIERI et al., 2019). Aprimorar o entendimento acerca da distribuição geográfica de agentes tradicionalmente conhecidos e/ou recentemente descritos é um importante dado epidemiológico para determinar seu possível impacto para a saúde humana e animal, assim como para definição de estratégias eficazes para prevenção e controle de enfermidades (DANTAS-TORRES et al., 2012c).

O resultado de novas metodologias de detecção e caracterização, somados a esforços contínuos para melhor compreensão de enfermidades associadas a vetores pode ser facilmente exemplificado com o conhecimento acerca de riquetsias em território brasileiro. Anterior ao ano de 2004, a única espécie de *Rickettsia* associada a carrapatos reportada no Brasil era *R. rickettsii*, agente etiológico da FMB, enfermidade zoonótica vetorizada por carrapatos de maior relevância em nosso país (LABRUNA et al., 2011b; PAROLA et al., 2013). Contudo, outras espécies e cepas, de patogenicidade conhecida ou não, foram reportadas em estudos publicados nos últimos anos, destacando o contínuo desenvolvimento desta importante área de conhecimento para saúde pública (LABRUNA et al., 2004c; PACHECO et al., 2011; NIERI-BASTOS et al., 2014; TAHIR et al., 2016; DALL’AGNOL et al., 2017; LUZ et al., 2018c, 2019; PECKLE et al., 2019).

A compreensão das lacunas ainda existentes acerca da ecologia e epidemiologia das riquetsioses no Brasil ressalta a necessidade de estudos em larga escala nos diferentes biomas que compõem o nosso território. Sabemos, contudo, que o emprego de metodologias moleculares baseadas no sequenciamento gênico de grande número de espécimes usualmente recuperadas no decorrer de tais levantamentos torna-se um limitador para a aquisição destas

informações, sendo necessária a busca por ferramentas alternativas (HELMY et al., 2016). Santolin et al. (2013), buscaram solucionar esta problemática através do desenvolvimento de protocolo baseado na técnica de PCR-RFLP em fragmentos dos genes *ompB* e *htrA*, alvos moleculares rotineiramente empregados para a caracterização de membros do gênero *Rickettsia*. A viabilidade prática de tal protocolo foi comprovada através de estudos ecológicos posteriores (LUZ et al., 2017b, 2018c; ZERINGÓTA et al., 2017).

Com a descrição de novas espécies em território nacional e países circunvizinhos e o maior número de dados moleculares atualmente disponíveis, o presente trabalho objetivou a atualização do protocolo de identificação de espécies conhecidas do gênero *Rickettsia* associados a carrapatos e previamente reportados no Brasil, com base na ação de enzimas de restrição. Almejou-se, desta forma, fornecer subsídios para a ampliação contínua dos levantamentos realizados, ampliando paralelamente nossa compreensão acerca das relações entre vetores, hospedeiros e micro-organismos de relevância para saúde humana e animal.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Levantamento de Bancos de Dados Moleculares

Tendo como base para a presente análise bactérias do gênero *Rickettsia* previamente reportadas em associação a carrapatos e sabidamente presentes em território brasileiro, realizou-se o levantamento de informações disponíveis através do banco de dados de sequências gênicas GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (CLARK et al., 2016). Adicionalmente, considerando a descrição de *Rickettsia massiliae* em território argentino, sequências desta espécie foram também consideradas (CICUTTIN et al., 2004 apud CICUTTIN et al., 2014). A listagem completa das espécies consideradas pode ser verificada no Quadro 1. Buscou-se por sequências moleculares de *gltA*, *ompA*, *ompB* e *htrA*, alvos rotineiramente empregados para detecção e identificação de *Rickettsia* spp. Dados oriundos de amostras armazenadas na Coleção de Ácidos Nucléicos de Micro-organismos (LMBM/DPA/UFRRJ) foram também utilizados, objetivando preencher lacunas verificadas nos bancos de dados consultados.

Quadro 1. Espécies de *Rickettsia* previamente associadas a carrapatos e descritas no Brasil e em países da América Latina

<i>Rickettsia amblyommatis</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>
‘ <i>Candidatus Rickettsia andeanae</i> ’	<i>Rickettsia paranaensis</i>
<i>Rickettsia asemonensis</i>	<i>Rickettsia rhipicephali</i>
<i>Rickettsia bellii</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>
‘ <i>Candidatus R. colombianensi</i> ’	<i>Rickettsia</i> sp. strain OF ^b
<i>Rickettsia felis</i>	<i>Rickettsia</i> sp. strain Pampulha
<i>Rickettsia massiliae</i> ^a	‘ <i>Candidatus Rickettsia wissemanni</i> ’
<i>Rickettsia monteiroi</i>	

^a Não reportada no Brasil

^b Dado não publicado

A partir das sequências moleculares armazenadas, realizou-se o alinhamento com oligonucleotídeos iniciadores implementados rotineiramente na detecção e identificação de *Rickettsia* spp. (Tabela 1) através da análise *in silico* utilizando o software Sequencher[®] versão 5.4.6 (Gene Codes Corporation, Ann. Arbor, MI, EUA).

Um par de primer adicional foi desenvolvido, tendo como alvo o gene *ompA* (*ompAdogF/ompAdogR*), promovendo um sistema de detecção exclusivo para *Rickettsia* SFG associados a carrapatos de aves, bem como *R. rickettsii*. Buscou-se por regiões conservadas no fragmento amplificado a partir da combinação dos primers 190-70/190-701, utilizando o software on-line Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) (UNTERGASSER et al., 2012). A

especificidade dos primers foi avaliada *in silico* empregando o software on-line primerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (YE et al., 2012), indicando que estes novos oligonucleotídeos iniciadores não anelariam com sequências de *R. felis* e *R. asembonensis*, duas espécies associadas predominantemente a pulgas, mas com relatos infrequentes em carrapatos brasileiros (BITENCOURTH et al., 2017; DALL'AGNOL et al., 2017). Informações acerca da otimização das condições de amplificação e determinação da sensibilidade analítica desta nova reação serão detalhadamente abordadas no decorrer do capítulo III, onde estes novos primers foram também empregados.

Tabela 1. Oligonucleotídeos iniciadores empregados para alinhamento em *in silico* com alvo nos genes *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB*

Alvo	Primer	Sequência do Primer (5'-3')	Fragmento	Referência
<i>gltA</i>	CS-239	GCT CTT CTC ATC CTA TGG CTA TTA T	834 pb	Labruna et al. (2004a)
	CS-1069	CAG GGT CTT CGT GCA TTT CTT		
	CS-78	GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT	401 pb	Labruna et al. (2004a)
	CS-323	ATC CTG ATT TAT TGA ATT TTA AGG AAG C		
<i>htrA</i>	17KDF	GGA ACC AGG CGG TAT GAA TAA	407 pb	Santolin et al. (2013)
	17KDR	ACT TGC CAT AGT CCG TCA GG		
	17k-5	GCT TTA CAA AAT TCT AAA AAC CAT ATA	548 pb	Labruna et al. (2004a)
	17k-3	TGT CTA TCA ATT CAC AAC TTG CC		
<i>ompA</i>	190-70	ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA	637 pb	Eremeeva et al. (2006)
	190-701	GTT CCG TTA ATG GCA GCA TCT		
	ompAdogF	GCT TTA TTC ACC ACC TCA AC	357 pb	Abreu et al. (2019)
	ompAdogR	GCC GGC AGT AAT AGT AAC AG		
<i>ompB</i>	120-M59	CCG CAG GGT TGG TAA CTG C	857 pb	Roux & Raoult (2000)
	120-807	CCT TTT AGA TTA CCG CCT AA		

As sequências utilizadas como molde para a triagem *in silico* encontram-se listadas no Quadro 2. Sabendo que os pares de primer 17KDF/17KDR e ompAdogF/ompAdogR promovem o anelamento em regiões internas dos primers 17k-5/17k-3 e 190-70/190-701, respectivamente, as sequências empregadas como molde para estas regiões foram as mesmas utilizadas para os fragmentos de comprimento maior. Através do software Sequencher® versão 5.4.6, estas foram editadas e adicionadas as sequências dos primers supracitados, simulando os produtos obtidos após as PCRs.

Quadro 2. Números de acesso das sequências empregadas para avaliação *in silico* inicial e determinação dos perfis de digestão resultantes para cada espécie de *Rickettsia*

Espécie	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação do alvo molecular de interesse				
	CS-239	CS-78	17k-5/17k-5	190-70/190-701	120-M59
	CS-1069	CS-323	17KDF/17KDR	ompAdogF/ompAdogR	120-807
<i>Rickettsia amblyommatis</i>	KJ534310	KM262197	AY375162	KY053885	KY628368
' <i>Candidatus</i> R. andeanae'	KX576677	MG887826	KY402191	KX158270	KF030933
' <i>Candidatus</i> R. asemonensis'	KX196267	KX196267	KY445736	-	JN315972
<i>Rickettsia bellii</i>	AY362703	AY362703	AY362702	-	-
' <i>Candidatus</i> R. colombianensi'	-	MG563768	RAQN01000001	KF691749	-
<i>Rickettsia felis</i>	JN375498	JN375498	AF195118	-	GQ329875
<i>Rickettsia massiliae</i>	KU498299	KU498299	KT032120	KU498298	KT032122
<i>Rickettsia monteiroi</i>	FJ269035	FJ269035	FJ269036	MK166031	-
<i>Rickettsia parkeri</i>	JQ906783	JQ906783	EF102237	KX196265	KF782321
' <i>Candidatus</i> R. paranaensis'	-	-	KX018052	JN126321	KX018050
<i>Rickettsia rhipicephali</i>	DQ865206	DQ865206	DQ865207	KX434736	KX018051
<i>Rickettsia rickettsii</i>	JN375499	JN375499	AY281069	KF742603	KF742604
<i>Rickettsia</i> sp. strain Pampulha	-	-	JN190456	-	-
<i>Rickettsia</i> sp. strain OF	MK294160	MK294160	MK294161	-	MK294162
' <i>Candidatus</i> R. wissemanni'	LT558852	LT558852	-	LT558853	LT558854

2.2 Digestão Enzimática *in silico*

Com os representantes obtidos para cada espécie e alvo de interesse, realizou-se a triagem *in silico* para determinação de enzimas com potencial discriminatório dentre as diferentes espécies e alvos moleculares. Para tanto, empregou-se o painel de enzimas de restrição disponível no software Sequencher[®] versão 5.4.6, buscando por enzimas de restrição com ao menos um sítio de clivagem no maior número de espécies consideradas no presente levantamento, resultando em fragmentos com tamanho suficiente para discriminação interespecífica em gel de agarose.

Tendo em vista os fragmentos moleculares e enzimas de restrição com melhor aplicação para o objetivo almejado, realizou-se análise mais abrangente com as demais sequências obtidas e armazenadas em nosso banco de dados, determinando o grau de preservação dos sítios de ação das enzimas selecionadas em nível intraespecífico. Através do software gratuito MEGA7 (<https://www.megasoftware.net/>) (KUMAR et al., 2016), sequências de uma mesma espécie foram alinhadas e, utilizando a ferramenta de busca do programa, os sítios de ação enzimáticos foram ressaltados. Assim, foi possível determinar a ocorrência de polimorfismo que resultasse no ganho e/ou perda de sítios de ação e consequente modificação no perfil de bandas resultante.

Somando todos os fatores considerados para o desenvolvimento do protocolo de PCR-RFLP, optou-se pela subsequente análise *in vitro* dos genes *htrA* (17-3/17-5) (LABRUNA et al., 2004a), *ompA* (ompAdogF/ompAdogR) (ABREU et al., 2019), e *ompB* (120-M59/120-807) (ROUX & RAULT, 2000).

2.3 DNA de *Rickettsia* spp. para Validação do Protocolo

Tendo em vista a validação das reações enzimáticas sugeridas a partir da análise *in silico*, foram empregadas amostras de DNA extraído de culturas de célula infectadas com os agentes *Rickettsia amblyommatis* (cepa AC37), '*Candidatus* R. andeanae' (PLR23), *R. bellii* (cepa Mogi), *R. felis* (cepa Pedreira), *R. monteiroi* (cepa 7P), *R. parkeri* (cepa Atlantic Rain Forest-A010), *R. rhipicephali* (cepa HJ5) e *R. rickettsii* (cepa Taiaçu) (gentilmente cedidos por

Dr. Marcelo Bahia Labruna, USP), bem como ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’ extraído de *Amblyomma dissimile* (gentilmente cedido por Dra. Maria Ogrzewalska, FIOCRUZ). Foi possível ainda obter sequências representativas de bactéria do gênero *Rickettsia* detectada a partir de DNA extraído de *Ornithodoros faccinii* (BARROS-BATTESTI et al., 2015), disponível na Coleção de Ácidos Nucléicos de Micro-organismos do LMBM/DPA/UFRRJ (dados não publicados). Este micro-organismo será identificado como ‘*Rickettsia* strain OF’ no decorrer do presente trabalho.

2.4 Amplificação dos genes, *htrA*, *ompA* e *ompB*

As condições de amplificação para os produtos de PCR de interesse encontram-se detalhadas na Tabela 2. Em todos os ensaios, diluições seriadas de controle positivo quantificados de *Rickettsia felis* (cepa Pedreira) foram utilizados para garantir o limite de detecção de cada reação, fornecendo um meio para assegurar a reprodutibilidade dos ensaios. Adicionalmente, incorporou-se ainda dois controles negativos, onde o DNA molde foi substituído pela mesma quantidade de H₂O ultrapura. Uma das amostras foi preparada em ambiente livre de DNA, onde os “Master-mixes” para cada reação de PCR foram confeccionadas e distribuídas. O segundo controle negativo foi finalizado juntamente com a adição de DNA molde em cada microtubo de reação. Desta forma, seria possível detectar casos de contaminação durante o processo de preparação da reação de PCR, desconsiderando os resultados, e implementando medidas corretivas.

Tabela 2. Composição dos “Master-mixes” e condições de termociclagem empregadas para amplificação dos genes *htrA*, *ompA* e *ompB* (Condições baseadas em Zeringóta et al., 2017)

Alvo Molecular	Mix para PCR (25 µl)	Condições de Termociclagem
<i>htrA</i> – 548 pb (17k-3/17k-5)	1x Tampão 2,5 mM MgCl ₂	Desnaturação inicial – 94 °C/5 min
<i>ompA</i> – 357 pb (ompAdogF/ompAdogR)	200 µM dNTPs 20 pmoles de cada primer	} 40x Desnaturação – 94 °C/20 s Anelamento – 52 °C/20 s Extensão – 72 °C/25s
<i>ompB</i> – 857 pb (120-M59/120-807)	0,5 U Platinum Taq DNA Polymerase 2 µl do DNA molde	

Para análise da amplificação resultante, um total de 5 µl do produto final de cada amostra foi submetido a eletroforese em gel de agarose (1,5%), utilizando o tampão de corrida Tris-Acetato EDTA (TAE) (0,5x = 20 mM Tris base; 10 mM ácido acético; 0,5 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 40 min. A determinação dos tamanhos do produto foi feita através da comparação visual com marcadores de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371, Thermo Scientific). Os géis foram corados por submersão em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), observados e digitalmente registrados em transiluminador. O volume sobressalente de cada reação foi estocado a -20 °C para análises moleculares posteriores.

2.5 PCR-RFLP *in vitro* para Validação do Protocolo

Determinou-se a capacidade discriminatória das enzimas *AluI* (AG[^]CT) e *MspI* (C[^]CGG) frente a fragmentos de *htrA*, bem como as enzimas *PstI* (CTGCA[^]G) e *RsaI* (GT[^]AC) para discriminação de espécies utilizando *ompA* e *AluI*, *MspI* e *RsaI* frente a *ompB*.

As digestões enzimáticas foram realizadas em um volume final de 12 µl, contendo 5 µl do produto de PCR a ser avaliado, 1,2 µl do tampão de reação enzimática próprio para cada enzima, 1,2 U da enzima de restrição selecionada e 1,2 µl de soro albumina bovina (0,1 mg/ml), com incubação a 37 °C por 3 h. Os padrões de PCR-RFLP resultantes após a digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2,5% com tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE) (44,5 mM Tris base; 44,5 mM borato; 1 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 90 min. O procedimento de coloração e registro dos géis ocorreu como descrito previamente para avaliação dos produtos de PCR. Objetivando melhor predição do tamanho nos fragmentos resultantes, a análise comparativa foi feita com o auxílio de marcador de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371, Thermo Scientific e GeneRuler 100 bp DNA Ladder, product # SM024, Thermo Scientific). Adicionalmente, as imagens obtidas foram analisadas através do software gratuito Gel Analyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>) (SKOSYREV et al., 2013) para determinação do tamanho individual de cada fragmento de forma acurada, empregando os marcadores de peso molecular como parâmetro para a calibração do programa.

3 RESULTADOS

O levantamento de dados representativos para os 15 componentes do gênero *Rickettsia* associadas a carrapatos e previamente reportados no Brasil ou países fronteiriços resultou na obtenção de 262 sequências nucleotídicas de *gltA*, 69 referentes ao gene *htrA*, somados a 148 e 71 fragmentos referentes aos genes *ompA* e *ompB*, respectivamente. Desta forma, um total de 550 sequências foram armazenadas e avaliadas no presente estudo. O número de acesso das sequências armazenadas e avaliadas quanto à atividade enzimática estão listados em material anexado ao presente documento (ANEXO B).

Como previamente reportado na seção anterior, a triagem inicial das sequências obtidas nos bancos de dados moleculares destacou a capacidade discriminatória dos genes *htrA* (17k-3/17k-5 – 548 pb), *ompA* (*ompAdogF/ompAdogR* – 357 pb) e *ompB* (120-M59/120-807 – 857 pb). Posterior à análise de sequências molde selecionadas (Quadro 2), ampliou-se a avaliação para demais sequências representativas para as regiões selecionadas, possibilitando a detecção de polimorfismo nuclear que resultasse em ganho ou perda dos sítios de restrição enzimática. De acordo com os dados obtidos pela análise *in silico*, as regiões supracitadas apresentam potencial discriminatório, ao combinarmos diversos fragmentos gênicos e enzimas de restrição. Os fragmentos previstos após a digestão de *htrA*, *ompA* e *ompB* podem ser apreciados na Tabela 3.

Tabela 3. Tamanho de fragmentos de PCR-RFLP previstos para *Rickettsia* spp. associadas a carrapatos após restrição enzimática frente as regiões gênicas *htrA* (548 pb), *ompA* (357 pb) e *ompB* (857 pb)

Espécie	<i>htrA</i> (17k-3/17k-5 – 548pb)		<i>ompA</i> (<i>ompAdogF</i> / <i>ompAdogR</i> – 357 pb)		<i>ompB</i> (120-M59/120-807 – 857 pb)		
	<i>AluI</i>	<i>MspI</i>	<i>PstI</i>	<i>RsaI</i>	<i>AluI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>
<i>R. amblyommatis</i>	206, 119, 94, 93, 16, 12, 9	246, 173, 130	291, 66*	156, 108, 93*	460, 339, 30, 27	507, 220, 129	599, 174, 83
‘ <i>Candidatus R. andeanae</i> ’	205, 119, 93, 93, 16, 2, 9	246, 172, 129	291, 66	264, 93	460, 297, 42, 30, 27	507, 220, 129	599, 174, 83
‘ <i>Candidatus R. asemonensis</i> ’	206, 119, 109, 94, 12, 9	200, 173, 130, 46	-	-	303, 156, 153, 118, 36, 33, 30, 27	507, 309, 40	599, 257
<i>R. bellii</i>	137, 103, 75, 75, 75, 59, 16, 9	301, 130, 118*	-	-	-	-	-
‘ <i>Candidatus R. colombianensi</i> ’	-	-	222, 135	NC	-	-	-
<i>R. felis</i>	218, 119, 109, 94, 9	200, 178, 171	-	-	297, 280, 153, 42, 33, 30, 27	363, 309, 87, 63, 40	599, 174, 89
<i>R. massiliae</i>	206, 119, 93, 93, 16, 12, 9	246, 129, 118, 55	201, 135, 24	109, 108, 93, 50	297, 274, 153, 42, 33, 30, 27	507, 349	559, 174, 83, 40
<i>R. monteiroi</i>	218, 128, 92, 84, 16, 9	NC	264, 72, 24	NC	-	-	-
‘ <i>Candidatus R. paranaensis</i> ’ [×]	206, 128, 93, 92, 16, 12	246, 173, 128	135, 81, 78, 66	267, 93	339, 307, 153, 30, 27	507, 220, 129	391, 169, 144, 83, 39, 30
<i>R. parkeri</i>	206, 128, 93, 92, 16, 12	246, 173, 128	135, 81, 78, 66*	267, 93	339, 307, 153, 30, 27	507, 220, 129	391, 169, 144, 83, 39, 30
<i>R. rhipicephali</i>	206, 119, 109, 93, 12, 9	246, 129, 118, 55	225, 135	159, 93, 81, 27	297, 274, 153, 42, 33, 30, 27	507, 220, 129	559, 174, 83, 40
<i>R. rickettsii</i>	206, 128, 93, 92, 16, 12	246, 171, 130	144, 135, 81	159, 108, 93	339, 274, 153, 33, 30, 27	355, 220, 152, 129	430, 169, 144, 83, 30
<i>Rickettsia</i> sp. strain OF	212, 206, 94, 16, 12, 9	200, 178, 171	-	-	307, 291, 153, 60, 39	507, 210, 129	587, 263
<i>Rickettsia</i> sp. strain Pampulha	206, 119, 109, 93, 12, 9	200, 171, 131, 46	225, 135	NC	-	-	-
‘ <i>Candidatus R. wissemanii</i> ’	221, 206, 92, 16, 12	417, 130	153, 135, 66	267, 93	307, 297, 153, 42, 30, 27	636, 220	599, 174, 83

NC - Ausência de sítio de ação para enzima de restrição

× - Anteriormente denominado *Rickettsia parkeri* strain ApPR

* - *Rickettsia parkeri* var. NOD - 159, 135, 66 pb

A verificação de que cinco das 49 (10,2%) sequências do gene *ompA* referentes a espécie *Rickettsia parkeri* apresentaram polimorfismo em sítios de *PstI*, somada ao reconhecimento de múltiplas variedades genótípicas dentro da espécie (NIERI-BASTOS et al., 2018) ressaltaram a necessidade de análise aprofundada dos dados armazenados. Desta forma, foi possível esclarecer que as cinco sequências citadas (JN126318, MF737635, MH351082, MH392534 e MH392532) foram oriundas de *R. parkeri* variedade NOD, com padrão de bandas para *PstI* (*ompA*) = 159, 135 e 66 pb. Tal achado amplia o poder discriminatório do sistema proposto.

Objetivando validar a metodologia proposta, utilizamos o material genético disponível em nossa coleção para produção de amplicon dos alvos selecionados. Estes foram submetidos posteriormente a digestão enzimática, comprovando a capacidade de diferenciação deste protocolo de PCR-RFLP. Os padrões de banda resultantes da digestão de *htrA*, *ompA* (Figura 1) e *ompB* (Figura 2) frente as enzimas selecionadas foram determinados através da eletroforese em gel de agarose, confirmando a capacidade discriminatória da metodologia proposta.

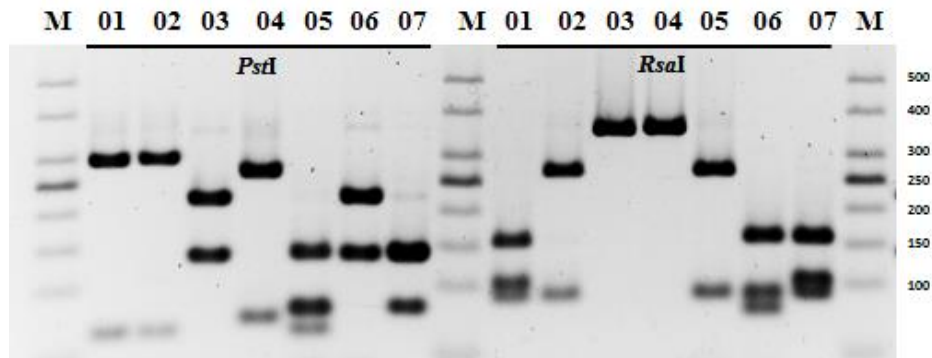


Figura 1. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *PstI* e *RsaI* em fragmento de *ompA* (OmpAdogF/OmpAdogR – 360 pb). Linhas: 01 – *Rickettsia amblyommatis*; 02 – ‘*Candidatus Rickettsia andeanae*’; 03 – ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’; 04 – *R. monteiroi*; 05 – *R. parkeri* (ARF); 06 – *R. rhipicephali*; 07 – *Rickettsia rickettsii*. Eletroforese executada em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) revelado em brometo de etídio. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

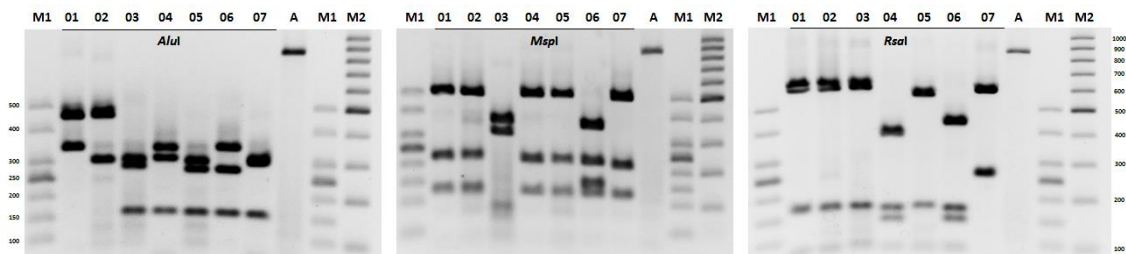


Figura 2. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *AluI*, *MspI* e *RsaI* em fragmento de *ompB* (120-M59/120-807 – 857 pb). Linhas: 01 – *Rickettsia amblyommatis*; 02 – ‘*Candidatus Rickettsia andeanae*’; 03 – *R. felis*; 04 – *R. parkeri* (ARF); 05 – *R. rhipicephali*; 06 – *R. rickettsia*; 07 – *Rickettsia* sp. strain OF; A – Amplicon não clivado. Eletroforese executada em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) revelado em brometo de etídio. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M1) e Marcador 100 pb DNA Ladder (LGC Biotecnologia) (M2).

4 DISCUSSÃO

Os crescentes avanços alcançados nas últimas duas décadas nas áreas de ixodologia e riquetsiologia mudaram consideravelmente a forma como analisamos este potencial agravo a saúde humana e animal. A expansão da fronteira do conhecimento acerca da bioecologia e epidemiologia de *Rickettsia* spp. no Brasil deve-se não somente ao aprimoramento de técnicas de detecção e identificação, mas também ao maior número de estudos a campo que buscaram melhor compreender este gênero microbiano no nosso país (RAMOS et al., 2015; SOARES et al., 2015; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016; DALL'AGNOL et al., 2017; LUZ et al., 2017b, 2018c, 2019; ZERINGÓTA et al., 2017). A grande variedade de espécies de carrapatos e hospedeiros vertebrados presentes em território brasileiro (e os diferentes nichos ecológicos resultantes), potencializam maior variedade de espécies deste gênero, de patogenicidade reconhecida ou não. Como corretamente previsto por Labruna et al. (2004a), o baixo número de espécies de *Rickettsia* reportados na América do Sul até o ano da publicação era possivelmente associado a pouca exploração realizada até então. A recente descrição da espécie *R. paranaensis* (PECKLE et al., 2019), disponibilizada na literatura científica durante a confecção do presente documento, ressalta simultaneamente o dinamismo desta área de estudo e a necessidade de constante atualização para todo e qualquer metodologia que vise detectar e identificar componentes deste grupo de micro-organismo.

A influência do ciclo biológico de carrapatos e aspectos bioecológicos de hospedeiros vertebrados reservatórios e amplificadores de agentes patogênicos agrupam apenas uma parcela das variáveis associadas a ocorrência de DTCs. A realização de repasto sanguíneo em humanos e a maior ou menor disponibilidade do vetor e hospedeiros reservatórios do agente microbiano em determinada região geográfica são alguns dos pontos a serem considerados para compreensão da cadeia de transmissão das doenças vetoriais (LABRUNA, 2009; GUGLIELMONE & ROBBINS, 2018). Adicionalmente, características intrínsecas aos agentes microbianos devem ser também analisadas, possibilitando a predição de seu impacto para saúde humana e animal (CASADEVALL, 2006). Assim, com o aumento no número de espécies e variedades de bactérias do gênero *Rickettsia* associadas a carrapatos no Brasil, amplia-se paralelamente o número de variáveis e questões a serem respondidas acerca do potencial patogênico destes micro-organismos.

A denominada “descrição de patógenos reversa”, que consiste na associação de determinado micro-organismo a processos infecciosos apenas anos após sua inicial descoberta, é muitas vezes o resultado da implementação de abordagens moleculares e aprimoramento de técnicas de diagnóstico (TIJSSE-KLASSEN et al., 2014). Tal feito já foi reportado em micro-organismos do gênero *Rickettsia*, como *R. parkeri* e *R. felis*, com intervalos de 67 e 4 anos, respectivamente, entre sua primeira descrição e associação com processos patogênicos (PARKER et al., 1939; SCHRIEFER et al., 1994; PADDOCK et al., 2004; PADDOCK, 2009). Embora tal ocorrência não deva ser ignorada, sabe-se que a descrição de novas espécies de *Rickettsia* spp. promove pouco impacto direto à saúde humana (PADDOCK, 2009).

Entretanto, o maior número de espécies e variedades atualmente reconhecidos indicam a necessidade de revisão de dados epidemiológicos previamente estabelecidos. Testes sorológicos, como RIFI, são rotineiramente empregados para levantamentos epidemiológicos e ferramenta de auxílio diagnóstico, servindo como norteador para muitos dos estudos ecológicos

com enfoque na associação carrapato-*Rickettsia* (PINTER et al., 2008; TAMEKUNI et al., 2010; SPOLIDORIO et al., 2013; COSTA et al., 2015; VIEIRA et al., 2018a; GRUHN et al., 2019). O reconhecimento de reações cruzadas dentre os diferentes componentes do gênero (DA COSTA et al., 2005; PADDOCK, 2009), bem como a possibilidade de não reatividade das novas espécies frente ao painel antigênico usualmente empregado, destacam a possível necessidade de reavaliação de tais achados, frente as novas classificações taxonômicas. Adicionalmente, há ainda a possibilidade de superestimação no número de processos infecciosos ao considerarmos apenas os dados referentes a titulação sorológica, tendo em vista novamente a ocorrência de reação cruzada por espécies não-patogênicas. Assim, como detalhadamente exposto por Paddock (2009), informações acerca da taxa de letalidade desta enfermidade, por exemplo, podem ser subestimados pelo acréscimo de resultados sorológicos positivos associados a espécies de baixo ou nenhum potencial patogênico (PADDOCK, 2009).

Outra possível repercussão epidemiológica acerca da maior variabilidade de espécies de *Rickettsia* relaciona-se as interações microbianas no vetor. Reconhece-se atualmente a ocorrência de coinfeção em carrapatos por micro-organismos patogênicos ou não, bem como alguns dos seus efeitos na biologia do ectoparasita (NARASIMHAN et al., 2014; ESTEVE-GASSENT et al., 2016; ESTRADA-PEÑA et al., 2017b; CABEZAS-CRUZ et al., 2018). A possível predileção de bactérias *Rickettsia* spp. com baixo ou nenhum potencial patogênico, em detrimento das espécies sabidamente patogênicas, durante a transmissão vertical de micro-organismos pela via transovariana, destaca um importante papel interferente destas novas espécies para manutenção de agentes infecciosos na natureza e, conseqüentemente, na epidemiologia de DTCs (BURGDORFER & HAYES, S.F., MAVROS, 1981). Este assunto será abordado em maior detalhe no Capítulo III do presente documento.

Similar ao observado em testes sorológicos, ferramentas moleculares também estão sujeitas a critérios de especificidade e sensibilidade, como exemplificado pelos resultados obtidos no presente capítulo. Inicialmente detectado em associação com *Amblyomma incisum* capturados em SP, a tentativa de amplificação do gene *ompA* (empregando os primers 190.70/190.602n) para *Rickettsia monteiroi* foi infrutífera (PACHECO et al., 2011). A partir da utilização dos novos primers *ompAdogF/ompAdogR* foi possível amplificar esta região gênica, com posterior confirmação por reação de restrição enzimática e sequenciamento nucleotídico, sugerindo impossibilidade de anelamento dos oligonucleotídeos iniciadores anteriormente aplicados. Com o aumento no número de espécies reportadas em território nacional, faz-se necessário garantir a eficácia dos pares de primer comumente utilizados para detecção e identificação de *Rickettsia* spp., frente a estes novos micro-organismos.

Da mesma forma, abordagens moleculares independentes de sequenciamento também requerem constante revisão ao reconhecermos novas classificações taxonômicas. Similar ao desenvolvido no presente estudo, protocolos baseados em PCR-RFLP com enfoque na identificação de componentes do gênero *Rickettsia* foram previamente publicados na literatura, abordando múltiplas espécies e alvos moleculares (EREMEEVA et al., 1994; MATSUMOTO & INOKUMA, 2009; PENICHE-LARA et al., 2013). No Brasil, tal alternativa foi proposta por Santolin et al. (2013), com o propósito de caracterizar todas as espécies de *Rickettsia* associadas a carrapatos em território nacional (com a adição da espécie argentina *R. massiliae*), até aquele momento. Embora sua aplicabilidade tenha sido comprovada em estudos ecológicos, possibilitando o processamento de grande número de exemplares a custo reduzido (LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017), a descrição de novas espécies nos últimos anos tornou o protocolo sugerido obsoleto. Em contrapartida, a inviabilidade financeira para a implementação de técnicas de sequenciamento para a identificação bacteriana em larga escala, bem como limitações técnicas de muitos laboratórios de pesquisa, justificativas apresentadas pelos autores,

continuam bastante atuais. Com isso, a necessidade de implementação de ferramentas alternativas e menos onerosas para analisar produtos de PCR é um fator importante para possibilitar a análise preliminar e seleção de grupos representativos para o sequenciamento.

Quando comparados as informações publicadas por Santolin et al. (2013), os dados aqui apresentados evidenciam novamente o crescente número de espécies (e variedades) de *Rickettsia* associadas a carrapatos reportadas no Brasil e países circunvizinhos. A adição de *R. andeanae*, *Rickettsia asemonensis*, ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’, *Rickettsia* sp. strain OF, *R. paranaensis*, e ‘*Candidatus Rickettsia wissemanni*’ eleva para 15 o número de componentes do gênero nestas condições. Entretanto, a análise *in silico* e, posterior confirmação *in vitro*, determinou o potencial discriminatório da técnica de PCR-RFLP para o fim proposto. Através dos alvos moleculares e enzimas de restrição selecionados, torna-se impossível distinguir apenas as espécies *R. parkeri* e ‘*Candidatus Rickettsia paranaensis*’, entre si. Este limitador é esperado, ao considerarmos que até recentemente ‘*Candidatus Rickettsia paranaensis*’ era classificada como variedade de *R. parkeri* (var. ApPR) (PECKLE et al., 2019). Em contrapartida, através da digestão de *ompA* empregando a enzima *Pst*I torna-se possível separar *R. parkeri* var. NOD dos demais genótipos desta espécie (NIERI-BASTOS et al., 2018).

O reconhecimento de novas espécies é muitas vezes acompanhado de múltiplos relatos subsequentes ao primeiro. O micro-organismo ‘*Candidatus Rickettsia andeanae*’, inicialmente descrito no Peru (BLAIR et al., 2004), foi posteriormente detectado em associação a carrapatos em diversos países do continente americano (JIANG et al., 2012). No Brasil, sua presença já foi reportada em diferentes regiões, sendo inclusive detectado em moscas *Trichobius joblingi* no estado do RJ (LUGARINI et al., 2015; WITTER et al., 2016; DO AMARAL et al., 2018). O mesmo pode ser verificado para ‘*Candidatus Rickettsia colombianensi*’, que foi primeiramente descrita em associação com *Amblyomma dissimile* na Colômbia (MIRANDA et al., 2012), com detecção subsequente em Honduras (NOVAKOVA et al., 2015) e Brasil (LUZ et al., 2018c; OGRZEWALSKA et al., 2019). Mesmo considerando a capacidade de dispersão de agentes vetoriais, o mais provável é que estas bactérias já se encontravam distribuídas de forma mais ampla no continente e apenas com o aprimoramento nas técnicas de detecção e discriminação, estas novas descrições tornaram-se alcançáveis.

Através da técnica proposta, foi possível identificar corretamente não somente amostras previamente caracterizadas de múltiplas espécies de *Rickettsia*, mas também amostras oriundas de estudos a campo. A atividade de apenas quatro enzimas de restrição de baixo custo, frente a três alvos moleculares usualmente empregados no estudo de riquetsias (um deles utilizando novo par de primers), facilita a implementação da técnica por diferentes grupos de pesquisa. A capacidade de visualização das bandas resultantes a partir de gel de agarose é outro ponto positivo que deve ser ressaltado. Com esta alternativa, menos onerosa e mais rápida, assim como detalhado na metodologia descrita no Capítulo I, promove-se uma redução de aproximadamente 97,31% no valor necessário para identificar uma amostra (percentual obtido em comparação com o custo necessário para sequenciamento da dupla-fita de DNA). Entretanto, recomenda-se que uma parcela das amostras trabalhadas seja submetida ao sequenciamento molecular, fornecendo meios adicionais para validação de resultados futuros (VESTERLUND et al., 2014). Adicionalmente, os conhecimentos já obtidos acerca da biologia destas bactérias devem ser também considerados. A correlação entre micro-organismos endossimbiontes e espécies de carrapatos já se encontram estabelecidos na literatura e qualquer dado diferente do habitualmente verificado deve também ser submetido a análises adicionais (LABRUNA, 2009).

Assim, a associação entre as metodologias propostas no Capítulo I e II fornecem subsídios para continuidade da pesquisa científica na área de ixodologia e riquetsiologia no Brasil, mesmo frente a redução de investimento em ciência atualmente observados (MOURA & CAMARGO JUNIOR, 2017). Contudo, o reconhecimento de novas espécies para este gênero bacteriano ocorre continuamente (MOREIRA-SOTO et al., 2017; HALAJIAN et al., 2018), bem como a possibilidade de dispersão e introdução de espécies já conhecidas em novos territórios (LUZ et al., 2018c, 2019), fazem com que seja necessária a revisão contínua de métodos de detecção e identificação de micro-organismos do gênero *Rickettsia*.

CAPÍTULO III

**COINFECÇÃO DE *Rickettsia bellii* E *Rickettsia* DO GRUPO FEBRE
MACULOSA EM CARRAPATOS *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari:
Ixodidae) COLETADOS DE AVES SILVESTRES NO BRASIL**

RESUMO

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Coinfecção de *Rickettsia bellii* e *Rickettsia* do Grupo Febre Maculosa em Carrapatos *Amblyomma Koch, 1844* (Acari: Ixodidae) Coletados de Aves Silvestres no Brasil.** 2019. 16p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

A bactéria *Rickettsia bellii* foi previamente detectada em 25 espécies de carrapatos no continente americano. Embora seu potencial patogênico seja ainda desconhecido, um dos possíveis papéis desempenhados por esta espécie consiste no fenômeno de interferência na transmissão transovariana de componentes sabidamente patogênicos do grupo febre maculosa (“Spotted Fever Group” – SFG). Embora este fator tenha sido sugerido, a ocorrência de coinfecção por múltiplas espécies do gênero *Rickettsia* em um mesmo exemplar de carrapato é um evento ainda pouco reportado em estudos que tentam melhor entender a relação entre estes ectoparasitas e os micro-organismos por eles albergados. Os métodos moleculares tradicionalmente empregados para a detecção e identificação de *Rickettsia* spp. em carrapatos utilizam frequentemente alvos localizados apenas em *Rickettsia* SFG. Tal abordagem pode resultar na não detecção de coinfecção associada com *R. bellii*. Desta forma, genes que codificam antígenos de superfície celular (“Surface Cell Antigen” – Sca) *sca9* e *sca14* foram empregados para o desenvolvimento de PCRs espécie-específicos para detecção de *R. bellii*. Os protocolos sugeridos foram validados em 150 exemplares de carrapatos *Amblyomma* spp. obtidos de aves silvestres nos estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais, Brasil. A coinfecção por múltiplos agentes deste gênero microbiano foi confirmada através de novos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação do gene *ompA*, característico para *Rickettsia* SFG. A caracterização preliminar em nível de espécie foi alcançada através da análise por “Restriction Fragment Length Polymorphism” (RFLP) e subsequente sequenciamento dos produtos de PCR. Um total de 9/73 (12,3%) dos *Amblyomma longirostre* e 1/2 *A. calcaratum* apresentaram coinfecção por *R. bellii* e *R. amblyommatis*, enquanto 2/67 (3%) dos exemplares caracterizados como *A. romarioi* eram coinfectados por *R. bellii* e *R. paranaensis*. Os protocolos de detecção e identificação aqui reportados oferecem uma alternativa rápida e menos onerosa (relativa a estratégias baseadas no sequenciamento de marcadores genéticos ou qPCR) para avaliar a ocorrência de coinfecção em carrapatos, um fenômeno que pode ter sido subestimado até o presente momento.

Palavras-chave: Rickettsiae, *Rickettsia bellii*, ixodídeos, PCR-RFLP, microbioma

ABSTRACT

ABREU, Daniel Paiva Barros de. ***Rickettsia bellii* and *Rickettsia* Spotted Fever Group Coinfection in *Amblyomma Koch, 1844* (Acari: Ixodidae) Ticks Collected from Wild Birds in Brazil.** 2019. 16p. Thesis. (Doctorate in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The bacterium *Rickettsia bellii*, has been detected in 25 species of ticks in the American continent, but its pathogenic potential is considered as undetermined. A possible role for this species in the phenomenon of transovarial exclusion of pathogenic members of the spotted fever group (SFG), of *Rickettsia* has been suggested and co-infections with pathogenic species have been reported infrequently in both North and South America. Traditional methods for the molecular detection of rickettsial agents in ticks focus largely on the identification of sequences found in SFG *Rickettsia*, an approach that may overlook the presence of co-infections with *R. bellii*. Two novel, species-specific polymerase chain reaction (PCR) assays, targeting the genes encoding the surface cell antigen (Sca), autotransporter proteins sca9 and sca14, were developed and validated for the detection of *R. bellii* in a sample of 150 *Amblyomma* ticks collected from wild birds in Brazil. Rickettsial co-infection of *R. bellii* infected ticks was evaluated using a novel PCR assay targeting the *ompA* sequence characteristic of SFG *Rickettsia*. Preliminary species level identification was achieved by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and subsequently confirmed by sequencing of amplicons. A total of 9/73 (12.3%), *Amblyomma longirostre* and 1/2 *Amblyomma calcaratum* ticks were shown to be co-infected with *R. bellii* and *Rickettsia amblyommatis*, while 2/67 (3%), of *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré ticks were recorded as co-infected with *R. bellii* and the *Rickettsia parkeri*-like bacterium, strain ApPR. The novel PCR-RFLP system reported herein, provides an alternative, rapid and cost efficient (relative to strategies based on sequencing or real time PCR), approach to evaluate rickettsial co-infection of ticks, a potentially significant phenomenon that has most likely been underestimated to date.

Keywords: Rickettsiae, ixodid ticks, PCR-RFLP, microbiome

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* compreende um grupo diverso de bactérias Gram-negativas de desenvolvimento intracelular obrigatório e com notória relevância como patógenos transmitidos por vetores para humanos e animais, destacando componentes do SFG (PAROLA et al., 2013; DE LA FUENTE et al., 2017). O verdadeiro impacto das infecções em humanos por componentes deste gênero é possivelmente subestimado, devido a fatores como o diagnóstico incorreto, similaridade sintomatológica com outras enfermidades febris, ausência de informação acerca das riquetsioses entre os profissionais da saúde e carência de testes diagnóstico convenientes e acessíveis (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016).

A espécie *Rickettsia bellii* não pertence ao grupo febre maculosa e possui patogenicidade desconhecida. Esta bactéria foi primeiramente reportada no Brasil em 2004, infectando cinco espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA et al., 2004c). Desde então, novos relatos foram publicados, com associação a outras sete espécies de *Amblyomma*, bem como *Ixodes loricatus* e *Haemaphysalis juxtakochi* (PAROLA et al., 2013; MCINTOSH et al., 2015; COSTA et al., 2017a; LUZ et al., 2018c). A incerteza acerca do potencial patogênico desta espécie bacteriana foi baseada na observação do desenvolvimento de escaras posterior a inoculação subcutânea em estudos *in vivo* (OGATA et al., 2006), sintoma considerado característico para diversas riquetsioses (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2014). Adicionalmente, dados sorológicos em estudos brasileiros indicaram a capacidade de infectar naturalmente capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (PACHECO et al., 2007), cães (SPOLIDORIO et al., 2013) e equinos (VIEIRA et al., 2018a), embora sem evidência do papel destas espécies animais como amplificadoras do agente na natureza, estratégia usualmente empregada por *Rickettsia* SFG patogênicas, incluindo *R. rickettsii* e *R. conorii* (PAROLA et al., 2013). Dados adquiridos a partir de colônias de *Amblyomma dubitatum* (SAKAI et al., 2014) e *Ixodes loricatus* (HORTA et al., 2006b) naturalmente infectadas demonstraram a elevada eficiência para manutenção e perpetuação desta bactéria pelas vias transovarianas e transestadial, sugerindo serem estes os principais mecanismos de manutenção deste agente na natureza.

A possível interferência resultante da coinfeção por múltiplos agentes do gênero *Rickettsia* foi inicialmente proposta por Burgdorfer & Hayes (1981), baseada na observação epidemiológica e avaliação experimental da transmissão transovariana. Sugeriu-se que a infecção primária por uma espécie (*R. peacockii*) interfere negativamente na infecção ovariana de uma segunda espécie (*R. rickettsii*) em carrapatos da espécie *Dermacentor andersonii* nos EUA. Exemplos adicionais deste efeito excludente foram subsequentemente reportados em carrapatos *Dermacentor variabilis* coinfectados com *R. rhipicephali* e *R. montanensis* (MACALUSO et al., 2002) e *Amblyomma dubitatum* coinfectados por *R. rickettsii* e *R. bellii* (SAKAI et al., 2014). Este fenômeno tem sido apresentado como a explicação mais plausível para a aparente exclusão de *R. parkeri* em populações adultas de carrapatos *A. maculatum* em alguns estados dos EUA, onde existe elevada prevalência de ‘*Candidatus Rickettsia andeanae*’ (PADDOCK et al., 2015; LEE et al., 2017).

Coinfecções envolvendo a bactéria *Rickettsia bellii* e outras espécies do gênero *Rickettsia* foram reportadas na literatura. A ocorrência de coinfeção envolvendo *R.*

rhhipicephali em *Dermacentor variabilis* coletados no estado de Arkansas, EUA (WIKSWO et al., 2008), *R. montanensis* e *R. rickettsii* em *D. variabilis* coletado no estado de Ohio, EUA (CARMICHAEL & FUERST, 2010), e *R. parkeri* em *Amblyomma ovale* no Brasil (SZABÓ et al., 2013a) exemplificam tal evento esporádico. Nestes três casos, a evidência inicial de coinfeção foi baseada na observação de picos duplos em múltiplos pares de base através do eletroferograma resultante de produtos de PCR específicos para o gênero, como *gltA* (WIKSWO et al., 2008; SZABÓ et al., 2013a) ou *htrA* (CARMICHAEL & FUERST, 2010). A confirmação da presença de *R. bellii* foi subsequente alcançada através da implementação de PCR espécie-específicos tendo como alvo o gene *gltA*. Como uma alternativa para facilitar a detecção diferencial de *R. bellii* em carrapatos, Hecht et al. (2016) reportaram o desenvolvimento e validação de ensaio qPCR para detecção de *R. bellii*, utilizando novamente o gene *gltA* como alvo.

Assim, o presente trabalho reporta o desenvolvimento e avaliação de uma nova abordagem molecular mais rápida e menos onerosa para investigar o fenômeno de coinfeção em carrapatos por *R. bellii* e agentes *Rickettsia* SFG, através do desenvolvimento de PCRs espécie-específicos para detecção desta espécie de micro-organismo.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 DNA de Carrapatos Identificados e Positivos para *Rickettsia* SFG

As amostras de DNA empregadas no presente estudo (n = 150) foram selecionadas da Coleção de Ácidos Nucléicos de Artrópodes do LMBM/DPA/UFRRJ. Tais amostras foram previamente coletadas e caracterizadas em nível de espécie através da amplificação e sequenciamento de fragmento do gene mitocondrial 16S rRNA (MANGOLD et al., 1998), sendo ainda positivas quanto a presença de membros do gênero *Rickettsia* SFG através da análise dos genes *htrA* (LABRUNA et al., 2004c), *gltA* (ROUX & RAOULT, 2000; MEDIANNIKOV et al., 2004), *ompA* (REGNERY et al., 1991) e *ompB* (ROUX & RAOULT, 2000). Todos os exemplares empregados são oriundos de estudos prévios com enfoque nas interações pássaro-carrapato-*Rickettsia* em quatro regiões distintas de Mata Atlântica em território nacional. Amostras oriundas do Parque Nacional da Serra dos Órgãos e Parque Nacional de Itatiaia – RJ, entre os anos de 2014 e 2015 (IBAMA, processo número 43917/3/2505369) (LUZ et al., 2017b), bem como carrapatos coletados de aves coletadas na Reserva Biológica Federal do Tinguá – RJ, no período entre 2011 e 2012, foram consideradas na presente análise (IBAMA – processo, número 27967-2) (SANTOLIN et al., 2013). Adicionalmente, selecionamos exemplares obtidos no Jardim Botânico da UFJF – MG, entre os anos de 2014 e 2015 (SISBIO, protocolo número 29268) (ZERINGÓTA et al., 2017). A extração das amostras de DNA ocorreu através do método bead-beater/fenol-clorofórmio, como descrito por Santolin et al. (2013).

A seleção de amostras avaliadas foi realizada aleatoriamente, exceto por dois exemplares de *Amblyomma longirostre* coletados em MG no ano de 2015 e confirmados quanto a presença de *Rickettsia amblyommatis* através do sequenciamento de fragmentos de *ompA* e *ompB* (ZERINGÓTA et al., 2017). Tentativas prévias de sequenciamento de fragmento do gene *gltA* nestas duas amostras não foram bem-sucedidas, devido a aparente baixa qualidade dos eletroferogramas, que demonstraram picos duplos em diversos pontos da sequência. Entretanto, nova análise detalhada das sequências sugeriu que estes exemplares possuíam dois produtos de PCR distintos de *gltA*, um correspondendo a *R. amblyommatis* e outro referente a *R. bellii*. Desta forma, a identificação destas duas amostras coinfectadas serviu de estímulo para o desenvolvimento da metodologia proposta a seguir. Detalhes das amostras empregadas no presente estudo podem ser verificadas na Tabela 1 e material em Anexo C.

Tabela 1. Amostras de carrapatos sabidamente positivas para *Rickettsia* grupo febre maculosa e selecionadas para a presente avaliação

Carrapato (n total)	<i>Rickettsia</i>	n
<i>Amblyomma calcaratum</i> (2)	<i>Rickettsia amblyommatis</i>	2
<i>Amblyomma longirostre</i> (73)	<i>Rickettsia amblyommatis</i>	73
<i>Amblyomma parkeri</i> (8)	‘ <i>Candidatus Rickettsia paranaensis</i> ’*	8
<i>Amblyomma romarioi</i> (67)	‘ <i>Candidatus Rickettsia paranaensis</i> ’*	37
	<i>Rickettsia riphicephali</i>	30

* Previamente denominada *Rickettsia parkeri* strain ApPR

2.2 Desenvolvimento de PCR espécie-específico para *Rickettsia bellii*

Os alvos selecionados para o desenvolvimento de oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Rickettsia bellii* foram quatro genes que codificam antígenos de superfície celular (*sca3*, *sca8*, *sca9* e *sca14*) (SEARS et al., 2012). Sequências completas dos genes foram obtidas a partir de informações depositadas no GenBank (<http://ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (CLARK et al., 2016) (Números de acesso: AY973495, AY973496, AY973497, A970512) e primers foram desenvolvidos, almejando produtos de PCR com aproximadamente 700 pb, utilizando o software on-line Primer3 (<http://primer3.ut.ee/>) (UNTERGASSER et al., 2012). A especificidade dos primers foi avaliada *in silico* empregando o software on-line primerBLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (YE et al., 2012). Tal etapa é especialmente necessária ao considerarmos a origem ambiental e complexa das amostras de carrapato a serem examinadas, contendo muitas vezes sangue do hospedeiro vertebrado e microbiota diversa. Os primers selecionados para avaliação encontram-se listados na Tabela 2.

Tabela 2. Sequência de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação dos diferentes genes para síntese de antígenos de superfície celular (*sca*) desenvolvidos no presente estudo

Alvo	Primer	Sequência do primer (5´-3´)	Fragmento (pb)
<i>sca3</i>	Forward	CCA CTA TTA ATT TTA ACG GGG CA	654
	Reverse	TAC CCG TAC CAC CGC TAA AC	
<i>sca8</i>	Forward	ACG ATT GAA AGA GCA GAC GG	723
	Reverse	ACC ACC GGA AGT ATG ACC TC	
<i>sca9</i>	Forward	CAG CAG CCT TTC ACG TTT CT	727
	Reverse	ACT CCA ATG TCA GCA ATA CTA GG	
<i>sca14</i>	Forward	CCA CAG AAT TTG CAC CAC GT	724
	Reverse	TTT GTT TGA GCA CTC GGT ATT TT	

A composição dos “master-mixes” e condições de termociclagem foram otimizadas empregando três concentrações distintas de MgCl₂ (2,0 mM, 2,5 mM e 3,0 mM) e gradiente considerando o intervalo de 57 °C ± 5 °C, utilizando DNA de *Rickettsia bellii* (cepa Mogi – gentilmente cedida pelo Dr. Marcelo Labruna, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, USP, Brasil) como controle positivo. Originariamente extraído de cultura celular, o DNA da amostra não pode ser satisfatoriamente quantificado. Desta forma,

para estimar a quantidade de DNA de *Rickettsia* presente na amostra, realizamos a diluição seriada da amostragem em tampão AE (10 mM Tris-Cl, 0,5 mM EDTA – pH 9,0) das concentrações 10^{-1} a 10^{-6} . A determinação do limite de diluição detectável foi realizada utilizando o par de primers 17KDF (5'-GGA ACC AGG CGG TAT GAA TAA-3') e 17KDR (5'-ACT TGC CAT AGT CCG TCA GG-3') que amplificam fragmento de 407 pb do gene *htrA*, como reportado por Santolin et al. (2013), empregando as concentrações de reação e condições de termociclagem descritas por Zeringóta et al. (2017). Incorporou-se ainda nesta e em todas as etapas posteriores, a adição de dois controles negativos para cada reação, onde os DNAs moldes foram substituídos pela mesma quantidade de H₂O ultrapura. Uma das amostras foi preparada em ambiente livre de DNA, onde os “master-mixes” para cada reação de PCR foram confeccionados e distribuídos. O segundo controle negativo foi finalizado juntamente com a adição de DNA molde em cada microtubo de reação. Desta forma, seria possível detectar casos de contaminação durante o processo de preparação da reação de PCR, desconsiderando os resultados, e implementando medidas corretivas.

A análise comparativa de sensibilidade analítica dos quatro pares de primer desenvolvidos no presente estudo foi determinada empregando as diluições de DNA de *Rickettsia bellii* em combinação com as condições otimizadas para cada reação (temperatura de anelamento e concentração de MgCl₂). O PCR desenvolvido para amplificação dos genes *sca9* e *sca14* apresentaram sensibilidade analítica equivalente a observada para a reação com alvo no gene *htrA*, enquanto os outros dois pares de primer apresentaram capacidade de detecção dez vezes inferior.

A especificidade das reações para *sca9* e *sca14* foram confirmadas utilizando dois tipos distintos de controle negativos. Inicialmente, empregamos DNA extraído de carrapatos do gênero *Amblyomma* previamente negativos para detecção de micro-organismos *Rickettsia* spp. (*Amblyomma aureolatum*, *A. brasiliense*, *A. calcaratum*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. ovale*, *A. parkeri*, *A. romarioi*, *A. sculptum* e *A. varium*) coletados de aves silvestres em território nacional (LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017). Estes exemplares foram avaliados quanto a presença do agente através de reações de PCR para amplificar os alvos *gltA*, *htrA*, *ompA* e *ompB*. Avaliou-se ainda a especificidade frente a amostras de DNA extraído de culturas de célula infectadas com *R. amblyommatis* (cepa AC37), *R. felis* (cepa Pedreira), *R. monteiroi* (cepa 7P), *R. parkeri* (cepa Atlantic Rain Forest-A010), *R. rhipicephali* (cepa HJ5) e *R. rickettsii* (Taiacu) (gentilmente cedidos pelo Dr. Marcelo Labruna). Controles positivos englobaram DNA extraído de sete exemplares de *Amblyomma rotundatum* (5 fêmeas e 2 ninfas) sabidamente positivos quanto a infecção por *R. bellii* (LUZ et al., 2018c). As reações de PCR (12,5 µL) contendo 1,25 µL de Tampão Platinum Taq DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Brasil), 2,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 10 pmoles de cada primer, 0,5 unidades de Platinum Taq DNA polymerase e 2 µl de DNA molde foram submetidos a termociclagem. As condições empregadas foram compostas de desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida de 45 ciclos de desnaturação a 95 °C por 20 s, anelamento a 52 °C por 20 s, extensão a 72 °C por 25 s, finalizando com uma etapa de extensão a 72 °C por 5 min.

Para análise da amplificação resultante, 5 µl do produto final de cada amostra foi analisado através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, com tampão de corrida TAE (0,5x = 20 mM Tris base; 10 mM ácido acético; 0,5 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 40 min. A determinação dos tamanhos de produto foi feita através da comparação visual com marcadores de peso molecular (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, product # SM024, Thermo Scientific). Géis foram corados por submersão em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml), observados e digitalmente registrados em transiluminador. O volume sobressalente de cada reação foi estocado a -20 °C para análises moleculares posteriores.

2.3 Análise Semi-quantitativa das Cargas de *Rickettsia* spp.

Para esta etapa da análise, empregou-se reação desenvolvida para detecção exclusiva de componentes do grupo febre maculosa associados a carrapatos de aves, bem como *R. rickettsii*. Para tanto, o novo par de primers ompAdogF (5'-GCT TTA TTC ACC ACC TCA AC-3') e ompAdogR (5'-GCC GGC AGT AAT AGT AAC AG-3') foi utilizado. Seu desenvolvimento foi detalhadamente descrito no decorrer do capítulo II do presente documento. A composição do “master-mix” e condições otimizadas de termociclagem para a presente reação foram determinadas de maneira similar a previamente reportadas para as reações de *sca9* e *sca14*. Ao compararmos tais reações, a única modificação necessária relaciona-se ao período de extensão de cada ciclo, sendo reduzido para 15 s na amplificação de *ompA*. A determinação de sensibilidade analítica foi executada através da utilização de diluições seriadas de DNA extraído de controles positivos de *Rickettsia* SFG, tendo novamente a reação para *htrA* como padrão comparativo. A garantia de sensibilidade analítica compatível a alcançada para os ensaios de *sca9* e *sca14*, possibilitam a realização da análise semi-quantitativa almejada.

A carga microbiana relativa para as múltiplas espécies de *Rickettsia* detectadas em carrapatos coinfectados foi determinada pela divisão do valor da última diluição a apresentar amplificação na reação para *ompA* pelo valor equivalente no ensaio para *sca9* ou o inverso, quando o valor detectado de *sca9* foi superior ao verificado para o PCR específico a agentes do grupo febre maculosa.

2.4 Identificação dos Produtos de PCR

Considerando a complexidade das amostras de DNA empregadas no presente estudo, viu-se a necessidade de realizar análise pós-amplificação para todas as amostras positivas para *R. bellii* através do sequenciamento molecular, como reportado por Luz et al. (2017). Avaliou-se adicionalmente a possibilidade de empregar a técnica de PCR-RFLP como uma alternativa rápida e de custo reduzido para confirmação dos resultados. Através do software gratuito NEBcutter V2.0 (<http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) (VINCZE et al., 2003), realizou-se análise *in silico* buscando por enzimas de restrição capazes de fornecer padrões de bandas confirmatórios para os produtos obtidos nas novas reações de *sca9* e *sca14* aqui descritas. Determinou-se então, a capacidade discriminatória das enzimas de restrição *AluI* (AG[^]CT) para *sca9* e *EcoRV* (GAT[^]ATC) para *sca14*. Para confirmação dos produtos de *ompA* obtidos, foram utilizadas as enzimas *PstI* (CTGCA[^]G) e *RsaI* (GT[^]AC), como reportado no capítulo II do presente documento.

As digestões enzimáticas foram realizadas em um volume final de 12 µl, contendo 5 µl do produto de PCR a ser avaliado, 1,2 µl do tampão de reação enzimática próprio para cada enzima, 1,2 U da enzima de restrição selecionada e 1,2 µl de soro albumina bovina (0,1 mg/ml), com incubação a 37 °C por 3 h. Os padrões de PCR-RFLP resultantes após a digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2,5% com tampão de corrida TBE (44,5 mM Tris base; 44,5 mM borato; 1 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 90 min. O procedimento de coloração e registro dos géis ocorreu como descrito previamente para avaliação dos produtos de PCR. Objetivando melhor predição do tamanho nos fragmentos resultantes, a análise comparativa foi feita com o auxílio de marcador de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371 Thermo Scientific). Adicionalmente, as imagens resultantes foram analisadas através do software gratuito Gel Analyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>) (SKOSYREV et al., 2013) para determinação do tamanho individual de cada fragmento de forma acurada, empregando o marcador de peso molecular como parâmetro para a calibração do software.

3 RESULTADOS

Os oligonucleotídeos iniciadores desenvolvidos para amplificação dos quatro alvos *sca* foram considerados específicos para detecção de *Rickettsia bellii*, baseado na análise *in silico* e não produção de amplicon em amostras de carrapato negativas para *Rickettsia* ou DNA purificado de outras espécies deste gênero bacteriano. Através da utilização de diluições seriadas do controle *R. bellii* (cepa Mogi) e reação previamente desenhada e estabelecida de *htrA* como padrão foi possível determinar sensibilidade analítica equivalente para as reações *sca9* e *sca14*, com capacidade de detecção de DNA até a diluição 10^{-5} . Em contraste, para as reações com alvo em *sca3* e *sca8* foi possível amplificar apenas amostras diluídas até o fator 10^{-4} , evidenciando menor capacidade de detecção do DNA alvo, o que resultou na exclusão destes pares de primer nas análises posteriores (Figura 1). Complementarmente, os produtos de *sca9* e *sca14* obtidos a partir das sete amostras de *Amblyomma rotundatum* naturalmente infectados por *R. bellii* indicaram a capacidade de emprego destas reações para avaliação de amostras a campo. Contudo, foi possível verificar que todas as amostras apresentaram bandas de *sca14* menos intensas em gel de agarose (Figura 2).

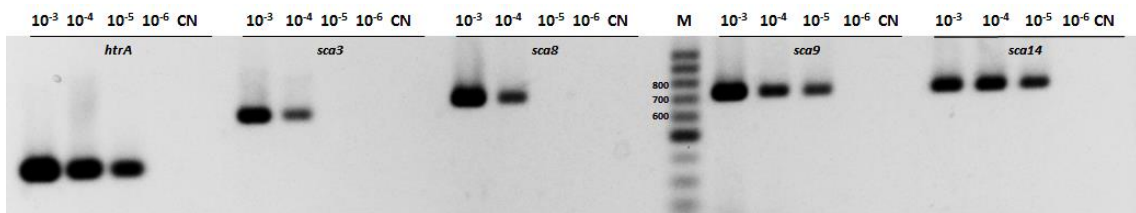


Figura 1. Amplificação de PCR obtidos para *htrA* (17KDF/17KDR – 407 pb), *sca3* (BSCA_3F/BSCA_3R – 654 pb), *sca8* (BSCA_8F/BSCA_8R – 723 pb), *sca9* (BSCA_9F/BSCA_9R – 728 pb) e *sca14* (BSCA_14F/BSCA_14R – 724 pb). Linhas: *Rickettsia bellii* 10^{-3} - 10^{-6} ; CN – Controle negativo. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em Marcador 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific (M)). Eletroforese executada em gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x).

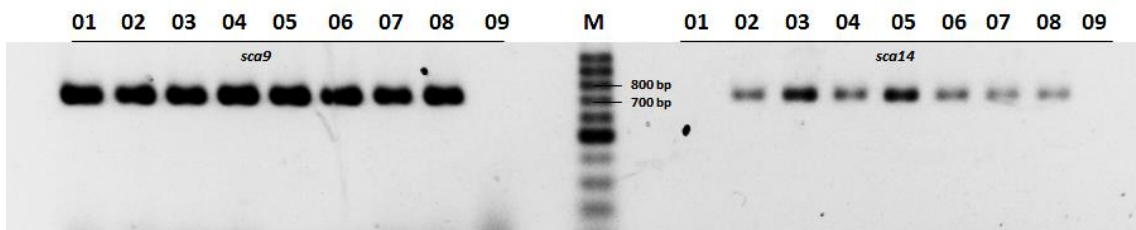


Figura 2. Amplificação de PCR obtidos para *sca9* (BSCA_9F/BSCA_9R – 728 pb) e *sca14* (BSCA_14F/BSCA_14R – 724 pb). Linhas: 01-07 - DNA total de exemplares de *Amblyomma rotundatum* sabidamente positivas para *Rickettsia bellii* (LUZ et al., 2018c); 08 - *Rickettsia bellii* (cepa Mogi); 09 - controle negativo. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M). Eletroforese executada em gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x).

A sensibilidade analítica do novo ensaio para amplificação de *ompA* foi similar a verificada para reação *htrA*, utilizando diversos controles positivos de componentes do grupo febre maculosa (*Rickettsia amblyommatis*, *R. monteiroi*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* e *R. rickettsii*). Sua especificidade foi confirmada pela não amplificação nas amostras controle de *R. felis* e *R. bellii*, bem como nas sete amostras selecionadas de *Amblyomma rotundatum*. O amplicon gerado pelo controle positivo *R. monteiroi* (cepa 7P) foi submetido a sequenciamento, demonstrando 85% de similaridade (276/320 nucleotídeos) a sequências KT899079 e KU361217, depositadas no GenBank como sequência parcial de *ompA* oriundo da bactéria ‘*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*’ detectada no carrapato *Ixodes persulcatus* na Rússia e Mongólia, respectivamente. A nova sequência de *ompA* de *R. monteiroi* foi depositada no GenBank sob o número de acesso MK166031.

As 150 amostras de DNA (ANEXO C) foram avaliadas empregando as reações com alvo para *sca9* e *sca14*. Um total de 12 (8%) exemplares englobando nove (9) *Amblyomma longirostre* e um (1) *A. calcaratum* positivos para *Rickettsia amblyommatis*, somado a dois (2) *Amblyomma romarioi* positivos para ‘*Candidatus R. paranaensis*’ geraram produtos de PCR de tamanho esperado em ambas as reações (Figura 3A). Ressalta-se que novamente foi observada menor intensidade de bandas nos produtos de reação para *sca14*. A caracterização de *R. bellii* foi alcançada através do sequenciamento molecular dos produtos de *sca9* e *sca14*, confirmando a ocorrência de coinfeção nestas 12 amostras.

Um único ponto de polimorfismo foi detectado na amostra de *A. calcaratum* positiva, resultando em substituição sinônima no nucleotídeo de posição 1193 da sequência completa de *sca9* depositada no banco de dados molecular (número de acesso AY973497). A nova sequência foi depositada sob o número de acesso MK253742. A confirmação de identificação foi também alcançada através da digestão do produto *sca9* com a enzima de restrição *AluI*, gerando padrão de bandas idêntico ao previsto na avaliação *in silico* e verificado na amostra controle *R. bellii* (cepa Mogi) (396, 185, 82, 46 e 18 pb) (Figura 3B).

A presença de *Rickettsia* SFG foi novamente confirmada, através do ensaio desenvolvido para amplificação de *ompA* (Figura 4A). Digestão dos produtos desta reação confirmaram a identificação em nível de espécie de *R. amblyommatis* em dez (10) carrapatos e ‘*Candidatus R. paranaensis*’ em dois (2) (Figura 4B).

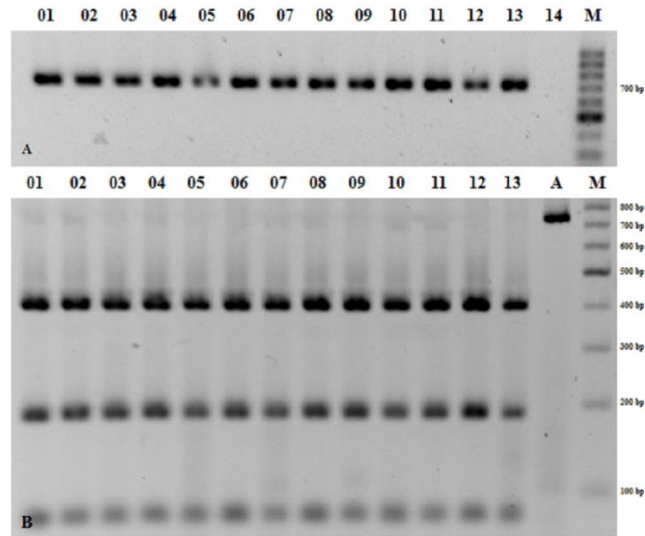


Figura 3A. Eletroforese em gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) de amplificação por PCR de fragmento do gene *sca9* (BSCA_9F/BSCA_9R – 728 pb) em DNA total de carrapatos sabidamente positivos para *Rickettsia* grupo febre maculosa (SFG). Linhas: 01 - 3133.19; 02 - 3122.16; 03 - 3160.1; 04 - 3130.8; 05 - L36; 06 - V22A; 07 - V5D; 08 - V7C; 09 - V7D; 10 - 3130.18; 11 - 35NAZ; 12 - 13bNAZ; 13 - *Rickettsia bellii* (cepa Mogi); 14 - Controle negativo. **3B.** Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) de padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonuclease de restrição *AluI* em fragmento do gene *sca9* obtido. Linhas: A – Amplicon não clivado; 01-13 – Amostras identificadas na figura 4A. Revelação de géis em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em Marcador 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

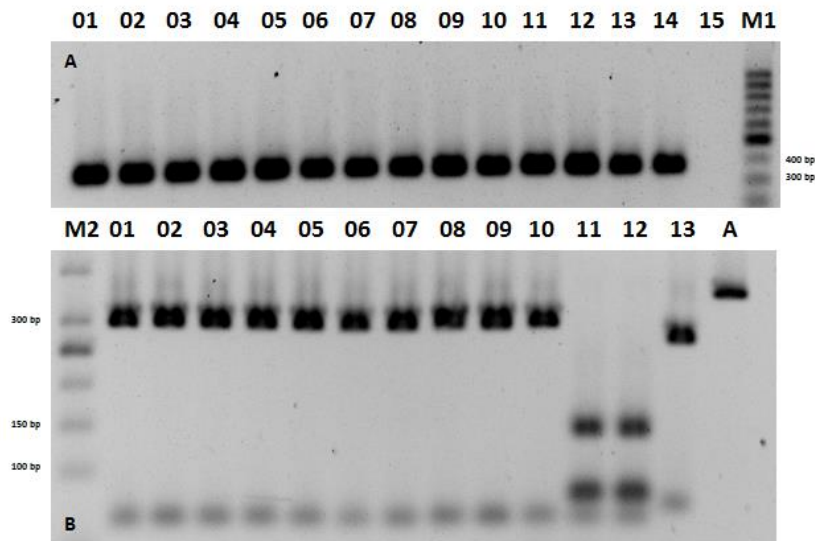


Figura 4A. Eletroforese em gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) de amplificação por PCR de fragmento do gene *ompA* (OmpAdogF/OmpAdogR – 357 pb) em DNA total de carrapatos sabidamente positivos para *Rickettsia* grupo febre maculosa (SFG). Linhas: 01 - 3133.19; 02 - 3122.16; 03 - 3160.1; 04 - 3130.8; 05 - L36; 06 - V22A; 07 - V5D; 08 - V7C; 09 - V7D; 10 - 3130.18; 11 - 35NAZ; 12 - 13bNAZ; 13 - *Rickettsia monteiroi* (cepa 7P) 10^{-1} ; 14 - *R. monteiroi* (cepa 7P) 10^{-2} ; 15 – Controle negativo **4B.** Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) de padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonuclease de restrição *PstI* em fragmento do gene *ompA* obtido. Linhas: 1-13 – Amostras identificadas na figura 4A; A – Amplicon não clivado. Revelação de géis em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em Marcador 100 pb DNA Ladder (Thermo Scientific) (M1) e GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M2).

Dados da análise semi-quantitativa determinaram as cargas relativas das espécies de *Rickettsia* presentes em cada exemplar avaliado podem ser verificados na Tabela 3.

Tabela 3. Análise semi-quantitativa de carga bacteriana relativa (*Rickettsia bellii* e *Rickettsia* SFG) baseada na amplificação de PCR *sca9* e *ompA* empregando diluições seriadas de DNA extraído de carrapatos coinfectados

ID	Amostra*	Carrapato	Limite de detecção alvo molecular		Quantificação relativa
			<i>sca9</i>	<i>ompA</i>	
01	3133.19	<i>A. longirostre</i>	1:4000	1:2000	2 vezes mais <i>Rickettsia bellii</i>
02	3122.16	<i>A. longirostre</i>	1:2000	1:1000	2 vezes mais <i>Rickettsia bellii</i>
03	3160.1	<i>A. longirostre</i>	1:2000	1:2000	<i>R. bellii</i> = <i>Rickettsia</i> SFG
04	3130.8	<i>A. longirostre</i>	1:1000	1:4000	4 vezes mais <i>Rickettsia</i> SFG
05	L36	<i>A. calcaratum</i>	1:20	1:1000	50 vezes mais <i>Rickettsia</i> SFG
06	V22A	<i>A. longirostre</i>	1:4000	1:400	10 vezes mais <i>Rickettsia bellii</i>
07	V5D	<i>A. longirostre</i>	1:4000	1:200	20 vezes mais <i>Rickettsia bellii</i>
08	V7C	<i>A. longirostre</i>	1:1000	1:400	2,5 vezes mais <i>Rickettsia bellii</i>
09	V7D	<i>A. longirostre</i>	1:10000	1:100	100 vezes mais <i>Rickettsia bellii</i>
10	3130.18	<i>A. longirostre</i>	1:1000	1:100000	100 vezes mais <i>Rickettsia</i> SFG
11	35NAZ	<i>A. romarioi</i>	1:400	1:50000	125 vezes mais <i>Rickettsia</i> SFG
12	13b NAZ	<i>A. romarioi</i>	1:200	1:10000	50 vezes mais <i>Rickettsia</i> SFG

* Detalhes das amostras fornecidos em anexo C

4 DISCUSSÃO

Aves silvestres funcionam como hospedeiros para grande número de indivíduos do gênero *Amblyomma* em estágio imaturo, com múltiplos relatos de infecção por *R. bellii* e *Rickettsia* SFG em carrapatos capturados de aves em diversos biomas (OGRZEWALSKA et al., 2010, 2011b; TOLESANO-PASCOLI et al., 2010; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Um número reduzido de estudos reportou a ocorrência de parasitismo de aves por múltiplas espécies de carrapatos que, por sua vez, encontravam-se infectados por espécies distintas de *Rickettsia* (LUZ et al., 2017a; ZERINGÓTA et al., 2017). Entretanto, não há na literatura a descrição de carrapatos oriundos de aves infectados com duas ou mais espécies de *Rickettsia* spp. Os dados aqui apresentados demonstram pela primeira vez a detecção de carrapatos *A. longirostre* e *A. calcaratum* naturalmente coinfectados com bactérias *R. amblyommatis* e *R. bellii*. Da mesma forma, está e a primeira evidência de que ectoparasitas *Amblyomma romarioi* podem simultaneamente albergar os micro-organismos ‘*Candidatus Rickettsia paranaensis*’, previamente denominado *R. parkeri* variedade ApPR (PACHECO et al., 2012; PECKLE et al., 2019) e *R. bellii*. Adicionalmente, a identificação de *R. bellii* associada a carrapatos *A. calcaratum* e *Amblyomma romarioi* amplia para 16 o número de espécies de ixodídeos associados a este agente em território brasileiro.

O delineamento experimental comumente implementado para o levantamento de carrapatos e *Rickettsia* spp. associadas não sofreu mudanças significativas, desde os primeiros estudos com abordagens moleculares propostos (GAGE et al., 1994; BOUYER et al., 2001). A estratégia envolve a realização de uma primeira rodada de PCRs a partir do DNA extraído de todas as amostras, tendo como alvos moleculares genes específicos para o gênero bacteriano, usualmente *gltA* e/ou *htrA*. Amostras positivas para estas primeiras reações são posteriormente avaliadas quanto a detecção do gene *ompA*, considerado específico para membros do grupo febre maculosa (FOURNIER et al., 2003), seguido do sequenciamento dos produtos de PCR resultantes, o que possibilita o alcance de identificação em nível de espécie. Em estudos envolvendo grande número de amostras positivas para *Rickettsia*, o sequenciamento dos produtos de PCR inicialmente obtidos (*gltA* e *htrA*) limitam-se as amostras negativas para o gene *ompA*, o que rotineiramente resulta na identificação de *R. bellii* (MCINTOSH et al., 2015; LUZ et al., 2017b). Seguindo a análise de sequência nucleotídica de região *ompA* amplificada, comumente sequencia-se apenas uma parcela dos produtos de PCR da primeira rodada, evitando a redundância dos resultados e reduzindo os custos para execução do projeto (LUZ et al., 2017a; ZERINGÓTA et al., 2017).

Empregando esta abordagem metodológica, a detecção de carrapatos coinfectados com *Rickettsia bellii* e outros micro-organismos do gênero torna-se um desafio, onde o único critério potencialmente empregado para este fim seria a detecção de duplos picos nos eletroferogramas de *gltA* e *htrA*, derivados da pequena porção de carrapatos infectados por *Rickettsia* SFG submetidos também ao sequenciamento nucleotídico destas regiões gênicas. Como verificado em estudos previamente executados pelo grupo de pesquisa do laboratório (ZERINGÓTA et al., 2017), este dado pode ser negligenciado ou erroneamente interpretado como resultado de baixa qualidade na reação de sequenciamento. Através da busca ativa pela presença de *R. bellii* nos exemplares avaliados, como demonstrado no presente estudo, a detecção de coinfeção por *R. bellii* será otimizada. Como resultado, aprimoraremos nossa compreensão acerca do papel desta espécie de patogenicidade desconhecida na bioecologia de infecções por *Rickettsia*

transmitidas por carrapatos, incluindo a potencial exclusão de espécies mais patogênicas, na ocorrência de coinfeção.

Conforme relatado aqui, a abordagem utilizando os primers espécie-específicos desenvolvidos para amplificação de *sca9* e/ou *sca14* na primeira rodada de PCR fornece um meio rápido para a detecção direta de *R. bellii* em carrapatos do gênero *Amblyomma* oriundos de aves silvestres. A manutenção do ensaio já empregado para a amplificação de *htrA* possibilita ainda a detecção de DNA originário de demais componentes deste gênero microbiano circulantes no Brasil. Com esta modificação metodológica, foi possível confirmar a presença de *R. bellii* rapidamente (dentro de 24 h) através da digestão enzimática de *sca9* ou *sca14*, empregando respectivamente as enzimas *AluI* e *EcoRV*. Há ainda a possibilidade de caracterização dos demais componentes do gênero *Rickettsia* a partir da digestão do gene *htrA*, como descrito por Santolin et al. (2013) e otimizado no decorrer do capítulo II do presente documento. Da mesma forma, a identificação das bactérias *Rickettsia* SFG detectadas nos carrapatos coinfectados foi confirmada através da amplificação do fragmento *ompA*, usando os primers *ompAdogF/ompAdogR*, e posterior digestão enzimática dos produtos resultantes, empregando as enzimas *PstI* e *RsaI*.

A teoria de exclusão decorrente da coinfeção por múltiplas espécies de *Rickettsia* foi estabelecida através de simples, porém refinado, modelo experimental, sendo amplamente aceito pela maioria dos riquetsiologistas. Entretanto, a existência de algumas lacunas nesta teoria não deve ser esquecida, como foi imparcialmente abordado por Telford (2009). Adicionalmente, a aplicação de tecnologias de “Next Generation Sequencing” (NGS) para avaliar o microbioma de carrapatos indica que os efeitos de exclusão podem não estar limitados apenas as interações *Rickettsia-Rickettsia*, envolvendo potencialmente outros componentes da microbiota (GURFIELD et al., 2017). Através de análises mais abrangente da microbiota de carrapatos, sugere-se que a coinfeção de carrapatos com *Rickettsia* spp. e outros micro-organismos patogênicos (*Anaplasma* spp., *Babesia* spp., *Bartonella* spp. e *Borrelia* spp.), e/ou endossimbiontes (“*Candidatus* Midichloria mitochondrii”, *Spiroplasma* spp. e *Wolbachia* spp.), pode ser mais frequente do que inicialmente previsto (MOUTAILLER et al., 2016; CERUTTI et al., 2018). Decifrar a significância de tais interações é uma tarefa desafiadora, mas pode fornecer novas estratégias para o controle e prevenção de enfermidades transmitidas por carrapatos, através da manipulação de microbioma e/ou metaboloma do ectoparasita. Comprovou-se, por exemplo, que a presença de “*Candidatus* Midichloria mitochondrii” em conjunto com selenoproteínas, são essenciais para o desenvolvimento de *R. parkeri* em *Amblyomma maculatum*, o carrapato da Costa do Golfo (BUDACHETRI et al., 2018).

A análise semi-quantitativa do número relativo de cada micro-organismo nos carrapatos coinfectados, indicou que para *Amblyomma longirostre* há uma tendência de predominância da espécie *R. bellii*. Em contraste, embora com dados limitados no presente estudo, sugere-se que *Rickettsia* SFG encontra-se em maior número nas espécies *A. calcaratum* e *Amblyomma romarioi*. Considerando o método de extração de DNA empregado, e a consequente não preservação dos exemplares processados, torna-se inviável avaliar a distribuição tecidual das distintas espécies de *Rickettsia* detectadas coinfectando o ectoparasita, limitando nossas conclusões acerca do potencial de exclusão de *R. bellii*.

Dados experimentais de *Amblyomma dubitatum* naturalmente infectados com *Rickettsia bellii* e posteriormente expostos ao agente patogênico *R. rickettsii*, através do repasto sanguíneo em *Cavia porcellus* riquetsêmicos, demonstrou que a transmissão transovariana da cepa patogênica foi consideravelmente reduzida, mas não completamente eliminada. Em contrapartida, 100% das fêmeas ingurgitadas transmitiram *R. bellii* para as gerações seguintes. Tais achados foram altamente sugestivos da ação excludente de *R. bellii*, frente a espécies de maior patogenicidade. Contudo, como ressaltado pelos autores do estudo, os baixos níveis de

transmissão transovariana de *R. rickettsii* podem estar relacionados à fatores intrínsecos da espécie *A. dubitatum* (SAKAI et al., 2014).

O desenvolvimento de novo ensaio molecular para amplificação do gene *ompA* fez-se necessário com base em avaliação da capacidade de detecção do par de primers usualmente empregado para esta função (Rr190.70p/Rr190.602n) e amplamente utilizado em estudos anteriores (MCINTOSH et al., 2015; LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017). Utilizando diluições seriadas de DNA controle de *Rickettsia* SFG, verificou-se que este ensaio apresentou cinco a dez vezes menos sensibilidade analítica, quando comparado as reações para amplificação do gene *htrA*. Desta forma, a reação tradicionalmente empregada seria inadequada para realização da análise semi-quantitativa proposta no presente estudo.

Embora exija-se elevada demanda técnica e logística, a avaliação por imunofluorescência de cortes histológicos de carrapatos capturados pode ser uma abordagem interessante para estudos futuros (HIRUNKANOKPUN et al., 2011), bem como a execução de hibridização *in situ* (BAGHERI et al., 2017), para determinar a localização tecidual das diferentes espécies de *Rickettsia* coinfectando um carrapato. Tais abordagens foram empregadas para pulgas infectadas por *R. felis* (HIRUNKANOKPUN et al., 2011) e *Ixodes pacificus* em associação com diferentes espécies de *Rickettsia* (BAGHERI et al., 2017). Avaliação subsequente de material genético extraído dos tecidos seccionados, empregando os alvos moleculares *sa9/ompA* e subsequente digestão por enzimas de restrição, possibilitariam a confirmação de coinfecção e identificação dos micro-organismos contidos na amostragem, em nível de espécie.

A bactéria *Rickettsia bellii* possui, até o presente momento, a mais ampla variedade de hospedeiros invertebrados no continente americano, com associação a 25 espécies diferentes de carrapatos (COSTA et al., 2017a). Contudo, nosso conhecimento acerca deste micro-organismo ainda apresenta muitas lacunas, como em sua capacidade de influenciar a biologia do hospedeiro e as interações com os demais componentes da microbiota do ectoparasita. Os achados do presente estudo indicam que a distribuição de *R. bellii* na população brasileira de carrapatos, principalmente em exemplares coinfectados, é potencialmente subestimada. Prevê-se que, a partir da implementação da metodologia aqui reportada, aprimoraremos a detecção da ocorrência de coinfecção. Desta forma, ampliaremos nossa compreensão acerca do papel de *R. bellii* na bioecologia de carrapatos, assim como na epidemiologia das doenças transmitidas por carrapatos.

CAPÍTULO IV

DESENVOLVIMENTO DE FERRAMENTA ON-LINE AUXILIAR PARA IMPLEMENTAÇÃO DE PROTOCOLOS DE IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE CARRAPATOS IXODÍDEOS E *Rickettsia* spp. REPORTADOS NO BRASIL

RESUMO

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Desenvolvimento de Ferramenta On-line Auxiliar para Implementação de Protocolos de Identificação Molecular de Carrapatos Ixodídeos e *Rickettsia* spp. Reportados no Brasil.** 2019. 15p. Tese. (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

O advento e popularização da internet promoveu mudanças significativas na rotina diária de todos. Seus impactos podem ser também percebidos no meio científico, sendo um interessante meio para geração e compartilhamento de dados. O vertiginoso aumento no número de ferramentas on-line demonstra uma tendência que não deve ser ignorada para atualidade e anos futuros. Adicionalmente, a agilidade com que novas informações são disponibilizadas através deste meio contrasta com o usualmente lento e cauteloso processo de publicação científica. Assim, tendo em vista a necessidade de constante atualização dos protocolos PCR-RFLP formulados para identificação de carrapatos ixodídeos e *Rickettsia* spp., em virtude da obtenção de novos dados moleculares ou descrição de novas espécies, o presente capítulo apresenta a ferramenta on-line TickCutter. Esta foi desenvolvida com o intuito de facilitar a implementação das novas metodologias moleculares previamente apresentadas. A confecção de banco de dados com ferramenta de busca associada possibilita a rápida identificação dos exemplares após a interpretação dos padrões de banda. O fornecimento de tutoriais detalhados para as diferentes etapas do processo garante ainda a reprodutibilidade da técnica e as páginas individuais para cada espécie de carrapato reportada no Brasil servem como um repositório expansível de informações. A hospedagem de fórum on-line possibilita ainda o contato e debate entre os múltiplos profissionais e acadêmicos que atuam nas áreas de ixodologia e riquetsiologia no Brasil. A aplicabilidade da ferramenta de busca e tutoriais foi comprovada a partir da análise voluntária de dez usuários, executada em três rodadas e com subsequente aprimoramento da plataforma ao final de cada etapa. Desta forma, a ferramenta on-line desenvolvida garante não somente a sobrevivência dos protocolos moleculares desenvolvidos e sua implementação por diferentes grupos de pesquisa, mas também a possibilidade de formação de uma rede de parcerias que, através de medidas estratégicas seria capaz de elaborar medidas eficazes para o controle de doenças transmitidas por carrapatos no Brasil.

Palavras-chave: Internet, PCR-RFLP, banco de dados

ABSTRACT

ABREU, Daniel Paiva Barros de. **Development of a Complementary Tool for the Use of Molecular Tools Aiming the Identification of Ixodid Ticks and *Rickettsia* spp. Reported in Brazil.** 2019. 15p. Thesis. (Doctorate in Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

The advent and popularization of the internet has brought significant changes in everyone's daily routine. Its impacts can also be perceived in the scientific environment, being an interesting way to get and share data. The steep rise in the number of online tools demonstrates a trend that should not be ignored for the present and future years. In addition, the speed with which new information is made available through this medium contrasts with the usually slow and cautious process of scientific publication. Thus, considering the need for constant updating of the PCR-RFLP protocols formulated for identification of ixodid ticks and *Rickettsia* spp., due to new molecular data or the description of new species, this chapter presents the online tool TickCutter. This was developed in order to facilitate the implementation of the new molecular methodologies previously presented. The creation of a database with associated search tool allows a faster identification of the samples after the band patterns interpretation. detailed tutorials provided for the different process steps also ensures reproducibility of the technique and the individual pages for each tick species reported in Brazil serve as an expandable repository of information. The online forum available also allows contact and debate between the multiple professionals and academics working in the areas of ixodology and rickettsiology in Brazil. The applicability of the search engine and tutorials was proven to be effective by the voluntary analysis of ten users, performed in three rounds and with subsequent improvement of the tool at the end of each step. Thus, the online tool introduced ensures not only the survival of the new molecular protocols and their implementation by different research groups, but also the possibility of forming a network of partnerships that, sharing a common goal and through strategic measures would be able to elaborate effective measures for the control of tick-borne diseases in Brazil

Keywords: Internet, PCR-RFLP, database

1 INTRODUÇÃO

A popularização da informática e os subsequentes avanços nas últimas décadas, inevitavelmente resultaram na maior utilização de softwares e ferramentas computacionais na pesquisa científica. A capacidade analítica de tais abordagens possibilita o acesso a dados previamente inalcançáveis, como a determinação de relações filogenéticas através de pequenos fragmentos de regiões gênicas ou mesmo sequências genômicas completas (LIU et al., 2013; DE LA FUENTE et al., 2016, 2017). Da mesma forma, torna-se possível simular múltiplas combinações e variáveis, no que denominamos análise *in silico*, para antecipar os resultados posteriormente confirmados através de verificações *in vitro* ou *in vivo* (FONG et al., 2019; MORADIPOODEH et al., 2019; NDEKEZI et al., 2019). Assim, tal tendência não deve ser ignorada para projetos atuais e futuros.

No decorrer dos capítulos anteriores, a relevância de tais ferramentas tornou-se facilmente exemplificada. Através de bancos de dados moleculares como GenBank e BOLD System (RATNASINGHAM & HEBERT, 2013; SCOTT et al., 2016) foi possível acessar e armazenar as sequências nucleotídicas posteriormente empregadas para o estudo de carrapatos ixodídeos e *Rickettsia* spp. Através das ferramentas on-line BLAST (ALTSCHUL et al., 1990) ampliamos a capacidade de detecção de dados depositados, confirmando ainda a identificação de produtos de PCR submetidos ao sequenciamento. Os softwares gratuitos Primer3 e primerBLAST (UNTERGASSER et al., 2012; YE et al., 2012) possibilitaram o desenvolvimento de novos oligonucleotídeos iniciadores, enquanto as ferramentas NEBCutter V2.0 (VINCZE et al., 2003) e MEGA7 (KUMAR et al., 2016) auxiliaram na seleção de enzimas de restrição para técnicas de PCR-RFLP e preservação de sítios de ação enzimática em nível intraespecífico, respectivamente. Adicionalmente, o software Gel Analyzer 2010a (SKOSYREV et al., 2013) forneceu meios para facilitar a interpretação dos padrões de eletroforese resultantes das enzimas de restrição. Conclui-se, desta forma, que o emprego de softwares gratuitos e bancos de dados on-line possibilitou a execução de grande parcela do presente documento. Contudo, não devemos menosprezar a validação cautelosa de tais resultados no decorrer das análises *in vitro*.

Focando em áreas diretamente vinculadas a saúde, somente no ano corrente, a localização de múltiplos artigos científicos divulgando o desenvolvimento, validação e emprego de softwares para auxílio na pesquisa e conduta clínica evidenciam as inúmeras possibilidades em diferentes frentes. Tal abordagem pode ser, por exemplo, empregada na seleção de novos fármacos e opções terapêuticas, com base na similaridade de critérios funcionais e estruturais de drogas já conhecidas (KARATZAS et al., 2019) ou mesmo na adequação posológica de vancomicina para o tratamento de pacientes com doença renal crônica (DORAJOO et al., 2019). O acesso a tais alternativas demonstrou-se útil não somente para profissionais, como também para pacientes, como foi comprovado através de ferramenta auxiliar no diagnóstico e fornecimento de informações acerca de alterações cognitivas relacionadas ao Alzheimer (VAN MAURIK et al., 2019). Em nível epidemiológico, ferramentas on-line já comprovaram sua capacidade em classificar possíveis surtos hospitalares (LECLÈRE et al., 2019), sendo ainda eficaz no fornecimento de testes e monitoramento contínuo de indivíduos em grupo de risco para aquisição de infecção pelo vírus HIV (DE BONI et al., 2019). Sendo, mais uma vez, possível ressaltar a versatilidade e aplicabilidade abrangente de softwares e ferramentas on-line.

Estudos bioecológicos e epidemiológicos de doenças vetoriais também se beneficiaram de abordagens tecnológicas para superar os múltiplos desafios associados a complexa cadeia de transmissão destas enfermidades. Através de infraestrutura digital (websites, e-mails, aplicativos de celular e mídias sociais) tornou-se possível envolver ativamente a sociedade na execução de levantamentos (HAMER et al., 2018). Sendo frequentemente discutida e implementada atualmente, a denominada ciência cidadã (“citizen science”) permite a obtenção de dados em larga escala. Através da plataforma Abuzz (<http://abuzz.stanford.edu>), por exemplo, o monitoramento de mosquitos através da gravação e submissão de áudio para identificação de exemplares faz-se viável (MUKUNDARAJAN et al., 2017). Abordagem similar pode ser averiguada com a plataforma eTick (<http://etick.ca>), onde a identificação morfológica de ixodídeos é alcançada através da submissão de fotografias dos exemplares, promovendo um mapeamento de importantes vetores de DTCs na América do Norte (KOFFI et al., 2017).

Como detalhadamente exposto no decorrer dos capítulos anteriores, a identificação morfológica de carrapatos apresenta limitações e desafios que não devem ser desconsiderados. Adicionalmente, o grande número de espécies presentes no Brasil, somado as constantes mudanças taxonômicas observadas na classificação de vetores e micro-organismos associados, ressaltam a necessidade de atualização constante para todo e qualquer sistema de identificação para tais agentes. Desta forma, o presente capítulo pretende apresentar o desenvolvimento da plataforma on-line TickCutter. Através desta ferramenta, objetivou-se facilitar a implementação dos protocolos PCR-RFLP apresentados nos capítulos anteriores, facilitando ainda a atualização do sistema de identificação molecular e removendo possíveis entraves técnicos para sua execução por outros grupos de pesquisa.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Desenvolvimento da Plataforma On-line

Para a confecção do website almejado, utilizou-se o sistema Wix (<https://www.wix.com>). Com esta plataforma, torna-se possível a customização de modelos de páginas on-line disponibilizados de forma gratuita.

Em um primeiro momento, objetivou-se a implementação e validação de ferramentas relacionadas exclusivamente ao protocolo PCR-RFLP de carrapatos ixodídeos. Desta forma, páginas individuais para cada uma das espécies consideradas no Capítulo I do presente documento foram criadas, onde informações acerca dos padrões de banda previstos após a digestão enzimática dos fragmentos 16S rDNA, estão disponíveis, bem como os números de acesso das sequências nucleotídicas consultadas para formulação dos dados. Ilustrações de exemplares adultos gentilmente cedidas pela Dra. Maria Ogrzewalska (FIOCRUZ) foram utilizadas não somente nas páginas individuais de cada espécie, como também em outras áreas da página em desenvolvimento.

Adicionalmente, visando padronizar pontos considerados críticos para a execução da técnica, tutoriais detalhados foram redigidos e disponibilizados para as etapas de confecção dos géis de agarose (ANEXO E) e interpretação dos padrões de banda, após a eletroforese (ANEXO F). O acesso aos softwares gratuitos empregados no decorrer do presente estudo foi também fornecido, bem como canais de comunicação (fórum e endereço digital), facilitando a resolução de dúvidas e encaminhamento de novos dados para a constante atualização do sistema de identificação proposto.

Finalmente, o desenvolvimento de ferramenta de busca, visando auxiliar a interpretação dos resultados obtidos, foi também planejado. As etapas de confecção do banco de dados e validação serão detalhadas a seguir.

2.2 Confecção do Banco de Dados

Sendo a base da ferramenta de buscas, o banco de dados foi cuidadosamente redigido, utilizando os perfis de digestão *in silico* previamente obtidos (perfis disponíveis na Tabela 1 do Capítulo I). As informações para cada uma das espécies de carrapato foram agrupadas quanto a classificação taxonômica, onde todos foram inseridos dentro da divisão Ixodidae, com a possibilidade de subclassificação em nível de gênero (*Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* spp.), já que a discriminação morfológica em nível supra-específicos é possível na maioria dos casos, mesmo em estágios imaturos.

Em seguida, considerando os padrões de banda previstos para cada uma das espécies, incluindo os múltiplos perfis possíveis em determinados casos, foram inseridas informações referentes a primeira, segunda e terceira bandas para *VspI* e *DraI*, ordenadas quanto ao tamanho do fragmento por ordem decrescente. Tendo em vista a imprecisão resultante da interpretação nos padrões de eletroforese, os dados foram inseridos considerando uma margem de erro e ordenada na forma de dezenas. Ainda de acordo com as limitações decorrentes da técnica, bandas de tamanho inferior a 70 pb não foram adicionadas ao banco de dados. Uma representação esquemática pode ser verificada no quadro 1.

Quadro 1. Representação esquemática das faixas de interpretação de bandas inseridas no banco de dados empregado na ferramenta de busca

Espécie	Grupo	Padrão	Faixa de interpretação de bandas inserida no banco de dados								
			26x-25x	25x-24x	24x-23x	22x-21x	21x-20x	20x-19x	16x-15x	15x-14x	
<i>A. ovale</i>	Oval_A1	250, 153, 54*	250	250						153	153
<i>A. geayi</i>	Geay_A1	249, 204		249	249		204	204			
<i>A. longirostre</i>	Long_A1	210, 194, 52*				210	210, 194	194			

* Banda inserida no banco de dados sob a classificação “<70 pb ou não possui”

2.3 Validação da Ferramenta de Busca

Após a confecção do banco de dados, a ferramenta de buscas foi submetida à validação. Esta foi executada em fases distintas, com subsequente otimização da ferramenta de buscas e banco de dados, ao final de cada etapa.

A primeira fase foi realizada pelos dois responsáveis pela confecção do website e programação da ferramenta de busca. Objetivou-se nesta etapa a análise dos 80 grupos identificados no decorrer do capítulo I, garantindo que todas as informações foram corretamente inseridas no banco de dados. Desta forma, foi possível ainda, reconhecer padrões de banda similares, onde a implementação de uma terceira enzima de restrição, fazia-se necessária. Os 80 grupos foram ordenados de forma randômica e os nomes de espécies foram ocultados, sendo então encaminhados para os dois avaliadores. Ao final desta etapa, os dados foram avaliados e a ferramenta de busca foi otimizada para as etapas seguintes.

A segunda etapa, foi realizada com o auxílio de 10 voluntários. Padronizou-se o nível de formação destes (ensino superior completo e pós-graduação concluída ou em andamento), buscando heterogeneidade quanto a familiaridade no uso de ferramentas moleculares. Encaminhou-se eletronicamente um documento explicando sucintamente a técnica de PCR-RFLP e fornecendo dez padrões de bandas resultantes de digestão *in silico* para *DraI* e *VspI*. Em dois casos, foram adicionados dados referentes a terceira enzima de restrição, objetivando a discriminação de espécies similares. Os dados encaminhados na segunda etapa, adicionados do gabarito, podem ser verificados na Tabela 1. Findada a análise dos resultados, foram realizadas otimizações para o melhor funcionamento da ferramenta.

Tabela 1. Informações encaminhadas para voluntários no decorrer da segunda etapa de validação da ferramenta de busca, com a adição do gabarito

Amostra	Padrão de bandas <i>in silico</i> (pb)			Gabarito
	<i>DraI</i>	<i>VspI</i>	3ª enzima	
Tick_01	240, 72, 48, 48, 29, 15	460	-	<i>Ixodes loricatus</i>
Tick_02	169, 160, 84, 30, 15	305, 153	-	<i>Amblyomma romarioi</i>
Tick_03	162, 138, 110, 30, 15	191, 153, 68, 26, 18	-	<i>Amblyomma parvum</i>
Tick_04	194, 100, 97, 50, 15	238, 218	-	<i>Amblyomma coelebs</i>
Tick_05	241, 200, 15	222, 153, 72	-	<i>Amblyomma dubitatum</i>
Tick_06	170, 169, 74, 30, 15	305, 153	-	<i>Amblyomma ovale</i>
Tick_07	176, 165, 45, 30, 22, 15	274, 179	-	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>
Tick_08	160, 97, 72, 50, 30, 23, 15, 8	460	-	<i>Amblyomma tigrinum</i>
Tick_09	242, 195, 15	233, 219	<i>EcoRI</i> 460	<i>Amblyomma yucumense</i>
Tick_10	160, 97, 74, 72, 30, 15, 8	460	<i>SspI</i> 244, 176, 36	<i>Amblyomma tigrinum</i>

pb – Pares de base

A terceira etapa de validação envolveu o mesmo grupo de voluntários da segunda fase da análise. Desta vez, almejou-se simular a implementação da ferramenta a partir de padrões de eletroforese obtidos de 11 amostras reais de carrapatos imaturos. Imagens capturadas a partir de géis de eletroforese das enzimas *DraI* e *VspI* (Figura 1) foram submetidas a mensuração dos fragmentos, empregando o software GelAnalyzer 2010a (SKOSYREV et al., 2013), como detalhadamente descrito em ANEXO F. Os dados obtidos foram encaminhados para cada voluntário individualmente, como demonstrado na Tabela 2, exceto pelos dados referentes ao gabarito do teste.

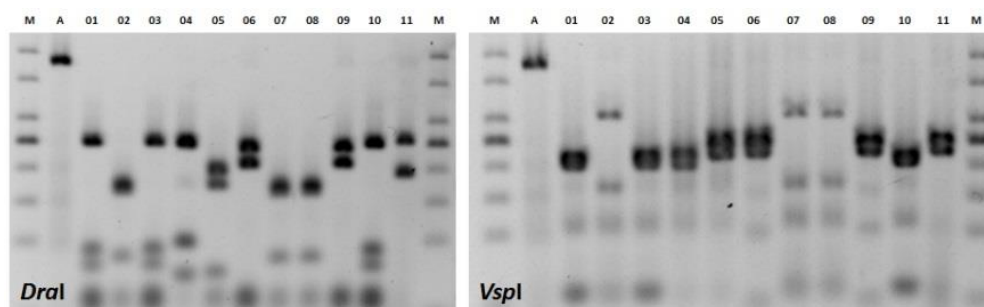


Figura 1. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de exemplares coletados de aves silvestres e empregados na terceira etapa de validação. Identificação de *Amblyomma longirostre* (linhas 01, 03, 04 e 10), *A. romarioi* (linhas 02, 07 e 08), *A. varium* (linha 05), *A. calcaratum* (linhas 06 e 09) e *A. nodosum* (linha 11). Linha A – Amplicon não clivado de fragmento 16S rRNA. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

Tabela 2. Informações encaminhadas para voluntários no decorrer da terceira etapa de validação da ferramenta de busca, com a adição do gabarito

Amostra	<i>DraI</i>			<i>VspI</i>			Gabarito
	Primeiro Fragmento	Segundo Fragmento	Terceiro Fragmento	Primeiro Fragmento	Segundo Fragmento	Terceiro Fragmento	
Tick_11	24x	9x	8x	21x	20x	< 70 ou não possui	<i>A. longirostre</i>
Tick_12	17x	16x	8x	30x	15x	< 70 ou não possui	<i>A. romarioi</i>
Tick_13	25x	9x	8x	21x	20x	< 70 ou não possui	<i>A. longirostre</i>
Tick_14	24x	10x	7x	21x	19x	< 70 ou não possui	<i>A. longirostre</i>
Tick_15	19x	17x	7x	24x	21x	< 70 ou não possui	<i>A. varium</i>
Tick_16	22x	20x	< 70 ou não possui	23x	21x	< 70 ou não possui	<i>A. calcaratum</i>
Tick_17	17x	16x	8x	30x	15x	< 70 ou não possui	<i>A. romarioi</i>
Tick_18	17x	16x	8x	30x	15x	< 70 ou não possui	<i>A. romarioi</i>
Tick_19	22x	20x	< 70 ou não possui	23x	21x	< 70 ou não possui	<i>A. calcaratum</i>
Tick_20	24x	9x	8x	21x	20x	< 70 ou não possui	<i>A. longirostre</i>
Tick_21	24x	19x	< 70 ou não possui	23x	22x	< 70 ou não possui	<i>A. nodosum</i> ou <i>A. yucumense</i>

A quarta e última etapa de validação ocorreu com o auxílio do mesmo grupo de voluntários. Objetivou-se, desta vez, a utilização do sistema de busca após a interpretação dos padrões de banda pelos usuários. Para tanto, estes receberam fotografias de eletroforeses em gel de agarose de dez amostras de carrapatos imaturos desconhecidos por eles, com a adição de três padrões identificados como *Amblyomma brasiliense* (B), *A. longirostre* (L) e *A. romarioi*

(N) para auxiliar na interpretação dos resultados (Figura 2). Recomendou-se seguir as instruções listadas no website (ANEXO F) para obtenção dos dados a serem inseridos na ferramenta de busca.

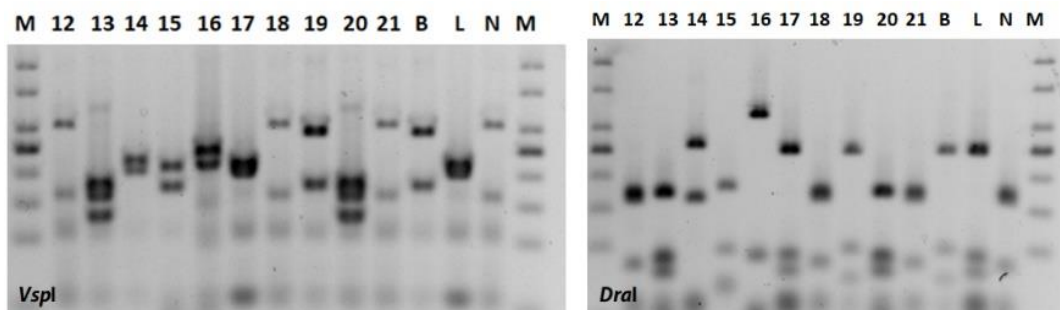


Figura 2. Padrões de banda resultantes da digestão enzimática com endonucleases de restrição *VspI* e *DraI* em fragmento de 16S rDNA (16S rRNA forward/16S rRNA reverse – 460 pb) de exemplares coletados de aves silvestres e empregados na quarta etapa de validação. Identificação de *Amblyomma romarioi* (linhas 12, 18 e 21), *A. parkeri* (linhas 13 e 20), *A. aureolatum* (linha 14), *A. naponense* (linha 15), *A. sculptum* (linha 16), *A. brasiliense* (linha 19). Linha B – *A. brasiliense*; L – *A. longirostre*; N – *A. romarioi*. Eletroforese em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x) com revelação em brometo de etídio e mensuração de bandas resultantes a partir da análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) (M).

Após o recebimento dos resultados referentes a quarta e última etapa, os voluntários que encaminharam suas respostas foram submetidos a breve entrevista estruturada, executada de forma presencial e individual. Visou-se a obtenção de dados detalhados acerca dos participantes e melhor compreensão dos fatores causais para alguns dos equívocos verificados no decorrer das etapas de avaliação. As perguntas e opções de resposta podem ser averiguadas no Quadro 2.

Quadro 2. Perguntas contidas nos questionários realizados com voluntários para avaliação da plataforma on-line desenvolvida

1. Você possui prévia experiência com a interpretação de géis de agarose?

- a) Sim b) Pouca experiência c) Não

2. Que ferramenta auxiliar foi utilizada para interpretação do gel de agarose?

- a) GelAnalyzer 2010a b) Power Point c) Outro (Qual?)

3. A leitura do tutorial disponibilizado no website foi realizada?

- a) Sim b) Parcialmente c) Não d) Não se aplica

4. Considerou a atividade laboriosa

- a) Sim (Explique) b) Parcialmente c) Não

5. Julgou a plataforma on-line disponibilizada de fácil utilização?

- a) Sim b) Parcialmente c) Não (Explique)

6. Debate individual acerca dos resultados discordantes encaminhados.

3 RESULTADOS

Tendo em vista a técnica de PCR-RFLP como base para o desenvolvimento dos protocolos implementados para identificação de carrapatos ixodídeos e bactérias do gênero *Rickettsia* spp. e a analogia da ação enzimática com cortes no produto de PCR, a página foi denominada “TickCutter”. O título da página foi pensado na língua inglesa, visando a posterior ampliação do protocolo para ixodofauna de outros países, e consequente tradução da página para outros idiomas. Adicionalmente, uma logomarca foi projetada para o website (Figura 3).

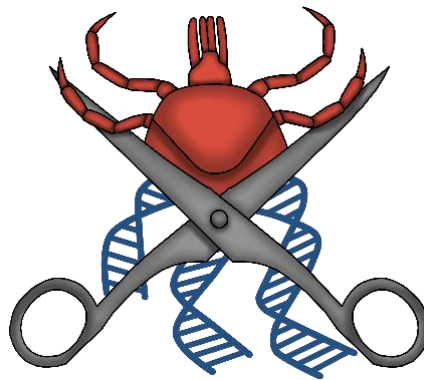


Figura 3. Logomarca desenvolvida para o website TickCutter (Autoria: Lucas Aguiar Rosa Machado).

Acessando o endereço virtual <https://tickcutter.wixsite.com/tickcutter>, torna-se possível acessar a página on-line e demais ferramentas e tutoriais descritos previamente (Figura 4), como as páginas individuais para cada espécie de carrapato (Figura 5).



Figura 4. Página inicial da plataforma on-line TickCutter.

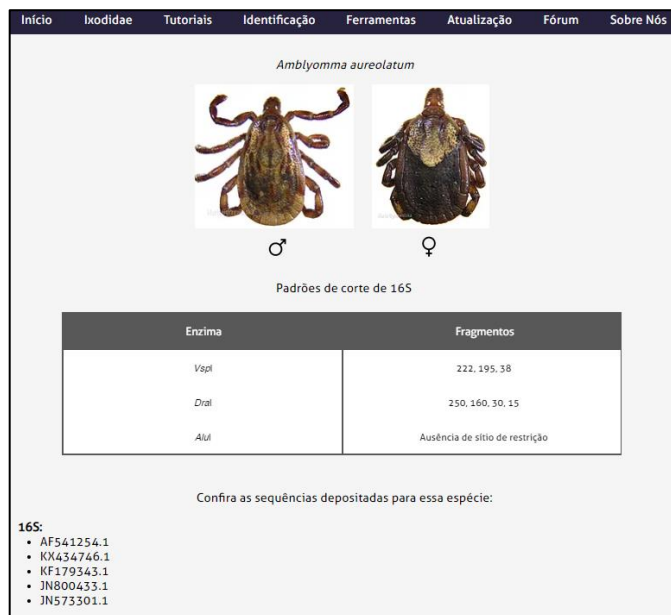


Figura 5. Página individual da espécie *Amblyomma aureolatum*, evidenciando exemplares adultos de ambos os sexos, padrões de banda previstos, após a digestão enzimática e números de acesso consultados.

Os bancos de dados comportaram adequadamente todas as informações previamente obtidas na análise *in silico* executada no capítulo 1. Como resultado inicial do processo de otimização da ferramenta de buscas e tendo em vista a impossibilidade de precisão relacionada a interpretação dos padrões de eletroforese, realizou-se uma primeira modificação no banco de dados. Assim, a margem de segurança, representada no quadro 1 do presente capítulo, foi deslocada para uma casa decimal acima, quando os fragmentos eram finalizados com as unidades sete, oito ou nove (Quadro 2).

Quadro 3. Representação esquemática das faixas de interpretação de bandas inseridas no banco de dados empregado na ferramenta de busca, após otimização

Espécie	Grupo	Padrão	Faixa de interpretação de bandas inserida no banco de dados								
			26x-25x	25x-24x	24x-23x	22x-21x	21x-20x	20x-19x	16x-15x	15x-14x	
<i>A. ovale</i>	Oval_A1	250, 153, 54*	250	250						153	153
<i>A. geayi</i>	Geay_A1	249, 204	249	249			204	204			
<i>A. longirostre</i>	Long_A1	210, 194, 52*				210	210, 194	194			

* Banda inserida no banco de dados sob a classificação “<70 pb ou não possui”

A validação da ferramenta de busca pelos dez avaliadores voluntários comprovou a funcionalidade da ferramenta de busca, fornecendo ainda ideias para o aprimoramento do website. Inicialmente programada para realizar a pesquisa por *VspI* e *DraI* separadamente, sendo necessária a posterior comparação dos resultados, atualmente torna-se possível pesquisar simultaneamente ou separadamente pelas duas enzimas, agilizando o uso da ferramenta e reduzindo a incidência de erros. Esta atualização foi sugerida por múltiplos avaliadores e implementada na terceira etapa de validação. Adicionalmente, foi inserida a opção “Limpar”, também recomendada pelos usuários, o que facilita a análise contínua de dados (Figura 5).

Organismo		
Organismo <input type="text"/>		
Primeiro fragmento Dral	Segundo fragmento Dral	Terceiro fragmento Dral
Primeiro fragmento <input type="text"/>	Segundo fragmento <input type="text"/>	Terceiro fragmento <input type="text"/>
Primeiro fragmento Vspl	Segundo fragmento Vspl	Terceiro fragmento Vspl
Primeiro fragmento <input type="text"/>	Segundo fragmento <input type="text"/>	Terceiro fragmento <input type="text"/>
Identificar <input type="button"/>		Limpar <input type="button"/>
Fragmento Dral	Fragmento Vspl	Espécie
250, 160, 30, 15	222, 195, 38	<i>Amblyomma aureolatum</i>
245, 198, 15	219, 190, 22, 22	<i>Amblyomma auricularium</i>
241, 97, 73, 30, 15	278, 178	<i>Amblyomma brasiliense</i>
196, 149, 91, 15	234, 214, 4	<i>Amblyomma cajennense</i>

Figura 6. Ferramenta de busca auxiliar para a identificação de carrapatos ixodídeos, baseada na ação de enzimas de restrição. Através da inserção dos dados resultantes, torna-se possível alcançar a identificação do exemplar de forma rápida.

Considerando a amostragem submetida a análise pelos dez avaliadores, determinou-se que a resposta seria considerada correta (quando a identidade do exemplar fosse alcançada – 1,0), parcialmente correta (quando a identidade do exemplar fosse uma das indicadas na resposta – 0,5) ou incorreta (quando a identidade alcançada não correspondesse ao gabarito ou não fosse preenchida - 0). Assim sendo, verificou-se na primeira amostragem (tabela 1) que o percentual de acerto ficou entre 20 e 100% (média = 71%), enquanto na segunda amostragem (tabela 2), após todas as otimizações da ferramenta de busca, o percentual de acerto foi entre 82% e 100% (média = 97,4%). Na terceira e última amostragem, um número menor de respostas foi recebido. Dos sete usuários que encaminharam seus resultados, o percentual de acerto ficou entre 50 e 100% (média = 76,4%).

Destes, seis voluntários foram também submetidos ao questionário, onde buscou-se determinar alguns dos fatores causais para ocorrência de equívocos na interpretação do gel de agarose encaminhado. Foi possível determinar que cinco dos entrevistados julgaram-se experientes na interpretação de géis de eletroforese enquanto um afirmou ter apenas parcial experiência anterior. A ferramenta GelAnalyzer 2010a foi o principal auxiliar no decorrer da interpretação, sendo empregada por cinco dos voluntários. Contudo, dois destes utilizaram também o software Microsoft Power Point, de forma complementar e apenas um afirmou ter utilizado o software Microsoft Word para determinar o tamanho dos fragmentos encaminhados. A leitura dos tutoriais, feita de forma detalhada por quatro dos cinco voluntários que empregaram os softwares recomendados, e a familiaridade com as novas ferramentas, foram os principais fatores relacionados a percepção de que a última etapa foi laboriosa para quatro dos voluntários. Entretanto, a plataforma on-line “TickCutter”, principal alvo da análise, foi unanimemente considerada de fácil utilização pelos seis entrevistados.

4 DISCUSSÃO

A crescente utilização de tecnologia nas suas mais diferentes formas proporcionou inúmeros avanços em ciências biológicas, incluindo a melhor compreensão das relações ecológicas associadas as DTCs. Contudo, apenas analisando a literatura recentemente publicada, torna-se evidente que estamos longe de obter o completo conhecimento nesta área. No decorrer da redação do presente documento, como reportado anteriormente, foi possível verificar a descrição da espécie de carrapato *Amblyomma romarioi*, até então denominado *Amblyomma* sp. haplótipo Nazaré (OGRZEWALSKA et al., 2012; MARTINS et al., 2019). Considerando micro-organismos do gênero *Rickettsia*, a discriminação de *R. paranaensis*, previamente classificada como variação de *R. parkeri* (ApPR), e o relato de ‘*Candidatus Rickettsia wissemannii*’ em território brasileiro também exemplificam o dinamismo deste campo (LUZ et al., 2019; PECKLE et al., 2019). Aditivamente, a sugestão de sinonímia para as espécies *A. maculatum* e *A. triste* (LADO et al., 2018) e a detecção de ‘*Rickettsia* sp. strain OF’ detectada em *Ornithodoros faccinii* (BARROS-BATTESTI et al., 2015), ainda não publicada mas considerada no capítulo II, demonstram que as divisões taxonômicas atualmente conhecidas não são fatos imutáveis ou inquestionáveis.

Assim como tais atualizações e alterações taxonômicas inevitavelmente resultaram em modificações no presente documento, no decorrer de sua confecção, devemos pensar também nos impactos presentes e futuros de tais informações nas metodologias de identificação molecular reportadas nos capítulos I e II. Tendo como objetivo a correta discriminação de exemplares de carrapatos ixodídeos em nível de espécie, bem como das bactérias do gênero *Rickettsia* por eles albergadas, o reconhecimento de novas espécies em território nacional poderia resultar na rápida obsolescência dos protocolos PCR-RFLP sugeridos. O método de identificação de *Rickettsia* associadas a carrapatos proposto por Santolin et al. (2013) sofreu tal efeito. Mesmo com sua aplicabilidade comprovada, através de extensos estudos a campo (LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017), este não engloba muitas das espécies atualmente reconhecidas no Brasil, requerendo atualização. Desta forma, a ferramenta on-line criada fornece meios para a manutenção dos protocolos desenvolvidos no presente documento. A possibilidade de edição do banco de dados possibilita a adição de novas espécies descritas ou reportadas. Da mesma forma, sabendo da ocorrência de polimorfismo associada a fatores geográficos, como reportado para *Amblyomma ovale*, *A. parvum* e *Rhipicephalus sanguineus* (MORAES-FILHO et al., 2011; LADO et al., 2016; BITENCOURTH et al., 2019), a execução deste protocolo por múltiplos grupos de pesquisa poderia resultar na detecção de padrões de banda inicialmente não previstos. A disponibilização de canais de comunicação para atualização do banco de dados tornaria a presente ferramenta um trabalho colaborativo de interesse mútuo para grupos de ixodologia e riquetsiologia no Brasil.

A relevância da ação colaborativa foi bastante evidente no desenvolvimento da ferramenta de busca. Através da análise de voluntários tornou-se possível não somente validar as informações inseridas nos bancos de dados, como também detectar pontos de otimização não percebidos inicialmente pelos desenvolvedores da plataforma on-line. A inserção de busca pareada simultânea para as duas enzimas de restrição (*DraI* e *VspI*), adicionada entre a segunda e terceira etapa de validação da ferramenta, foi certamente um dos fatores que impactou nos melhores resultados obtidos na terceira análise. A adição da opção “Limpar” foi também sugerida pelos usuários voluntários e seguramente tornou a ferramenta mais amigável para uso

na rotina. Para a terceira e última etapa de validação, embora seja verificado um decréscimo no percentual médio de respostas certas, tal fator é facilmente explicado pela adição da etapa de interpretação do gel de agarose. Uma vez que a familiaridade dos usuários voluntários com técnicas moleculares era heterogênea, a necessidade de interpretação dos padrões de banda inquestionavelmente ampliou o desafio para os menos experientes. Ressalta-se, entretanto, que o único voluntário a se classificar como parcialmente familiarizado com interpretação de gel de agarose foi o mesmo a acerrar 100% das amostras encaminhadas na última etapa de avaliação. Através da entrevista pós-análise foi possível determinar que o principal fator associado a esta taxa de sucesso foi a detalhada leitura do tutorial fornecido (ANEXO F), exemplificando de forma prática a aplicabilidade da plataforma on-line na garantia de reprodutibilidade e implementação das novas técnicas moleculares desenvolvidas, mesmo por grupos de pesquisa pouco familiarizados com tais tecnologias.

Outra função do website com possibilidade de expansão, consiste na utilização das páginas individuais de cada espécie como repositório de informações para carrapatos brasileiros. Inicialmente, estas comportam as sequências do gene mitocondrial 16S rDNA utilizadas na confecção do protocolo de PCR-RFLP, bem como os perfis de digestão enzimática previstos. Entretanto, a possibilidade de edição somada aos esforços colaborativos de demais grupos de pesquisa permitiria a inserção de dados referentes a distribuição geográfica, perfis de hospedeiro mais acometidos e agentes patogênicos associados. Reforçando ainda a importância da discriminação morfológica, a disponibilidade de chaves de identificação e coleção de imagens para auxiliar nesta etapa também se torna possível (MARTINS et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2019). Há ainda o potencial de inserção de números de acesso de regiões gênicas não utilizadas no presente trabalho, como COI, 12S rDNA e ITS2 (BEATI et al., 2012; HEBERT et al., 2004; MCLAIN et al., 1995; ZAHLER et al., 1995). Desta forma, a webpage apresenta o potencial de se tornar um grande repositório atualizado de informações relacionadas a ixodologia no país.

Tendo sua validade comprovada para carrapatos ixodídeos, a expansão da aplicabilidade da ferramenta em desenvolvimento para micro-organismos do gênero *Rickettsia* é um dos próximos pontos de enfoque. A inserção dos dados obtidos no capítulo II no banco de dados da plataforma on-line seria também relevante para os estudos que visem compreender as relações hospedeiro-carrapato-patógeno relacionadas a estes micro-organismos intracelulares de grande importância para saúde humana no Brasil (LABRUNA, 2009). Embora este seja o agente mais considerado em estudos ecológicos brasileiros, outros importantes patógenos para saúde humana e animal poderiam resultar em futuras expansões do site (JONGEJAN & UILENBERG, 2004; PAROLA et al., 2013; SZABÓ et al., 2013b; DIOP et al., 2018). Adicionalmente, considerando os impactos globais reconhecidamente ligados as DTCs e o potencial de introdução de espécies de carrapato exóticas no país, a tradução da página para diferentes idiomas, somada a inserção de dados referentes a ixodofauna de outras regiões, especialmente demais países da América Latina, promoveria a democratização desta área de pesquisa para países com condições socioeconômicas e desafios epidemiológicos similares ao nosso.

Conclui-se, desta forma, que o website desenvolvido propicia um meio adequado para a manutenção da funcionalidade dos protocolos de identificação por PCR-RFLP instituídos no decorrer dos capítulos I e II. As rápidas modificações taxonômicas frequentemente observadas nesta área requerem a disponibilização de meios que possibilitem a atualização igualmente rápida dos métodos de identificação utilizados. Adicionalmente, o fornecimento de um banco de dados para inserção dos resultados obtidos, protocolos detalhados para cada uma das etapas metodológicas e canais de comunicação entre os usuários, propiciará a execução de estudos

bioecológicos e epidemiológicos relacionados a carrapatos e DTCs em todo o território nacional.

3 DISCUSSÃO GERAL

O iminente impacto causado a saúde humana como resultado de doenças infecciosas emergentes e reemergentes é sempre acompanhado por grande temor acerca de possíveis surtos, epidemias ou mesmo pandemias. O reconhecimento de que, nas últimas décadas, a maior parcela destas enfermidades apresenta origem animal aponta uma direção para o enfoque de projetos de pesquisa que visem antecipar desafios futuros. A adicional correlação da violação do ambiente silvestre com o aumento da ocorrência de tais processos infecciosos ressalta a relevância de animais selvagens como portadores e reservatórios de agentes biológicos com potencial patogênico (JONES et al., 2008). E o papel de agentes vetoriais na conexão de nichos ecológicos que, normalmente, não teriam contato, insere outro importante fator a ser analisado. Ao refletirmos na interferência de mudanças climáticas na distribuição geográfica e taxa reprodutiva de mosquitos e carrapatos, por exemplo, verificamos que a preocupação acerca de doenças vetoriais é fundamentada em riscos reais e que a perfeita predição da ocorrência de tais eventos depende da avaliação de múltiplas variáveis (GREER et al., 2008; COLWELL et al., 2011).

Tendo em vista as enfermidades vetoriais, uma das principais abordagens para a antecipação e tomada de medidas preventivas e de controle, bem como na análise de medidas intervencionistas, consiste na execução de levantamentos ecológicos. Sua inquestionável relevância é corroborada pela sua alocação como um dos pilares centrais para o controle de doenças transmitidas por vetores no documento “Global Vector Control Response 2017-2030” emitido pela WHO (WHO, 2017). No Brasil, como resultado de extensos trabalhos desenvolvidos nas últimas duas décadas, levantamentos ecológicos de carrapatos com enfoque nos diferentes biomas e hospedeiros vertebrados disponíveis no país começaram a ampliar o conhecimento destes artrópodes e agentes patogênicos associados (LABRUNA et al., 2007c; DANTAS-TORRES et al., 2012a; ZERINGÓTA et al., 2017; LUZ et al., 2018b, 2018c; OGRZEWALSKA et al., 2019). A constante detecção de novas espécies de carrapatos e *Rickettsia* spp. ilustra não somente os frutos de tais estudos, mas também as diversas lacunas ainda presentes em ixodologia e riquetsiologia (MARTINS et al., 2019; PECKLE et al., 2019).

A clássica identificação morfológica, tradicionalmente empregada em parasitologia, foi durante muito tempo a única metodologia utilizada para caracterização de exemplares de carrapatos. Sua aplicabilidade continua sendo relevante e a publicação de aspectos fenotípicos para ectoparasitos em estágio adulto ou de ninfa comprovam seu valor (MARTINS et al., 2013, 2016; NAVA et al., 2018). A preocupação de múltiplos autores quanto aos possíveis prejuízos relacionados a perda desta habilidade e a contínua necessidade de treinamento entomológico para as gerações atuais e futuras também ressaltam a importância da análise morfológica de exemplares (BARNISH et al., 2006; ESTRADA-PEÑA et al., 2017a). Complementarmente, o desenvolvimento de plataforma on-line canadense eTick, que visa a identificação de carrapatos a partir de fotografias capturadas e submetidas pelos usuários demonstra não somente um excelente modelo de ciência cidadã, como ainda confirma a versatilidade de técnicas tradicionais frente a novas possibilidades (KOFFI et al., 2017).

Contudo, não devemos ignorar as limitações associadas a esta abordagem. Esta pode ser verificada mesmo em registros antigos, como na errônea identificação de exemplares de *Amblyomma triste* como *A. tigrinum* por Aragão e Fonseca (1961). A incapacidade discriminatória dos componentes do complexo *A. cajennense* em estudos anteriores a

publicação de Nava et al. (2014) também evidencia os entraves associados a este método de análise. Embora a então espécie *A. cajennense* tenha sido um dos principais alvos de estudos em ixodologia e na epidemiologia de FMB nos anos antecedentes, apenas com a implementação associada de ferramentas moleculares e observações biológicas tornou-se possível discriminar as espécies *A. cajennense* e *A. sculptum*, ambas presentes em território brasileiro (NAVA et al., 2014). Mesmo hoje, ainda não foram determinados critérios morfológicos diferenciais para adultos machos destas duas unidades taxonômicas (MARTINS et al., 2016). A alocação da espécie *Boophilus microplus* no gênero *Rhipicephalus* e a recente sugestão de sinonímia para *A. maculatum* e *A. triste* também revelam algumas fragilidades desta abordagem (BEATI & KEIRANS, 2001; MURRELL & BARKER, 2003; LADO et al., 2018). Destaca-se ainda a ausência de características morfológicas suficientemente discriminatórias para o estágio larval de carrapatos, o que consiste em um dos principais entraves para o esclarecimento de aspectos bioecológicos destes artrópodes.

Uma análise detalhada de levantamentos ecológicos do parasitismo de aves silvestres demonstra com clareza a última afirmativa (LABRUNA et al., 2007c; LUZ et al., 2012; OGRZEWALSKA et al., 2012; SANTOLIN et al., 2012; MATURANO et al., 2015). Sendo um importante perfil hospedeiro para os estágios imaturos de muitas espécies de carrapatos, a verificação de que grande parcela dos exemplares capturados é identificada somente em nível de gênero pode resultar em conclusões incorretas acerca das relações carrapato-patógeno-hospedeiro e ressalta uma problemática a ser solucionada (ESTRADA-PEÑA et al., 2015; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). A implementação de ferramentas moleculares proporcionou meios para a ampliação do percentual de exemplares identificados em nível de espécie, com publicações identificando amostragens contendo centenas de carrapatos oriundos de aves em sua totalidade (LUZ et al., 2017; ZERINGÓTA et al., 2017).

A recente descrição de *Amblyomma romarioi*, inicialmente reportada como *Amblyomma* sp. haplótipo Nazaré em estudo de aves realizado no estado de SP e posteriormente detectada também nos estados do RJ e MG, demonstram que mesmo em biomas extensamente analisados, como a Mata Atlântica, ainda há muito a ser esclarecido (OGRZEWALSKA et al., 2012; LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017; MARTINS et al., 2019). A percepção de que esta espécie pode ser localizada em diferentes estados da região Sudeste, sugere uma distribuição geográfica ampla e incita o questionamento acerca do motivo para sua descrição apenas recentemente. Adicionalmente, o carreamento de bactérias *Rickettsia* SFG (“*Candidatus* *Rickettsia* paranaensis” e *R. rhipicephali*) somado ao reconhecimento de primatas *Callicebus nigrifrons* como hospedeiros de ninfas e adultos ressalta ainda a possibilidade de parasitismo acidental em humanos, bem como seu envolvimento na transmissão de bactérias de patogenicidade ainda desconhecida (MARTINS et al., 2019).

Embora múltiplas investigações da última década tenham focado nas relações parasitárias entre carrapatos e aves, pode-se afirmar que este é um tópico ainda longe de ser esgotado. Não podemos excluir a possibilidade de que alguns dos *Amblyomma* spp. capturados no decorrer destes estudos representem novas divisões taxonômicas ainda desconhecidas. Há ainda a dificuldade de realização de análises comparativas entre estudos de regiões geográficas distintas e a incapacidade de determinação do papel disseminador de agentes vetoriais e micro-organismos patogênicos em associação a estes animais com grande potencial de deslocamento (HASLE, 2013; MILLER et al., 2016).

Ademais, um dos pontos basilares para a transmissão de DTCs em humanos é logicamente a ocorrência de repasto sanguíneo pelas espécies vetoriais. Para a maioria dos patógenos transmitidos por carrapatos há a necessidade de fixação do parasito por longos períodos. Exceções são verificadas para patógenos como Powassan vírus, onde o período de

apenas 15 min seria suficiente para transmissão do agente (EBEL & KRAMER, 2004). Para FMB, estima-se a necessidade de repasto no hospedeiro suscetível por um intervalo superior a 3h (PAROLA et al., 2013). Assim, ao considerarmos o tamanho das estruturas de fixação em carrapatos imaturos (larvas e ninfas) e a maior dificuldade do hospedeiro em perceber a ocorrência do parasitismo, afirma-se que estes estágios são os principais responsáveis pela transmissão de patógenos. Novamente, a incapacidade de discriminação em nível de espécie de exemplares imaturos oriundos de humanos, como previamente reportado por Guglielmone et al. (2006), gera lacunas fundamentais para o melhor entendimento da cadeia de transmissão e espécies parasitárias envolvidas.

Indubitavelmente o advento e popularização de técnicas moleculares tem o potencial de suplantar as limitações relacionadas a identificação morfológica. O sequenciamento nucleotídico de diferentes alvos vem sendo amplamente empregado em estudos que visem melhor compreender a bioecologia de ixodídeos. Sua aplicabilidade, porém, é muitas vezes limitada ao custo associado à sua execução, o que se torna ainda mais evidente ao considerarmos a elevada quantidade de carrapatos normalmente recuperada em expedições a campo (HELMY et al., 2016). A necessária busca por alternativas, somada a grande quantidade de sequências disponíveis nos bancos de dados públicos, como resultado de esforços anteriores de múltiplos grupos de pesquisa, resultou na elaboração do protocolo PCR-RFLP proposto no capítulo I. O reduzido requerimento de tecnificação e recursos orçamentários para sua implementação visa fomentar a ampliação da ixodologia brasileira. Consequentemente, pretende-se ainda aprimorar a capacidade de detecção de potenciais agravos a saúde.

Se modificações taxonômicas e a descrição de novas espécies são constantemente observadas em investigações de organismos macroscópicos, não podemos esperar algo diferente para micro-organismos. O expressivo aumento no número de espécies de *Rickettsia* spp. associadas a carrapatos e reconhecidas em território nacional promove a adição de variáveis aos aspectos epidemiológicos de enfermidades vetoriais, passando de apenas uma espécie anterior ao ano 2000 para 14, considerando a recente descrição de “*Candidatus Rickettsia paranaensis*” (LABRUNA, 2009; LUZ et al., 2018c, 2019; PECKLE et al., 2019). Mesmo ao considerarmos o potencial patogênico desconhecido ou inexistente da maior parcela destas espécies, é importante ressaltar que tais micro-organismos são parte integrante de complexa comunidade microbiana que interage constantemente entre si e com o organismo hospedeiro (BUDACHETRI et al., 2018). A possibilidade de interferência na transmissão transovariana de *R. rickettsii* por outros organismos do gênero de patogenicidade inferior ilustra claramente a relevância de tais relações para a epidemiologia de enfermidades vetoriais (BURGDORFER & HAYES, 1981). É possível, desta forma, conjecturar a possibilidade de utilização de um dos componentes da microbiota de carrapatos como alvo para medidas de controle biológico estratégicas (LEHANE, 1994).

A denominada descrição de patógenos reversa é outro ponto merecedor de destaque. Tal evento ocorre quando a detecção e identificação de determinado micro-organismo precede sua correlação com quadros infecciosos (TIJSSE-KLASSEN et al., 2014). No gênero *Rickettsia*, a espécie *R. parkeri* é um dos exemplos de tal ocorrência. Esta bactéria foi descrita em 1937, e somente no ano de 2004 foi associada a quadros infecciosos, cursando com sintomas inespecíficos em humanos em múltiplos casos, inclusive no Brasil (PARKER, 1939; PADDOCK et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007). Quando comparado ao principal patógeno deste gênero, a espécie *R. rickettsii*, a menor agressividade dos quadros clínicos verificados em infecções por *R. parkeri* encontra-se possivelmente associada a reduzida virulência deste micro-organismo (EL KARKOURI et al., 2017; DIOP et al., 2018). Se mesmo casos de FMB são provavelmente subdiagnosticados ou erroneamente confundidos com outros processos

infeciosos endêmicos, o que muitas vezes cursa com o óbito do paciente, parece provável que outras enfermidades febris de agressividade inferior sejam igualmente subdiagnosticadas. Assim sendo, é possível supor que demais espécies deste gênero bacteriano presentes no Brasil, muitas apenas recentemente relatadas, sejam subestimadas quanto ao seu potencial patogênico. Embora seja sugerido que tais descrições promovem pouco impacto direto à saúde humana, tal ponto deve ser explorado com cautela, especialmente ao considerarmos os diversos nichos ecológicos associados a este grupo bacteriano e a origem zoonótica de grande parcela das enfermidades emergentes da atualidade (JONES et al., 2008; PADDOCK, 2009; ESTRADA-PEÑA et al., 2015).

Estes micro-organismos poderiam representar, portanto, um risco real e ampliável ao considerarmos a possibilidade de migração destes agentes, bem como vetores, para outros hospedeiros. Modificações populacionais resultantes da invasão de humanos em áreas previamente inabitadas, transformando áreas de vegetação nativa em território urbano ou periurbano, também estão associados a este tipo de ocorrência. O potencial impacto de eventos assim é exemplificado pelo recente relato de infestação de humanos por ninfas de *Amblyomma parkeri* infectadas por “*Candidatus R. paranaensis*” na região Sul do país (dados não publicados, informados pelo Dr. Gilberto Salles Gazêta - FIOCRUZ). Estes dados são corroborados pela prévia documentação de infestação de humano por uma ninfa não ingurgitada desta espécie em SP (MARTINS et al., 2013). A comprovação desta espécie em uma nova localização, somada a observação de que seus estágios imaturos são mais comumente recuperados de aves (PACHECO et al., 2012; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016; LUZ et al., 2017b; ZERINGÓTA et al., 2017) é simultaneamente interessante e preocupante, ilustrando a necessidade de contínuos e extensivos projetos com enfoque na bioecologia de carrapatos e micro-organismos associados.

Uma das principais abordagens para determinar a possível interação entre estes agentes microbianos e hospedeiros vertebrados suscetíveis consiste na análise sorológica para titulação de anticorpos em animais domésticos e silvestres, bem como em humanos (TAMEKUNI et al., 2010; SPOLIDORIO et al., 2013; BEZERRA et al., 2017; GRUHN et al., 2019). Estas metodologias são essenciais para a obtenção de dados epidemiológicos que confirmem a interação entre o vetor e hospedeiros potenciais. A habilidade de infectar mamíferos e a consequente produção de resposta imune é considerada uma forte, embora indireta, evidência da capacidade patogênica de um micro-organismo (RAMACHANDRAN et al., 2017). Além disso, dados sorológicos podem servir de base para análises de risco, utilizados como justificativa para obtenção de recursos para pesquisa científica e execução de levantamentos de campo mais extensos. Sua aplicabilidade em levantamentos epidemiológicos, em adição ao seu uso como ferramenta diagnóstica, forneceu informações e direcionamentos de grande relevância para estudos subsequentes (BIGGS et al., 2016; PORTILLO et al., 2017; ABDAD et al., 2018; BLANTON, 2019). Contudo, tendo como base para sua interpretação as interações antígeno-anticorpo e o aumento expressivo no número de espécies reportadas no Brasil, não se pode descartar a possibilidade de reações cruzadas em testes sorológicos. Estes novos dados não excluem sua aplicabilidade e relevância para esta área de estudo, mas tampouco devem ser ignorados na interpretação dos resultados previamente obtidos. O isolamento bacteriano e obtenção de antígenos destas novas espécies, assim como o desenvolvimento de metodologias mais específicas poderia auxiliar na elucidação do real impacto destes micro-organismos para a saúde humana e animal, possibilitando o direcionamento de esforços e recursos para questões de maior interesse (PADDOCK, 2009).

Também rotineiramente utilizadas em levantamentos ecológicos, e sendo o foco de grande parcela do presente documento, as técnicas moleculares foram responsáveis por muitas

das mudanças taxonômicas e ecológicas pontuadas anteriormente (OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Sua implementação para o esclarecimento das interações carrapato-*Rickettsia* fomentam a publicação contínua de novas espécies e relações até então não reportadas. Entretanto, como demonstrado no capítulo II ao detalharmos os resultados obtidos com os novos oligonucleotídeos iniciadores para região *ompA*, a inédita amplificação de *R. monteiroi* para este alvo molecular sugere que o não anelamento nas regiões de interesse, empregando os primers usuais, pode interferir diretamente no percentual de positividade de exemplares avaliados. Faz-se necessário, então, garantir que as novas espécies de *Rickettsia* reconhecidamente presentes no Brasil sejam detectáveis ao empregarmos os protocolos tradicionais.

Aditivamente, os resultados acerca da coinfeção de carrapatos, exposto em detalhes no capítulo III, levantam a possibilidade de interferência no reconhecimento de múltiplas espécies de *Rickettsia* em um único exemplar do ectoparasito. Considerando as diferentes cargas microbianas possivelmente presentes no artrópode, seria mesmo possível detectar os microorganismos do gênero *Rickettsia* em sua totalidade através de reações de PCR não espécie-específicas para os alvos *htrA*, *gltA*, *ompA* e *ompB*? A ocorrência de coinfeção por múltiplos agentes microbianos já foi apontada como um evento subestimado e o desenvolvimento de delineamento experimental que permita, por exemplo, o reconhecimento de múltiplas espécies de *Rickettsia* SFG em um único carrapato poderia evidenciar regiões endêmicas para FMB até então desconhecidas (MOUTAILLER et al., 2016). Paralelamente, o reconhecido efeito dos métodos de conservação de exemplares obtidos em estudos a campo sobre o DNA do carrapato poderia também afetar diretamente o material genético de bactérias endossimbiontes. A menor taxa de amplificação de genes mitocondriais a partir de amostras de carrapato conservadas em isopropanol, método empregado em maior frequência na literatura, poderia também afetar a amplificação de reações de PCR para *Rickettsia* o que, novamente, resultaria na subestimação da positividade das amostras (VARELA, 2016). Assim sendo, o constante questionamento e revisão das metodologias empregadas tornam-se fundamentais para o aprimoramento desta e outras áreas de estudo.

Ao reconhecermos o dinamismo nas áreas de ixodologia e riquetsiologia e a possível obsolescência dos protocolos apresentados nos capítulos I e II, devido a descrição ou introdução de novas espécies no Brasil, fez-se necessário planejar medidas que visem garantir a rápida atualização das ferramentas moleculares desenvolvidas. Esta necessidade deve-se, principalmente, ao intervalo de tempo requerido entre a submissão e publicação de novos dados na literatura científica, o que tornaria o processo de atualização extremamente lento (BJÖRK & SOLOMON, 2013). Desta forma, a plataforma on-line apresentada no capítulo IV pode ser considerada um meio adequado para este fim. Adicionalmente, sabendo que o sequenciamento molecular em larga escala é especialmente desafiador em países em desenvolvimento, muitas vezes devido a baixa tecnificação de laboratórios e expertise de profissionais, o website fornece ainda a detalhada descrição de etapas críticas para a aplicação da técnica e interpretação dos resultados, algo dificilmente publicável em artigos científicos (HELMY et al., 2016). Há ainda a possibilidade de futura expansão do banco de dados, incluindo, por exemplo, a ixodofauna de demais países da América Latina que compartilham muitas das características ecológicas e socioeconômicas do Brasil (GUGLIELMONE et al., 2006; LABRUNA, 2009).

Doenças vetoriais são um excelente modelo de estudo dentro do conceito de saúde única, onde a indissociável correlação entre a saúde humana, animal e do meio ambiente é reconhecida, assim como a necessária atuação de múltiplos profissionais e acadêmicos de diversas áreas de conhecimento para solução destes desafios (DANTAS-TORRES et al., 2012c). Da mesma forma, ao analisarmos as dimensões continentais do Brasil e os diversos

biomas contidos nesta extensão territorial, o desenvolvimento de estratégias conjuntas por múltiplos grupos de pesquisa possibilitaria a execução de levantamentos de forma mais padronizada e eficaz, reduzindo, por exemplo, os custos associados ao deslocamento de pesquisadores para execução de expedições a campo. Assim, podemos prever que o fórum disponibilizado na plataforma on-line desenvolvida servirá não somente para o aprimoramento das técnicas de identificação molecular, como também para facilitação de parcerias e projetos de pesquisa em nível nacional e, potencialmente, internacional.

Ferramentas moleculares e plataformas on-line são apenas alguns dos exemplos que destacam a influência de novas tecnologias em pesquisas científicas. Estas, muitas vezes, definem o rumo da ciência e a busca por respostas, resultando normalmente em questionamentos adicionais. Contudo, esta tendência não é algo exclusivo do período em que vivemos. A título de exemplo, no século XIX, com a criação de equipamentos e meios que possibilitavam a análise microscópica e o cultivo de micro-organismos, a teoria dos germes e os postulados de Koch definiram os critérios para a determinação de agentes infecciosos como a causa etiológica de enfermidades. Pontos como a verificação da presença do agente, o isolamento do micro-organismo em meio de cultura e a capacidade de reprodução do processo patogênico ao inoculá-lo em indivíduo sadio, foram alguns dos critérios considerados determinantes para a definição etiológica de enfermidades (RAOULT, 2010; LAGIER et al., 2017). Com a possibilidade de acessar informações moleculares, através de ferramentas desenvolvidas nas últimas décadas do século XX, houve uma modificação de paradigma e a detecção do agente microbiano limitou-se, muitas vezes, ao reconhecimento de material genético em amostras biológicas. A obtenção de sequências nucleotídicas de fragmentos amplificados, anteriormente bastante trabalhosa e pouco acessível, foi sendo otimizada. O projeto genoma humano, por exemplo, foi o resultado do trabalho conjunto de múltiplos laboratórios de pesquisa ao redor do globo e demorou aproximadamente 13 anos para ser concluído (SAGOFF, 2019). Em contrapartida, atualmente é possível obter este tipo de informação de forma rápida e mesmo espécies de carrapato já possuem todo o seu material genético devidamente sequenciado (DE LA FUENTE et al., 2016; GULIA-NUSS et al., 2016; BARRERO et al., 2017). Nossa capacitação técnica atual de acessar comunidades microbianas, incluindo micro-organismos não cultiváveis, forneceu também subsídios relevantes para compreender que os processos infecciosos vão muito além da simples presença do agente patogênico. Fatores como a competição e desequilíbrio microbianos podem ser pontos chave para a ocorrência de enfermidades infecciosas. A geração de dados em grande escala, como nos exemplos citados, vem usualmente acompanhada das possíveis aplicações futuras de tais achados (VAYSSIER-TAUSSAT et al., 2015b; BONNET et al., 2017; GREAY et al., 2018).

Contudo, verifica-se que paralelamente ao expressivo aumento no número de dados disponíveis na literatura acerca de carrapatos e patógenos associados, há também uma tendência crescente no número de casos associados a *Rickettsia rickettsii*, por exemplo, como podemos verificar em países como os EUA e Brasil (DE OLIVEIRA et al., 2016; CDC, 2019). Embora interferentes como o aprimoramento nas ferramentas diagnósticas, sensibilização dos profissionais da saúde e mudança climática possam ser utilizados para justificar parcialmente a maior detecção, podemos afirmar que ainda estamos longe de solucionar os problemas relacionados a FMB e outras DTCs (GREER et al., 2008; GRAY et al., 2009; LUCE-FEDROW et al., 2015; BIGGS et al., 2016). Ainda mais alarmante é a verificação de que esta enfermidade responsiva a tratamento, sendo usualmente empregado o antibacteriano doxiciclina para este fim, ainda apresenta elevado índice de letalidade (DE OLIVEIRA et al., 2016; BLANTON, 2019).

Objetivando a prevenção e controle de FMB, múltiplas estratégias vêm sendo implementadas, com enfoque no controle de vetores e reservatórios/amplificadores do agente, bem como a educação e imunização de hospedeiros suscetíveis (ALHASSAN et al., 2018; BENELLI, 2019; HU et al., 2019; ROSENFELD et al., 2019). Estas medidas são apenas possíveis devido ao acúmulo de informações referentes a bioecologia do vetor e epidemiologia da enfermidade, exemplificando a relevância de pesquisas científicas para determinação de medidas intervencionais eficazes. Entretanto, seria a obtenção do genoma completo de artrópodes e o reconhecimento de todos os micro-organismos albergados por agentes vetoriais uma condição fundamental para a solução de DTCs?

Sabe-se que o emprego de tecnologias de ponta na execução de projetos de pesquisa é especialmente atrativo no meio científico e, inquestionavelmente, há uma tendência quanto a sua utilização, quando verificamos os artigos recentemente publicados em periódicos da área (RAOULT, 2010). Contudo, ao aplicarmos uma visão pragmática sobre a problemática das DTCs, e tendo em vista todas as variáveis já mencionadas em associação a cadeia de transmissão destas enfermidades, devemos questionar se a quase inesgotável coleção de dados oriunda destas novas metodologias realmente nos aproxima de uma solução. Diferente dos delineamentos experimentais usualmente empregados, baseados no desenvolvimento e teste de hipóteses, muitas destas novas abordagens focam principalmente na obtenção de dados em larga escala e, apenas posteriormente, realiza-se algum tipo de interpretação e correlação entre eles (RAOULT, 2010; ELLIOTT et al., 2016; SAGOFF, 2019). Esta abordagem não é uma exclusividade desta época e de tecnologias contemporâneas, já que algo similar foi executado por Charles Darwin para a posterior publicação do livro “A Origem das Espécies” (AYALA, 2009). Contudo, a catalogação de informações pode resultar em um número ainda maior de variáveis a serem consideradas, sem que estas sejam de fato relevantes para a interrupção da cadeia de transmissão de DTCs. Ao priorizarmos a implementação de tecnologia para pesquisas científicas, em detrimento da elaboração de hipóteses bem formuladas, passamos a obter um grande número de respostas para perguntas de relevância questionável (SAGOFF, 2019).

Adicionalmente, deve-se reconhecer as limitações orçamentárias normalmente presentes em países em desenvolvimento, como o Brasil. Muitas destas tecnologias são praticamente inacessíveis e mesmo técnicas mais usuais como o sequenciamento de pequenos fragmentos gênicos tornam-se inviáveis ao pensarmos em sua aplicação em larga escala. A ocorrência de cortes orçamentários para o financiamento de projetos científicos, como verificado recentemente em nosso país, ampliam tais limitadores e impactam diretamente a execução de projetos de pesquisa e publicações científicas subseqüentes (GIBNEY, 2015; MOURA & CAMARGO JUNIOR, 2017). Uma rápida busca no banco de dados PubMed empregando os termos-chave “Tick AND Brazil” demonstra que após vertiginoso aumento no número de artigos depositados nesta base de dados, especialmente a partir do ano de 2002, chegou-se a um platô na curva de crescimento, que se estende de 2016 aos dias atuais.

Tais fatores, porém, podem servir como agentes catalisadores para a revisão de metodologias e o desenvolvimento de medidas alternativas para suplantar estes e outros obstáculos. Portanto, as metodologias e ferramentas desenvolvidas no decorrer do presente documento visam o fornecimento de meios que possibilitem a redemocratização da ixodologia e riquetsiologia brasileira, fomentando a produção de dados de elevada qualidade e possibilitando, com isso, a tomada de decisões assertivas para a prevenção e controle de TBDs em território nacional.

4 CONCLUSÕES

Os protocolos PCR-RFLP baseados na ação das enzimas endonuclease de restrição *VspI* e *DraI* sobre o gene mitocondrial 16S rDNA apresenta potencial discriminatório satisfatório para identificação de carrapatos ixodídeos reportados em território brasileiro.

A utilização de enzimas endonuclease de restrição secundárias facilita a implementação do protocolo PCR-RFLP instituído para identificação dos componentes da ixodofauna brasileira.

Da mesma forma, a combinação de múltiplos genes responsáveis pela síntese proteica (*htrA*, *ompA* e *ompB*) de bactérias *Rickettsia* spp. e endonucleases de restrição (*AluI*, *MspI*, *PstI* e *RsaI*) propiciam meios para identificação dos componentes deste gênero associados a carrapatos e reportados no continente sul-americano.

O desenvolvimento e implementação de novos oligonucleotídeos iniciadores específicos para *Rickettsia bellii* potencializaram a capacidade de detecção de coinfeção por múltiplos componentes deste gênero bacteriano em um único exemplar de carrapato. A detecção de coinfeção de *Rickettsia bellii* e *Rickettsia* SFG na amostragem testada, evidencia a subestimação deste evento em estudos prévios.

O website TickCutter apresenta-se como uma alternativa para a atualização dos protocolos desenvolvidos, facilitando ainda a implementação destes por demais grupos de pesquisa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDAD, M.Y. et al. A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 56, n. 8, p. 1–10, 2018.
- ABRAHAM, N.M. et al. Pathogen-mediated manipulation of arthropod microbiota to promote infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 5, p. E781–E790, 2017.
- ABREU, D.P.B. et al. Two for the price of one: Co-infection with *Rickettsia bellii* and spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) ticks recovered from wild birds in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, p. 101266, 2019.
- ALHASSAN, A. et al. *Rickettsia rickettsii* Whole-Cell Antigens Offer Protection against Rocky Mountain Spotted Fever in the Canine Host. **Infection and Immunity**, v. 87, n. 2, p. 1–16, 2018.
- ALMEIDA, A.P. et al. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 209–212, 2011.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403–410, 1990.
- ANH, D.N. et al. Identification of *Fasciola* Species Isolates from Nghe An Province, Vietnam, Based on ITS1 Sequence of Ribosomal DNA Using a Simple PCR-RFLP Method. **Journal of Parasitology Research**, v. 2018, p. 1–6, 2018.
- APANASKEVICH, D.A.; BERMÚDEZ, S.E. Description of a new species of *Ixodes* Latreille, 1795 (Acari: Ixodidae) and redescription of *I. lasallei* Méndez & Ortiz, 1958, parasites of agoutis and pacas (Rodentia: Dasyproctidae, Cuniculidae) in Central and South America. **Systematic Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 463–475, 2017.
- APPERSON, C.S. et al. Tick-Borne Diseases in North Carolina: Is “*Rickettsia amblyommii*” a Possible Cause of Rickettsiosis Reported as Rocky Mountain Spotted Fever? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 5, p. 597–606, 2008.
- ARAGÃO, H. DE B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759–843, 1936.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. DA. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de ixodologia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115–129, 1961.
- ARAYA-ANCHETTA, A. et al. Thirty years of tick population genetics: A comprehensive review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 29, p. 164–179, 2015.
- ASH, A. et al. Morphological and molecular description of *Ixodes woyliei* n. sp. (Ixodidae) with consideration for co-extinction with its critically endangered marsupial host. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 70, 2017.

- AYALA, F.J. Darwin and the Scientific Method. **PNAS**, v. 106, suppl. 1, p. 10033-10039, 2009.
- BAGHERI, G.; LEHNER, J.D.; ZHONG, J. Enhanced detection of *Rickettsia* species in *Ixodes pacificus* using highly sensitive fluorescence *in situ* hybridization coupled with Tyramide Signal Amplification. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 6, p. 915–921, 2017.
- BARBIERI, A.R.M. et al. Species richness and seasonal dynamics of ticks with notes on rickettsial infection in a Natural Park of the Cerrado biome in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 442–453, 2019.
- BARBIERI, F.S. et al. Description of the larva of *Amblyomma calcaratum* Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 6, p. 531–536, 2013.
- BARNISH, G.; CREWE, W.; THEAKSTON, R.D. Parasitologists lost? **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 10, p. 454–455, 2006.
- BARRERO, R.A. et al. Gene-enriched draft genome of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*: assembly by the hybrid Pacific Biosciences/Illumina approach enabled analysis of the highly repetitive genome. **International Journal for Parasitology**, v. 47, n. 9, p. 569–583, 2017.
- BARROS-BATTESTI, D.M. et al. *Ixodes (Multidentatus) paranaensis* n. sp. (Acari: Ixodidae) a parasite of *Streptoprocne biscutata* (Sclater 1865) (Apodiformes: Apodidae) birds in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 93–102, 2003.
- BARROS-BATTESTI, D.M. et al. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 268, 2015.
- BEATI, L. et al. Phylogeography and Demographic History of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the Tropical Bont Tick. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 6, p. 514–525, 2012.
- BEATI, L. et al. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 1, p. 267, 2013.
- BEATI, L.; KEIRANS, J.E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **The Journal of parasitology**, v. 87, n. 1, p. 32–48, 2001.
- BEATI, L.; KLOMPEN, H. Phylogeography of Ticks (Acari: Ixodida). **Annual Review of Entomology**, v. 64, n. 1, p. 379–397, 2019.
- BEELER, E. et al. A Focus of Dogs and *Rickettsia massiliae*-Infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 244–249, 2011.
- BEIER-SEXTON, M. et al. The Family Rickettsiaceae. In: GOLDMAN, E.; GREEN, L. H. (Eds.). **Practical Handbook of Microbiology**. 3rd. ed. Florida: CRC Press, 2015. p. 547–566.
- BELLI, A. et al. Ticks infected via co-feeding transmission can transmit Lyme borreliosis to vertebrate hosts. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 5006, 2017.

BENELLI, G. Managing mosquitoes and ticks in a rapidly changing world – Facts and trends. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 26, n. 5, p. 921–929, 2019.

BERG, H. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In: MAGDELDIN, S. (Ed.). **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**. Rijeka: InTech, 2012. p. 315–334.

BERRADA, Z.L. et al. *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) From Kansas. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 461–467, 2011.

BEZERRA, M.C.F. et al. Seropositivity for *Rickettsia* spp. and *Ehrlichia* spp. in the human population of Mato Grosso, Central-Western Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 50, n. 3, p. 399–403, 2017.

BIGGS, H.M. et al. Diagnosis and Management of Tickborne Rickettsial Diseases: Rocky Mountain Spotted Fever and Other Spotted Fever Group Rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis — United States. **MMWR. Recommendations and Reports**, v. 65, n. 2, p. 1–44, 2016.

BILLETER, S.A. et al. Detection of “*Rickettsia amblyommii*” in Association with a Tick Bite Rash. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 607–610, 2007.

BITENCOURTH, K. et al. *Amblyomma sculptum*: genetic diversity and rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, n. 4, p. 427–437, 2017.

BITENCOURTH, K. et al. Genetic diversity, population structure and rickettsias in *Amblyomma ovale* in areas of epidemiological interest for spotted fever in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 2, p. 256–268, 2019.

BJÖRK, B.-C.; SOLOMON, D. The publishing delay in scholarly peer-reviewed journals. **Journal of Informetrics**, v. 7, n. 4, p. 914–923, 2013.

BLAIR, P.J. et al. Characterization of Spotted Fever Group Rickettsiae in Flea and Tick Specimens from Northern Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4961–4967, 2004.

BLANTON, L.S. The Rickettsioses. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 213–229, 2019.

BOINAS, F.S. et al. The Persistence of African Swine Fever Virus in Field-Infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF Endemic Period in Portugal. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20383, 2011.

BONNET, S.I. et al. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. June, p. 1–14, 2017.

BOULANGER, N. et al. Ticks and tick-borne diseases. **Médecine et Maladies Infectieuses**, p. 1–11, 2019.

BOUYER, D.H. et al. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**,

v. 51, n. 2, p. 339–347, 2001.

BROWN, L.D.; MACALUSO, K.R. *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. **Current Tropical Medicine Reports**, v. 3, n. 2, p. 27–39, 2016.

BUDACHETRI, K. et al. The tick endosymbiont *Candidatus Midichloria mitochondrii* and selenoproteins are essential for the growth of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick vector. **Microbiome**, v. 6, n. 1, p. 141, 2018.

BURGDORFER, W. et al. *Rhipicephalus sanguineus*: Vector of a new spotted fever group rickettsia in the United States. **Infection and Immunity**, v. 12, n. 1, p. 205–10, 1975.

BURGDORFER, W.; HAYES, S.F., MAVROS, A.J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: BURGDORFER, W.; ANACKER, R. (Ed.). . **Rickettsiae and Rickettsial Diseases**. New York: Academic Press, 1981. p. 585–94.

BURGER, T.D.; SHAO, R.; BARKER, S.C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 76, n. 1, p. 241–253, 2014.

CABEZAS-CRUZ, A. et al. Tick–Pathogen Interactions: The Metabolic Perspective. **Trends in Parasitology**, v. 35, n. 4, p. 316–328, 2019.

CABEZAS-CRUZ, A.; VALDÉS, J.J. Are ticks venomous animals? **Frontiers in Zoology**, v. 11, n. 1, p. 47, 2014.

CABEZAS-CRUZ, A.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; GREUB, G. Tick-borne pathogen detection: what’s new? **Microbes and Infection**, v. 20, n. 7–8, p. 441–444, 2018.

CALDEIRA, R.L. et al. Characterization of South American Snails of the Genus *Biomphalaria* (Basommatophora : Planorbidae) and *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes : Trematoda) in Molluscs by PCR-RFLP. v. 2016, p. 5–9, 2016.

CARMICHAEL, J.R.; FUERST, P.A. Molecular Detection of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montanensis*, and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* Tick from Nature. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 2, p. 111–115, 2010.

CASADEVALL, A. Cards of Virulence and the Global Virulome for Humans. **Microbe**, v. 1, n. 8, p. 359–364, 2006.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF). Disponível em: <https://www.cdc.gov/rmsf/index.html>. Acesso em: 19 out. 2019

CERUTTI, F. et al. The microbiota of hematophagous ectoparasites collected from migratory birds. **PLOS ONE**, v. 13, n. 8, p. e0202270, 2018.

CHEN, L.F.; SEXTON, D.J. What’s New in Rocky Mountain Spotted Fever? **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 3, p. 415–432, 2008.

CHITIMIA-DOBLER, L. et al. *Amblyomma birmittum* a new species of hard tick in Burmese amber. **Parasitology**, v. 144, n. 11, p. 1441–1448, 2017.

CHOI, Y.-J. et al. Evaluation of PCR-Based Assay for Diagnosis of Spotted Fever Group

- Rickettsiosis in Human Serum Samples. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 12, n. 6, p. 759–763, 2005.
- CHUNG, M. et al. Using Core Genome Alignments To Assign Bacterial Species. **mSystems**, v. 3, n. 6, p. 328021, 2018.
- CICUTTIN, G.L. et al. Molecular characterization of *Rickettsia massiliae* and *Anaplasma platys* infecting *Rhipicephalus sanguineus* ticks and domestic dogs, Buenos Aires (Argentina). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 484–488, 2014.
- CLARK, K. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. D1, p. D67–D72, 2016.
- COLWELL, D.D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: Emerging scenarios and new perspectives. **Veterinary Parasitology**, v. 182, n. 1, p. 14–21, 2011.
- COSTA, A.P. DA et al. A serological and molecular survey of *Babesia vogeli*, *Ehrlichia canis* and *Rickettsia* spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 1, p. 28–35, 2015.
- COSTA, F.B. et al. New records of *Rickettsia bellii*-infected ticks in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 92–95, 2017a.
- COSTA, F.B. et al. *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks and exposure of domestic dogs to *Rickettsia* spp. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. **PLOS ONE**, v. 12, n. 6, p. e0179163, 2017b.
- CRUICKSHANK, R.H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **Systematic and Applied Acarology**, v. 7, n. 1, p. 3–14, 2002.
- DA COSTA, P.S.G.; BRIGATTE, M.E.; GRECO, D.B. Antibodies to *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia typhi*, *Coxiella burnetii*, *Bartonella henselae*, *Bartonella quintana* and *Ehrlichia chaffeensis* among healthy population in Minas Gerais, Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 853–859, 2005.
- DA CUNHA AMARAL, H.L. et al. Community of arthropod ectoparasites of two species of *Turdus* Linnaeus, 1758 (Passeriformes: Turdidae) in southern Rio Grande do Sul, Brazil. **Parasitology Research**, v. 112, n. 2, p. 621–628, 2013.
- DALL'AGNOL, B. et al. “*Candidatus Rickettsia asemboensis*” in *Rhipicephalus sanguineus* ticks, Brazil. **Acta Tropica**, v. 167, p. 18–20, 2017.
- DANTAS-TORRES, F. Ticks on domestic animals in Pernambuco, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 03, p. 22–28, 2009.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Exposure of small mammals to ticks and rickettsiae in Atlantic Forest patches in the metropolitan area of Recife, North-eastern Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 1, p. 83–91, 2012a.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Description of a New Species of Bat-Associated Argasid Tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 36–45, 2012b.
- DANTAS-TORRES, F. et al. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, p. 101252, 2019.

- DANTAS-TORRES, F.; CASTILHO ONOFRIO, V.; BARROS-BATTESTI, D.M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 14, n. 1, p. 30, 2009.
- DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437–446, 2012c.
- DE BONI, R.B. et al. Internet-based HIV self-testing program to increase HIV testing uptake for men who have sex with men in Brazil (Preprint). **Journal of Medical Internet Research**, v. 21, 2019.
- DE LA FUENTE, J. et al. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. **European Journal of Wildlife Research**, v. 50, n. 4, p. 187–196, 2004.
- DE LA FUENTE, J. et al. Flying ticks: anciently evolved associations that constitute a risk of infectious disease spread. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 538, 2015.
- DE LA FUENTE, J. et al. Tick Genome Assembled: New Opportunities for Research on Tick-Host-Pathogen Interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 6, n. September, p. 10–13, 2016.
- DE LA FUENTE, J. et al. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. 7–8, p. 401–409, 2017.
- DE LIMA, P.H.C. et al. Sequencing and comparative analysis of the *Amblyomma sculptum* mitogenome. **Veterinary Parasitology**, v. 247, p. 121–128, 2017.
- DE OLIVEIRA, S.V. et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 22, 2016.
- DE OLIVEIRA, S.V. et al. Human parasitism and toxicosis by *Ornithodoros rietcorraei* (Acari: Argasidae) in an urban area of Northeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1494–1498, 2018.
- DELISLE, J. et al. Human Infections by Multiple Spotted Fever Group Rickettsiae in Tennessee. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1212–1217, 2016.
- DI LECCE, I. et al. Patterns of *Midichloria* infection in avian-borne African ticks and their trans-Saharan migratory hosts. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 106, 2018.
- DIOP, A.; RAOULT, D.; FOURNIER, P.-E. Rickettsial genomics and the paradigm of genome reduction associated with increased virulence. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 7–8, p. 401–409, 2018.
- DO AMARAL, R.B. et al. Molecular detection of *Bartonella* spp. and *Rickettsia* spp. in bat ectoparasites in Brazil. **PLOS ONE**, v. 13, n. 6, p. e0198629, 2018.
- DOKIANAKIS, E. et al. DNA sequencing confirms PCR-RFLP identification of wild caught *Larroussius* sand flies from Crete and Cyprus. **Acta Tropica**, v. 164, p. 314–320, 2016.

- DORAJOO, S.R. et al. Optimizing Vancomycin Dosing in Chronic Kidney Disease by Deriving and Implementing a Web-Based Tool Using a Population Pharmacokinetics Analysis. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, p. 1–11, 2019.
- DOUGHERTY, E.R. et al. Paradigms for parasite conservation. **Conservation Biology**, v. 30, n. 4, p. 724–733, 2016.
- EBEL, G.D.; KRAMER, L.D. Short Report: Duration of Tick Attachment Required for Transmission of Powassan Virus by Deer Ticks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 268–271, 2004.
- EL KARKOURI, K. et al. Multi-omics Analysis Sheds Light on the Evolution and the Intracellular Lifestyle Strategies of Spotted Fever Group *Rickettsia* spp. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. JUL, p. 1–16, 2017.
- ELLIOTT, K.C. et al. Conceptions of Good Science in Our Data-Rich World. **BioScience**, v. 66, n. 10, p. 880–889, 2016.
- ELLISON, D.W. et al. Genomic Comparison of Virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and Avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 542–550, 2008.
- EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 3, p. 803–810, 1994.
- EREMEEVA, M.E. et al. Isolation and Identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* Ticks Collected in Arizona. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 8, p. 5569–5577, 2006.
- ESTEVE-GASSENT, M.D. et al. Translating ecology, physiology, biochemistry, and population genetics research to meet the challenge of tick and tick-borne diseases in North America. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v. 92, n. 1, p. 38–64, 2016.
- ESTRADA-PEÑA, A. et al. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae: Amblyomminae) tick group: diagnostic characters, description of the larva of *A. parvitarsum* Neumann, 1901, 16S rDNA sequences, distribution and hosts. **Systematic Parasitology**, v. 60, n. 2, p. 99–112, 2005.
- ESTRADA-PEÑA, A. et al. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens—methodological principles and caveats. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. August, p. 1–12, 2013.
- ESTRADA-PEÑA, A. et al. Interactions between tick and transmitted pathogens evolved to minimise competition through nested and coherent networks. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 10361, 2015.
- ESTRADA-PEÑA, A. et al. A comparative test of ixodid tick identification by a network of European researchers. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 4, p. 540–546, 2017a.
- ESTRADA-PEÑA, A.; DE LA FUENTE, J. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. **Antiviral Research**, v. 108, n. 1, p. 104–128, 2014.
- ESTRADA-PEÑA, A.; DE LA FUENTE, J.; CABEZAS-CRUZ, A. Functional Redundancy and Ecological Innovation Shape the Circulation of Tick-Transmitted Pathogens. **Frontiers in**

Cellular and Infection Microbiology, v. 7, n. May, p. 1–11, 2017b.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A. et al. Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 126–139, 2014.

FERIA-ARROYO, T.P. et al. Implications of climate change on the distribution of the tick vector *Ixodes scapularis* and risk for Lyme disease in the Texas-Mexico transboundary region. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 199, 2014.

FERRARI, F.A.G. et al. Isolation of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in Embryonic Cells of Naturally Infected *Amblyomma maculatum* (Ixodida: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 5, p. 1118–1125, 2013.

FONG, P. et al. *In Silico* and *In Vitro* Anti-*Helicobacter pylori* Effects of Combinations of Phytochemicals and Antibiotics. **Molecules**, v. 24, n. 19, p. 3608, 2019.

FOURNIER, P.-E. et al. Gene Sequence-Based Criteria for Identification of New *Rickettsia* Isolates and Description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5456–5465, 2003.

FOURNIER, P.-E. et al. From culturomics to taxonomogenomics: A need to change the taxonomy of prokaryotes in clinical microbiology. **Anaerobe**, v. 36, p. 73–78, 2015.

FUKUNAGA, M. et al. Characterization of spirochetes isolated from ticks (*Ixodes tanuki*, *Ixodes turdus*, and *Ixodes columnae*) and comparison of the sequences with those of *Borrelia burgdorferi sensu lato* strains. **Applied and environmental microbiology**, v. 62, n. 7, p. 2338–44, 1996.

GAGE, K.L. et al. DNA Typing of Rickettsiae in Naturally Infected Ticks Using a Polymerase Chain Reaction/Restriction Fragment Length Polymorphism System. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 50, n. 2, p. 247–260, 1994.

GARCÍA-GARCÍA, J.C. et al. A Patient from Argentina Infected with *Rickettsia massiliae*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 4, p. 691–692, 2010.

GARCIA, M.V. et al. Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 124–128, 2013.

GELLER, J. et al. Tick-Borne Pathogens in Ticks Feeding on Migratory Passerines in Western Part of Estonia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 7, p. 443–448, 2013.

GIANIZELLA, S.L. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) of the state of Amazonas, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 74, n. 2, p. 177–183, 2018.

GIBNEY, E. Brazilian science paralysed by economic slump. **Nature**, v. 526, n. 7571, p. 16–17, 2015.

GILLESPIE, J.J. et al. Plasmids and Rickettsial Evolution: Insight from *Rickettsia felis*. **PLoS ONE**, v. 2, n. 3, p. e266, 2007.

GOMEZ-BARROSO, D. et al. Mediterranean spotted fever rickettsiosis in Italy, 2001–2015: Spatio-temporal distribution based on hospitalization records. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 1, p. 43–50, 2019.

- GONÇALVES, L.R. et al. Study on coinfecting vector-borne pathogens in dogs and ticks in Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 3, p. 407–412, 2014.
- GOODRICH, J.K. et al. Conducting a Microbiome Study. **Cell**, v. 158, n. 2, p. 250–262, 2014.
- GRAY, J.S. et al. Effects of Climate Change on Ticks and Tick-Borne Diseases in Europe. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p. 1–12, 2009.
- GREAY, T.L. et al. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 12, 2018.
- GREER, A.; NG, V.; FISMAN, D. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. **CMAJ: Canadian Medical Association Journal**, v. 178, n. 6, p. 715–22, 2008.
- GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.
- GRUHN, K.D. et al. Evaluation of rickettsial infection in free-range capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) (Rodentia: Caviidae) and ticks (Acari: Ixodidae) in the Western Amazon, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 981–986, 2019.
- GUGLIELMONE, A.A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83–100, 2006.
- GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S. Hosts of *Amblyomma dissimile* Koch, 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Zootaxa**, v. 2541, n. 1, p. 27, 2010.
- GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G. **Hard Ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae) Parasitizing Humans**. Cham: Springer International Publishing, 2018. 314 p.
- GULIA-NUSS, M. et al. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 10507, 2016.
- GUO, T. et al. *Ixodes kangdingensis* (Acari: Ixodidae), a new species from the Siberian weasel, *Mustela sibirica* (Carnivora: Mustelidae) in China. **Parasitology Open**, v. 3, p. e7, 2017.
- GURFIELD, N. et al. Endosymbiont interference and microbial diversity of the Pacific coast tick, *Dermacentor occidentalis*, in San Diego County, California. **PeerJ**, v. 5, p. e3202, 2017.
- HALAJIAN, A. et al. Detection of zoonotic agents and a new *Rickettsia* strain in ticks from donkeys from South Africa: Implications for travel medicine. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 26, n. May, p. 43–50, 2018.
- HAMER, S.A.; CURTIS-ROBLES, R.; HAMER, G.L. Contributions of citizen scientists to arthropod vector data in the age of digital epidemiology. **Current Opinion in Insect Science**, v. 28, p. 98–104, 2018.
- HASLE, G. Transport of ixodid ticks and tick-borne pathogens by migratory birds. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. September, p. 1–6, 2013.
- HAWLENA, H. et al. The arthropod, but not the vertebrate host or its environment, dictates bacterial community composition of fleas and ticks. **The ISME Journal**, v. 7, n. 1, p. 221–223,

2013.

HEBERT, P.D.N. et al. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, p. e312, 2004.

HECHT, J.A. et al. Development of a *Rickettsia bellii*- Specific TaqMan Assay Targeting the Citrate Synthase Gene. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 6, p. 1492–1495, 2016.

HELMY, M.; AWAD, M.; MOSA, K.A. Limited resources of genome sequencing in developing countries: Challenges and solutions. **Applied & Translational Genomics**, v. 9, p. 15–19, 2016.

HEYLEN, D.J.A.; MATTHYSEN, E. Contrasting detachment strategies in two congeneric ticks (Ixodidae) parasitizing the same songbird. **Parasitology**, v. 137, n. 4, p. 661–667, 2010.

HIRUNKANOKPUN, S. et al. Horizontal transmission of *Rickettsia felis* between cat fleas, *Ctenocephalides felis*. **Molecular Ecology**, v. 20, n. 21, p. 4577–4586, 2011.

HOOSHYAR, H. et al. Molecular identification of *Sarcocystis* species in raw hamburgers using PCR–RFLP method in Kashan, central Iran. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 41, n. 4, p. 1001–1005, 2017.

HORAK, I.G.; CAMICAS, J.-L.; KEIRANS, J.E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): A World List of Valid Tick Names. **Experimental and Applied Acarology**, v. 28, n. 1–4, p. 27–54, 2002.

HORTA, M.C. et al. Prevalence of *Rickettsia felis* in the Fleas *Ctenocephalides felis felis* and *Ctenocephalides canis* from Two Indian Villages in Sao Paulo Municipality, Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 361–363, 2006a.

HORTA, M.C. et al. Natural Infection, Transovarial Transmission, and Transstadial Survival of *Rickettsia bellii* in the Tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 285–290, 2006b.

HORTA, M.C. et al. *Rickettsia bellii* in *Amblyomma rotundatum* ticks parasitizing *Rhinella jimi* from northeastern Brazil. **Microbes and Infection**, v. 17, n. 11–12, p. 856–858, 2015.

HOSSAIN, M. Frugal innovation: A review and research agenda. **Journal of Cleaner Production**, v. 182, p. 926–936, 2018.

HOSSAIN, M.; SIMULA, H.; HALME, M. Can frugal go global? Diffusion patterns of frugal innovation. **Technology in Society**, v. 46, p. 132–139, 2016.

HU, S.Y. et al. Knowledge and prevention of tickborne diseases among Hispanic and non-Hispanic residents of Maryland and Virginia. **Zoonoses and Public Health**, v. 66, n. 7, p. 805–812, 2019.

IBAÑEZ-JUSTICIA, A. et al. The first detected airline introductions of yellow fever mosquitoes (*Aedes aegypti*) to Europe, at Schiphol International airport, the Netherlands. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 603, 2017.

IMAOKA, K. et al. The First Human Case of *Rickettsia tamurae* Infection in Japan. **Case Reports in Dermatology**, v. 3, n. 1, p. 68–73, 2011.

- JADO, I. et al. *Rickettsia monacensis* and Human Disease, Spain. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 9, p. 1405–1407, 2007.
- JIANG, J. et al. Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia asemboensis* in Fleas from Human Habitats, Asembo, Kenya. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 8, p. 550–558, 2013.
- JIANG, J.; STROMDAHL, E.Y.; RICHARDS, A.L. Detection of *Rickettsia parkeri* and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyomma maculatum* Gulf Coast Ticks Collected from Humans in the United States. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 3, p. 175–182, 2012.
- JIANG, J.U.; TEMENAK, J.J.; RICHARDS, A.L. Real-Time PCR Duplex Assay for *Rickettsia prowazekii* and *Borrelia recurrentis*. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, n. 1, p. 302–310, 2003.
- JOHNSON, P.T.J.; DE ROODE, J.C.; FENTON, A. Why infectious disease research needs community ecology. **Science**, v. 349, n. 6252, p. 1259504–1259504, 2015.
- JONES, K.E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990–993, 2008.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S3–S14, 2004.
- JOSEK, T. et al. Fatal attraction: lone star ticks (*Amblyomma americanum*) exhibit preference for human female breath over male breath. **Experimental and Applied Acarology**, v. 77, n. 1, p. 59–64, 2019.
- KADING, R.C. et al. Advanced surveillance and preparedness to meet a new era of invasive vectors and emerging vector-borne diseases. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 10, p. e0006761, 2018.
- KAHL, O. Hard ticks as vectors—some basic issues. **Wiener klinische Wochenschrift**, v. 130, n. 15–16, p. 479–483, 2018.
- KANG, J.-M. et al. PCR-RFLP for Rapid Subtyping of *Plasmodium vivax* Korean Isolates. **The Korean Journal of Parasitology**, v. 55, n. 2, p. 159–165, 2017.
- KARATZAS, E. et al. A Web Tool for Ranking Candidate Drugs Against a Selected Disease Based on a Combination of Functional and Structural Criteria. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 17, p. 939–945, 2019.
- KARPATY, S.E. et al. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia* associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in North, Central and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, n. 12, p. 5236–5243, 2016.
- KATO, C.Y. et al. Assessment of Real-Time PCR Assay for Detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in Banked Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 314–317, 2013.
- KOFFI, J.K. et al. Evaluating the submission of digital images as a method of surveillance for *Ixodes scapularis* ticks. **Parasitology**, v. 144, n. 7, p. 877–883, 2017.

- KORDALEWSKA, M. et al. PCR-RFLP assays for species-specific identification of fungi belonging to *Scopulariopsis* and related genera. **Medical Mycology**, v. 57, n. 5, p. 643–648, 2019.
- KRAWCZAK, F.S. et al. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, p. 28–37, 2015.
- KRAWCZAK, F.S. et al. *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest Infection in a Patient from a Spotted Fever-Endemic Area in Southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551–553, 2016.
- KRAWCZAK, F.S. et al. Genotypic Characterization of *Rickettsia bellii* Reveals Distinct Lineages in the United States and South America. **BioMed Research International**, v. 2018, p. 1–8, 2018.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016.
- LABRUNA, M.; VENZAL, J. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 4, p. 355–363, 2009.
- LABRUNA, M.B. et al. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90–98, 2004a.
- LABRUNA, M.B. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondonia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, n. 1, p. 17, 2004b.
- LABRUNA, M.B. et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073–1081, 2004c.
- LABRUNA, M.B. et al. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, n. 2, p. 169–174, 2005a.
- LABRUNA, M.B. et al. Human parasitism by the capybara tick, *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Entomological News**, v. 118, n. 1, p. 77–81, 2007a.
- LABRUNA, M.B. et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of Sao Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869–873, 2007b.
- LABRUNA, M.B. et al. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 2, p. 147–160, 2007c.
- LABRUNA, M.B. et al. New Reports of *Antricola guielmonei* and *Antricola delacruzii* in Brazil, and a Description of a New Argasid Species (Acari). **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 788–792, 2008.
- LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 156–166, 2009.
- LABRUNA, M.B. et al. Redescription of the female, description of the male, and several new

- records of *Amblyomma parkeri* (Acari: Ixodidae), a South American tick species. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, n. 3, p. 243–260, 2009.
- LABRUNA, M.B. et al. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) infesting tapirs (*Tapirus terrestris*) and peccaries (*Tayassu pecari*) in Peru. **Systematic and Applied Acarology**, v. 15, n. 2, p. 109–112, 2010.
- LABRUNA, M.B. et al. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 829–834, 2011a.
- LABRUNA, M.B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435–2457, 2011b.
- LABRUNA, M.B. et al. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 511, 2016.
- LABRUNA, M.B.; TERRASSINI, F. A; CAMARGO, L.M. A. First Report of the Male of *Amblyomma rotundatum* (Acari: Ixodidae) from a Field-Collected Host. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 6, p. 945–947, 2005b.
- LACHISH, S. et al. Epidemiology of the Emergent Disease Paridae pox in an Intensively Studied Wild Bird Population. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e38316, 2012.
- LADO, P. et al. *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae): Phylogeography and systematic considerations. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 817–827, 2016.
- LADO, P. et al. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) group of ticks: phenotypic plasticity or incipient speciation? **Parasites & Vectors**, v. 11, n. 1, p. 610, 2018.
- LAFFERTY, K.D. et al. Parasites in food webs: the ultimate missing links. **Ecology Letters**, v. 11, n. 6, p. 533–546, 2008.
- LAFFERTY, K.D.; KURIS, A.M. Ecological consequences of manipulative parasites. In: HUGHES, D.P.; BRODEUR, J.; THOMAS, F. (Eds.). **Host Manipulation by Parasites**. [s.l.] Oxford: Oxford University Press, 2012. p. 158–168.
- LAGIER, J.-C. et al. Koch Postulate: Why Should we Grow Bacteria? **Archives of Medical Research**, v. 48, n. 8, p. 774–779, 2017.
- LANE, R.S.; STEINLEIN, D.B.; MUN, J. Human Behaviors Elevating Exposure to *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) Nymphs and Their Associated Bacterial Zoonotic Agents in a Hardwood Forest. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 2, p. 239–248, 2004.
- LECLÈRE, B.; BUCKERIDGE, D.L.; LEPELLETIER, D. Evaluation of a web-based tool for labelling potential hospital outbreaks: a mixed methods study. **Journal of Hospital Infection**, v. 103, n. 2, p. 210–216, 2019.
- LEE, J.K. et al. *Rickettsia parkeri* and “*Candidatus* *Rickettsia andeanae*” in Questing *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) From Mississippi. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 2, p. 476–480, 2017.
- LEHANE, M.J. Digestive enzymes, haemolysins and symbionts in the search for vaccines against blood-sucking insects. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 1, p. 27–32,

1994.

LEVI, T. et al. Deer, predators, and the emergence of Lyme disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 27, p. 10942–10947, 2012.

LITERAK, I. et al. Ticks on passerines from the Archipelago of the Azores as hosts of borreliæ and rickettsiæ. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 5, p. 607–610, 2015.

LIU, G.-H. et al. Complete Mitochondrial Genome Sequence Data Provides Genetic Evidence That the Brown Dog Tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Represents a Species Complex. **International Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 4, p. 361–369, 2013.

LOBATO-MÁRQUEZ, D.; DÍAZ-OREJAS, R.; GARCÍA-DEL PORTILLO, F. Toxin-antitoxins and bacterial virulence. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 40, n. 5, p. 592–609, 2016.

LOGIUDICE, K. et al. The ecology of infectious disease: Effects of host diversity and community composition on Lyme disease risk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 2, p. 567–571, 2003.

LUCE-FEDROW, A. et al. Strategies for detecting rickettsiæ and diagnosing rickettsial diseases. **Future Microbiology**, v. 10, n. 4, p. 537–564, 2015.

LUGARINI, C. et al. Rickettsial agents in avian ixodid ticks in northeast Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 364–375, 2015.

LUZ, H.R. et al. Bird ticks in an area of the Cerrado of Minas Gerais State, southeast Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 1, p. 89–99, 2012.

LUZ, H.R. et al. Additional information on ticks (Ixodidae) infesting birds in Atlantic Forest fragments in State of Paraná, South Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 22, n. 11, p. 1813, 2017a.

LUZ, H.R. et al. Ticks parasitizing wild mammals in Atlantic Forest areas in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 2961, p. 2014–2019, 2018a.

LUZ, H.R. et al. A proposed description of the natural life cycle of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) in a primary Atlantic rainforest environment in Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 23, n. 6, p. 1138, 2018b.

LUZ, H.R. et al. Detection of *Rickettsia* spp. in ticks parasitizing toads (*Rhinella marina*) in the northern Brazilian Amazon. **Experimental and Applied Acarology**, v. 75, n. 3, p. 309–318, 2018c.

LUZ, H.R. et al. Some biological and behavioral aspects of *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) under laboratory and natural conditions. **Systematic and Applied Acarology**, v. 23, n. 10, p. 1965–1971, 2018d.

LUZ, H.R. et al. Detection of “*Candidatus Rickettsia wissemanii*” in ticks parasitizing bats (Mammalia: Chiroptera) in the northern Brazilian Amazon. **Parasitology Research**, v. 118, n. 11, p. 3185–3189, 2019.

LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H.; MCINTOSH, D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary

- Brazilian Atlantic Rainforest. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 4, p. 657–665, 2017b.
- LV, J. et al. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 93, 2014.
- MACALUSO, K.R. et al. Rickettsial Infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Inhibits Transovarial Transmission of a Second *Rickettsia*. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 809–813, 2002.
- MACHADO, I.B. et al. Diversity of rickettsiae and potential vectors of spotted fever in an area of epidemiological interest in the Cerrado biome, midwestern Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 32, n. 4, p. 481–489, 2018.
- 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**, v. 84, n. 6, p. 478–484, 1998.
- MANSUETO, P. et al. New Insight into Immunity and Immunopathology of Rickettsial Diseases. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1–26, 2012.
- MARINI, M.Â. et al. Ecological correlates of ectoparasitism on Atlantic Forest, Brazil. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 4, n. 2, p. 93–102, 1996.
- MARTINS, T.F. et al. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75–99, 2010.
- MARTINS, T.F. et al. Morphological description of the nymphal stage of *Amblyomma geayi* and new nymphal records of *Amblyomma parkeri*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 3, p. 181–184, 2013.
- MARTINS, T.F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 186, 2016.
- MARTINS, T.F. et al. A new species of *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) associated with monkeys and passerines of the Atlantic rainforest biome, Southeastern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, p. 101259, 2019.
- 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.
- MATSUMOTO, K.; INOKUMA, H. Identification of spotted fever group rickettsia species by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the *Sca4* gene. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 6, p. 747–749, 2009.
- MATURANO, R. et al. Additional information about tick parasitism in Passeriformes birds in an Atlantic Forest in southeastern Brazil. **Parasitology Research**, v. 114, n. 11, p. 4181–4193, 2015.
- MCINTOSH, D. et al. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 879–883, 2015.

- MCLAIN, D.K. et al. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 32, n. 3, p. 353–60, 1995.
- MEDIANNIKOV, O.Y. et al. Acute Tick-borne Rickettsiosis Caused by *Rickettsia sibirica* in the Russian Far East. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 5, p. 810–817, 2004.
- MENCKE, N. Future challenges for parasitology: Vector control and ‘One health’ in Europe. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 3–4, p. 256–271, 2013.
- MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biological Reviews**, v. 86, n. 2, p. 379–405, 2011.
- MEYER, W. et al. Molecular Typing of IberoAmerican *Cryptococcus neoformans* Isolates. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 2, p. 189–195, 2003.
- MICHEL, T. et al. *Ixodes* spp. (Acari: Ixodidae) ticks in Rio Grande do Sul state, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 22, n. 12, p. 2057–2067, 2017.
- MILLER, M.J. et al. Molecular Ecological Insights into Neotropical Bird–Tick Interactions. **PLOS ONE**, v. 11, n. 5, p. e0155989, 2016.
- MIRANDA, J. et al. *Rickettsia* sp. strain *colombianensi* (Rickettsiales: Rickettsiaceae): A New Proposed *Rickettsia* Detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) From Iguanas and Free-Living Larvae Ticks From Vegetation. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 960–965, 2012.
- MOERBECK, L. et al. *Rickettsia* sp. strain NOD Infecting Ticks (*Amblyomma nodosum*) in an Endemic Area of Spotted Fever in Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 54, n. 2, p. 406–409, 2018.
- MONTEIRO, S.G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**. 2ed. ed. Rio de Janeiro: Roca, 2017. 370 p.
- MORADIPOODEH, B. et al. *In vitro* and *in silico* anticancer activity of amygdalin on the SK-BR-3 human breast cancer cell line. **Molecular Biology Reports**, 2019.
- MORAES-FILHO, J. et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta Tropica**, v. 117, n. 1, p. 51–55, 2011.
- MOREIRA-SOTO, R.D. et al. ‘*Candidatus Rickettsia nicoyana*’: A novel *Rickettsia* species isolated from *Ornithodoros knoxjonesi* in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 4, p. 532–536, 2017.
- MOURA, E.G. DE; CAMARGO JUNIOR, K.R. DE. A crise no financiamento da pesquisa e pós-graduação no Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 33, n. 4, p. 4–6, 2017.
- MOUTAILLER, S. et al. Co-infection of Ticks: The Rule Rather Than the Exception. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004539, 2016.
- MUKUNDARAJAN, H. et al. Using mobile phones as acoustic sensors for high-throughput mosquito surveillance. **eLife**, v. 6, p. 1–26, 2017.
- MULLIS, K.B. The Unusual Origin of the Polymerase Chain Reaction. **Scientific American**,

v. 262, n. 4, p. 56–65, 1990.

MUÑOZ-LEAL, S. et al. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: *Ornithodoros*) associated with stream-breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: *Cycloramphus*) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 5, p. 682–692, 2017.

MUÑOZ-LEAL, S. et al. Isolation and molecular characterization of a relapsing fever *Borrelia* recovered from *Ornithodoros rudis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 4, p. 864–871, 2018.

MURREL, A.; BARKER, S.C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169-172, 2003.

NARASIMHAN, S. et al. Gut Microbiota of the Tick Vector *Ixodes scapularis* Modulate Colonization of the Lyme Disease Spirochete. **Cell Host & Microbe**, v. 15, n. 1, p. 58–71, 2014.

NARAYANAN, S. Applications of restriction fragment length polymorphism. **Annals of Clinical and Laboratory Science**, v. 21, n. 4, p. 291–6, 1991.

NAVA, S. et al. Distribution, hosts, 16S rDNA sequences and phylogenetic position of the Neotropical tick *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 102, n. 5, p. 409–425, 2008.

NAVA, S. et al. Description of a New Argasid Tick (Acari: Ixodida) from Bat Caves in Brazilian Amazon. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1089–1101, 2010a.

NAVA, S. et al. 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, 1. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 2014.

NAVA, S. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): Neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573–1585, 2018.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 14, n. FEBRUARY 2009, p. 2857–77, 2009.

NAVA, S.; VELAZCO, P.M.; GUGLIELMONE, A.A. First record of *Amblyomma longirostre* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) from Peru, with a review of this tick's host relationships. **Systematic and Applied Acarology**, v. 15, n. 1, p. 21–30, 2010b.

NDEKEZI, C. et al. Identification of Ixodid Tick-Specific Aquaporin-1 Potential Anti-tick Vaccine Epitopes: An *in-silico* Analysis. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 7, p. 1–16, 2019.

NEIMARK, H.; KOCAN, K.M. The cell wall-less rickettsia *Eperythrozoon wenyonii* is a *Mycoplasma*. **FEMS Microbiology Letters**, v. 156, n. 2, p. 287–291, 2006.

NIERI-BASTOS, F.A. et al. Comparative Evaluation of Infected and Noninfected *Amblyomma triste* Ticks with *Rickettsia parkeri*, the Agent of an Emerging Rickettsiosis in the New World. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

- NIERI-BASTOS, F.A. et al. *Candidatus Rickettsia andeanae*, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 2, p. 259–261, 2014.
- NIERI-BASTOS, F.A. et al. Phylogenetic Evidence for the Existence of Multiple Strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 8, p. e02872-17, 2018.
- NODEN, B.H.; ARNOLD, D.; GRANTHAM, R. First report of adult *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) in Oklahoma. **Systematic and Applied Acarology**, v. 20, n. 5, p. 468–470, 2015.
- NOVAKOVA, M. et al. Rickettsial infections in ticks from reptiles, birds and humans in Honduras. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 6, p. 737–742, 2015.
- OGATA, H. et al. Genome Sequence of *Rickettsia bellii* Illuminates the Role of *Amoebae* in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. **PLoS Genetics**, v. 2, n. 5, p. e76, 2006.
- OGDEN, N.H.; MECHAI, S.; MARGOS, G. Changing geographic ranges of ticks and tick-borne pathogens: drivers, mechanisms and consequences for pathogen diversity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. August, p. 1–11, 2013.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 103, n. 5, p. 413–425, 2009a.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting Birds in an Atlantic Rain Forest Region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p. 1225–1229, 2009b.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Effect of Forest Fragmentation on Tick Infestations of Birds and Tick Infection Rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. **EcoHealth**, v. 8, n. 3, p. 320–331, 2011a.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1283–1300, 2012.
- OGRZEWALSKA, M. et al. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1–2, p. 145–147, 2013.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Rickettsial infections in ticks from wild birds in Paraguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 2, p. 83–89, 2014.
- OGRZEWALSKA, M. et al. Microorganisms in the ticks *Amblyomma dissimile* Koch 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch 1844 collected from snakes in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 33, n. 1, p. 154–161, 2019.
- 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.; 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, 2011b.

OLIVEIRA, S.V. DE et al. A fatal case of Brazilian spotted fever in a non-endemic area in Brazil: the importance of having health professionals who understand the disease and its areas of transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 653–655, 2016.

OLIVEIRA, S.V. DE et al. *Amblyomma* ticks and future climate: Range contraction due to climate warming. **Acta Tropica**, v. 176, n. June, p. 340–348, 2017.

OLIVEIRA, K. et al. Molecular identification of *Rickettsia felis* in ticks and fleas from an endemic area for Brazilian Spotted Fever. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 2, p. 191–194, 2008.

OSTFELD, R.S. et al. Effects of a zoonotic pathogen, *Borrelia burgdorferi*, on the behavior of a key reservoir host. **Ecology and Evolution**, v. 8, n. 8, p. 4074–4083, 2018.

OSTFELD, R.S.; KEESING, F. Biodiversity and Disease Risk: the Case of Lyme Disease. **Conservation Biology**, v. 14, n. 3, p. 722–728, 2000.

PACHECO, R.C. et al. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomedica : Revista del Instituto Nacional de Salud**, v. 27, n. 3, p. 364–71, 2007.

PACHECO, R.C. et al. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., Infecting the Tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5207–5211, 2011.

PACHECO, R.C. et al. Rickettsial Infection in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected on Birds in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 710–716, 2012.

PADDOCK, C.D. et al. *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 805–811, 2004.

PADDOCK, C.D. The Science and Fiction of Emerging Rickettsioses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 133–143, 2009.

PADDOCK, C.D. et al. High prevalence of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” and apparent exclusion of *Rickettsia parkeri* in adult *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) from Kansas and Oklahoma. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 297–302, 2015.

PADURARU, O.A. et al. Zoonotic Transmission of Pathogens by *Ixodes ricinus* Ticks, Romania. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 12, p. 2089–2090, 2012.

PALOMAR, A.M. et al. Role of Birds in Dispersal of Etiologic Agents of Tick-borne Zoonoses, Spain, 2009. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. 1188–1191, 2012.

PARKER, R.R. et al. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 54, n. 32, p. 1482–1484, set. 1939.

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

- PARTE, A.C. LPSN – List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (bacterio.net), 20 years on. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 68, n. 6, p. 1825–1829, 2018.
- PECKLE, M. et al. Multi-locus phylogenetic analysis groups the New World bacterium *Rickettsia* sp. strain ApPR with the Old World species *R. africae*; proposal of “*Candidatus Rickettsia paranaensis*”. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, p. 101261, 2019.
- PEÑALVER, E. et al. Ticks parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1924, 2017.
- PENICHE-LARA, G. et al. Simple Method to Differentiate among *Rickettsia* Species. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 23, n. 3, p. 203–208, 2013.
- PIACENTINI, V. DE Q. et al. Annotated checklist of the birds of Brazil by the Brazilian Ornithological Records Committee / Lista comentada das aves do Brasil pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v. 23, n. 2, p. 91–298, 2015.
- PINHEIRO, M. DA C. et al. *Amblyomma nodosum* (Neumann, 1899): observations on life cycle under laboratory conditions. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 3, p. 357–360, 2015.
- PINTER, A. et al. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247–252, 2008.
- PIRES, M.S. et al. *Amblyomma cajennense* infestation on horses in two microregions of the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 235–242, 2013.
- POLO, G. et al. Hosts mobility and spatial spread of *Rickettsia rickettsii*. **PLOS Computational Biology**, v. 14, n. 12, p. e1006636, 2018.
- PORTILLO, A. et al. Guidelines for the Detection of *Rickettsia* spp. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 23–32, 2017.
- RAGHAVAN, R.K. et al. Current and Future Distribution of the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum* (L.) (Acari: Ixodidae) in North America. **PLOS ONE**, v. 14, n. 1, p. e0209082, 2019.
- RAHIMIAN, F. et al. A modified PCR-RFLP method to determine genetic diversity of *Giardia lamblia* human isolates based on triosephosphate isomerase (TPI) gene. **Acta Tropica**, v. 186, p. 58–62, 2018.
- RAMACHANDRAN, A. et al. Immunofluorescence as a diagnostic tool. **Indian Journal of Multidisciplinary Dentistry**, v. 7, n. 1, p. 25, 2017.
- RAMOS, D.G. DE S. et al. Rickettsial infection in ticks from wild birds from Cerrado and the Pantanal region of Mato Grosso, midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 6, p. 836–842, 2015.
- RANDOLPH, S.E.; ROGERS, D.J. The arrival, establishment and spread of exotic diseases: patterns and predictions. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 5, p. 361–371, 2010.

- RAOULT, D. Technology-driven research will dominate hypothesis-driven research: the future of microbiology. **Future Microbiology**, v. 5, n. 2, p. 135–137, 2010.
- RATNASINGHAM, S.; HEBERT, P.D.N. A DNA-Based Registry for All Animal Species: The Barcode Index Number (BIN) System. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. e66213, 2013.
- RAUCH, J. et al. *Rickettsia typhi* as Cause of Fatal Encephalitic Typhus in Hospitalized Patients, Hamburg, Germany, 1940–1944. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 11, p. 1982–1987, 2018.
- REGNERY, R.L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576–89, 1991.
- RENVOISÉ, A. et al. Widespread use of real-time PCR for rickettsial diagnosis. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 126–129, 2012.
- RICKETTS, H.T. A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain Spotted Fever. **Journal of the American Medical Association**, v. LII, n. 5, p. 379, 1909.
- RIVERA-PÁEZ, F.A. et al. Contributions to the knowledge of hard ticks (Acari: Ixodidae) in Colombia. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 1, p. 57–66, 2018.
- RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.S.; DE CAMARGO, Z.P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, n. 4, p. 383–387, 2014.
- RODRIGUES, D.S. et al. *Amblyomma rotundatum* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) two-host life-cycle on Viperidae snakes. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 174–178, 2010.
- ROSENFELD, D.A.; POLO, G.; PIZZUTTO, C.S. Brazilian Spotted Fever Prevention through a Nonlethal Capybara Population Control Strategy. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, p. 0–1, 2019.
- ROUX, V. et al. Reassessment of the Taxonomic Position of *Rickettsiella grylli*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 4, p. 1255–1257, 1997.
- ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein *rOmpB* (*ompB*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1449–1455, 1 jul. 2000.
- ROY-DUFRESNE, E. et al. Poleward Expansion of the White-Footed Mouse (*Peromyscus leucopus*) under Climate Change: Implications for the Spread of Lyme Disease. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e80724, 2013.
- ROZEN, S.; SKALETSKY, H. Primer3 on the WWW for General Users and for Biologist Programmers. In: MISENER, S.; KRAWETZ, S.A. (Eds.). **Bioinformatics Methods and Protocols**. New Jersey: Humana Press, 2000. p. 365–386.
- RYU, S. et al. One Health Perspectives on Emerging Public Health Threats. **Journal of Preventive Medicine and Public Health**, v. 50, n. 6, p. 411–414, 2017.

- SAGOFF, M. Can hypothesis-driven research survive the sequence-data deluge? **Microbial Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 414–420, 2019.
- SAKAI, R.K. et al. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 917–923, 2014.
- SÁNDOR, A.D. et al. Do the Ticks of Birds at an Important Migratory Hotspot Reflect the Seasonal Dynamics of *Ixodes ricinus* at the Migration Initiation Site? A Case Study in the Danube Delta. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89378, 2014.
- SANTOLIN, I. D. A.; 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. 2, p. 68–73, 2013.
- SANTOLIN, I.D.A.C. et al. 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.
- SARAIVA, D.G. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 2, p. 159–166, 2012.
- SARWAR, M. Status of Argasid (Soft) Ticks (Acari: Parasitiformes: Argasidae) In Relation To Transmission of Human Pathogens. **International Journal of Vaccines & Vaccination**, v. 4, n. 4, p. 00089, 2017.
- SCHRIEFER, M.E. et al. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 4, p. 949–954, 1994.
- SCOTT, J.D. et al. Birds Disperse Ixodid (Acari: Ixodidae) and *Borrelia burgdorferi* -Infected Ticks in Canada. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 4, p. 493–500, 2001.
- SCOTT, J.D. et al. First Record of *Ixodes affinis* Tick (Acari: Ixodidae) Infected with *Borrelia burgdorferi sensu lato* Collected from a Migratory Songbird in Canada. **Journal of Bacteriology & Parasitology**, v. 7, n. 3, p. 1000281, 2016.
- SEARS, K.T. et al. Surface Proteome Analysis and Characterization of Surface Cell Antigen (*Sca*) or Autotransporter Family of *Rickettsia typhi*. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 8, p. e1002856, 2012.
- SHEN, Z. et al. Development of a tick-borne pathogen qPCR panel for detection of *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Rickettsia*, and Lyme disease *Borrelia* in animals. **Journal of Microbiological Methods**, v. 151, n. May, p. 83–89, 2018.
- SHPYNOV, S.N. et al. New approaches in the systematics of rickettsiae. **New Microbes and New Infections**, v. 23, p. 93–102, 2018.
- SHREINER, A.B.; KAO, J.Y.; YOUNG, V.B. The gut microbiome in health and in disease. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 1, p. 69–75, 2015.
- SILVA, A.B. et al. First report of a *Rickettsia asemonensis* related infecting fleas in Brazil. **Acta Tropica**, v. 172, n. April, p. 44–49, 2017.

- SILVA, A.B. et al. *Rickettsia amblyommatis* infecting *Amblyomma pseudoconcolor* in area of new focus of spotted fever in northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 182, n. March, p. 305–308, 2018.
- SILVA, N. et al. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 275–278, 2011.
- SILVEIRA, I. et al. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111–1113, 2007.
- SILVESTER, R. et al. GroEL PCR- RFLP – An efficient tool to discriminate closely related pathogenic *Vibrio* species. **Microbial Pathogenesis**, v. 105, p. 196–200, 2017.
- SKOSYREV, V.S. et al. Specialized software product for comparative analysis of multicomponent DNA fingerprints. **Genetika**, v. 49, n. 4, p. 531–7, 2013.
- SOARES, H.S. et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental and Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125–140, 2015.
- SPOLIDORIO, M.G. et al. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521–523, 2010.
- SPOLIDORIO, M.G. et al. Rickettsial Infection in Ticks Collected from Road-Killed Wild Animals in Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 6, p. 1510–1514, 2012.
- SPOLIDORIO, M.G. et al. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 2, p. 214–219, 2013.
- STOTHARD, D.R.; CLARK, J.B.; FUERST, P.A. Ancestral Divergence of *Rickettsia bellii* from the Spotted Fever and Typhus Groups of *Rickettsia* and Antiquity of the Genus *Rickettsia*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 44, n. 4, p. 798–804, 1994.
- STRAILY, A. et al. Notes from the Field. **American Journal of Public Health**, v. 81, n. 10, p. 1339–1341, 1991.
- ŠUMILO, D. et al. Socio-economic factors in the differential upsurge of tick-borne encephalitis in central and Eastern Europe. **Reviews in Medical Virology**, v. 18, n. 2, p. 81–95, 2008.
- SZABÓ, M.P.J. et al. *In vitro* isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 719–728, 2013a.
- SZABÓ, M.P.J.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. July, p. 1–9, 2013b.
- SZOKOLI, F. et al. Disentangling the Taxonomy of Rickettsiales and Description of Two Novel Symbionts (“*Candidatus* Bealeia paramacronuclearis” and “*Candidatus* Fokinia cryptica”) Sharing the Cytoplasm of the Ciliate Protist *Paramecium biaurelia*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 24, p. 7236–7247, 2016.
- TAHIR, D. et al. New *Rickettsia* species in soft ticks *Ornithodoros hasei* collected from bats in

- French Guiana. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1089–1096, 2016.
- TALAGRAND-REBOUL, E. et al. Relapsing Fevers: Neglected Tick-Borne Diseases. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, p. 98, 2018.
- TAMEKUNI, K. et al. Serosurvey of antibodies against spotted fever group *Rickettsia* spp. in horse farms in Northern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 259–261, 2010.
- TAMURA, A. et al. Classification of *Rickettsia tsutsugamushi* in a New Genus, *Orientia* gen. nov., as *Orientia tsutsugamushi* comb. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 45, n. 3, p. 589–591, 1995.
- TAY, S.T. et al. Rickettsial Infections in Monkeys, Malaysia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 3, p. 545–547, 2015.
- TAYLOR, L.H.; LATHAM, S.M.; WOOLHOUSE, M.E.J. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 356, n. 1411, p. 983–989, 2001.
- TEIMOURI, A. et al. Molecular Identification of Agents of Human Cutaneous Leishmaniasis and Canine Visceral Leishmaniasis in Different Areas of Iran Using Internal Transcribed Spacer 1 PCR-RFLP. **Journal of Arthropod-Borne Diseases**, v. 12, n. 2, p. 162–171, 2018.
- TELFORD, S.R. Status of the “East Side Hypothesis” (Transovarial Interference) 25 Years Later. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, n. 1, p. 144–150, 2009.
- THANGAMANI, S.; BENTE, D. Establishing protocols for tick containment at Biosafety Level 4. **Pathogens and Disease**, v. 71, n. 2, p. 282–285, 2014.
- THYSSEN, P.J. et al. The value of PCR-RFLP molecular markers for the differentiation of immature stages of two necrophagous flies (Diptera: Calliphoridae) of potential forensic importance. **Neotropical Entomology**, v. 34, n. 5, p. 777–783, 2005.
- TIJSSE-KLASSEN, E.; KOOPMANS, M.P.G.; SPRONG, H. Tick-Borne Pathogen - Reversed and Conventional Discovery of Disease. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. July, p. 1–8, 2014.
- TOKAREVICH, N.K. et al. *Coxiella burnetii* in ticks and wild birds. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 2, p. 377–385, 2019.
- TOLESANO-PASCOLI, G.V. et al. Ticks on birds in a forest fragment of Brazilian cerrado (savanna) in the municipality of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 244–248, 2010.
- TORGA, K. et al. Ticks on birds from Cerrado forest patches along the Uberabinha river in the Triângulo Mineiro region of Minas Gerais, Brazil. **Ciência Rural**, v. 43, n. 10, p. 1852–1857, 2013.
- TORRES, A.C. et al. *Amblyomma* ticks infesting amphibians and Squamata reptiles from the lower Amazon region, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 75, n. 4, p. 399–407, 2018.
- UNTERGASSER, A. et al. Primer3—new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 15, p. e115, 2012.

- USPENSKY, I. The importance of distinguishing between cryptic species by morphological characters. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 389, 2018.
- VAN MAURIK, I.S. et al. Development and Usability of ADappt: Web-Based Tool to Support Clinicians, Patients, and Caregivers in the Diagnosis of Mild Cognitive Impairment and Alzheimer Disease. **JMIR Formative Research**, v. 3, n. 3, p. e13417, 2019.
- VARELA, J.B. **Influência dos Métodos de Conservação Sobre a Recuperação e a Frequência de Amplificação de Marcadores Mitocondriais e Nucleares de Carrapatos das Espécies *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro, 2016.
- VAYSSIER-TAUSSAT, M. et al. How a multidisciplinary ‘One Health’ approach can combat the tick-borne pathogen threat in Europe. **Future Microbiology**, v. 10, n. 5, p. 809–818, 2015a.
- VAYSSIER-TAUSSAT, M. et al. Emerging horizons for tick-borne pathogens: from the ‘one pathogen–one disease’ vision to the pathobiome paradigm. **Future Microbiology**, v. 10, n. 12, p. 2033–2043, 2015b.
- VENZAL, J.M. et al. The *Ornithodoros (Alectorobius) talaje* species group (Acari: Ixodida: Argasidae): description of *Ornithodoros (Alectorobius) rioplatensis* n. sp. from southern South America. **Journal of medical entomology**, v. 45, n. 5, p. 832–40, 2008.
- VESTERLUND, S.-R.; SORVARI, J.; VASEMÄGI, A. Molecular identification of cryptic bumblebee species from degraded samples using PCR-RFLP approach. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 1, p. 122–126, 2014.
- VIEIRA, F. DE T. et al. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 249, p. 43–48, 2018a.
- VIEIRA, F.T. et al. Occurrence of ticks in dogs in a hospital population in the state of Espírito Santo, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 519–521, 2018b.
- VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3688–3691, 2003.
- WALKER, D.H. Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45, n. Supplement_1, p. S39–S44, 2007.
- WANG, L.-F.; ANDERSON, D.E. Viruses in bats and potential spillover to animals and humans. **Current Opinion in Virology**, v. 34, p. 79–89, 2019.
- WIKEL, S. Ticks and Tick-Borne Infections: Complex Ecology, Agents, and Host Interactions. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 2, p. 60, 2018.
- WIKSWO, M.E. et al. Detection and Identification of Spotted Fever Group Rickettsiae in *Dermacentor* Species from Southern California. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 3, p. 509–516, 2008.
- WITTER, R. et al. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 415–423, 2016.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **World Health**

Organization Technical Report Series, v. 949, p. 1–186, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global Vector Control Response 2017-2030. 2017. 51 p.

YANG, L. et al. Species identification through mitochondrial rRNA genetic analysis. **Scientific Reports**, v. 4, n. 1, p. 4089, 2015.

YANG, L.H.; HAN, B.A. Data-driven predictions and novel hypotheses about zoonotic tick vectors from the genus *Ixodes*. **BMC Ecology**, v. 18, n. 1, p. 7, 2018.

YE, J. et al. Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

ZAHLER, M.; GOTHE, R.; RINDER, H. Genetic evidence against a morphologically suggestive conspecificity of *Dermacentor reticulatus* and *D. marginatus* (Acari: Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 25, n. 12, p. 1413–1419, 1995.

ZERINGÓTA, V. et al. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 81–89, 2017.

ZHENG, W. et al. Molecular Detection and Genetic Characterization of *Toxoplasma gondii* in Farmed Minks (*Neovison vison*) in Northern China by PCR-RFLP. **PLOS ONE**, v. 11, n. 11, p. e0165308, 2016.

ZINSSTAG, J. et al. Climate change and One Health. **FEMS Microbiology Letters**, v. 365, n. 11, p. 1–9, 2018.

ANEXO A

Anexo A – Número de acesso das sequências de 16S rDNA disponíveis no banco de dados molecular GenBank e empregadas para determinação do protocolo PCR-RFLP para identificação de carrapatos ixodídeos reportados no Brasil

<i>Amblyomma aureolatum</i>	MH513256.1	MK712412.1
AF541254.1	MH513257.1	
JN573301.1		<i>Amblyomma dubitatum</i>
JN800433.1	<i>Amblyomma calcaratum</i>	DQ858954.1
KF179343.1	FJ424400.1	DQ858955.1
KX434746.1	GQ891947.1	GU301910.1
	JN573302.1	GU301911.1
<i>Amblyomma auricularium</i>	KF179346.1	GU301912.1
FJ627951.1	KF702342.1	GU301913.1
KC202817.1	KU953951.1	GU301914.1
KM262200.1	KU953952.1	KM519938.1
KR869154.1	KU953953.1	KU894373.1
KR869155.1		KU894374.1
KR869156.1	<i>Amblyomma coelebs</i>	KX009409.1
MG887827.1	FJ424408.1	KX137896.1
MG887829.1	GQ891948.1	KY707774.1
MK059462.1	KM519936.1	MF187459.1
MK059463.1	KM519937.1	
	KU001160.1	<i>Amblyomma fuscum</i>
<i>Amblyomma brasiliense</i>	KX278441.1	JX141385.1
FJ424399.1	MG791918.1	KU894375.1
KM519940.1	MH277335.1	
KM519941.1	MH513258.1	<i>Amblyomma geayi</i>
KX434751.1	MH513259.1	MH513264.1
MG791916.1	MH513260.1	MH513263.1
MH114023.1		KM042851.1
MH167938.1	<i>Amblyomma dissimile</i>	EU805567.1
	KY389389.1	GQ891949.1
<i>Amblyomma cajennense s. s.</i>	KY389390.1	EU805566.1
KM458241.1	KY389391.1	KX999294.1
KM458242.1	KY389392.1	MK706517.1
KM458243.1	MF353128.1	MK605933.1
KT722807.1	MG023153.1	MK605932.1
KX544819.1	MG023154.1	
MG194733.1	MG023155.1	<i>Amblyomma goeldii</i>
MG194734.1	MG023156.1	GQ891950.1
MG194735.1	MG965928.1	MH513265.1
MH513253.1	MH030015.1	MH513266.1
MH513254.1	MH236878.1	
MH513255.1	MH513261.1	
	MH513262.1	

<i>Amblyomma</i> <i>humerale</i>	KP762571.1	<i>Amblyomma</i> <i>ovale</i>
GQ891952.1	KP762572.1	AF541255.1
KX773461.1	KP762573.1	FJ424409.1
KY020987.1	KP835784.1	JN573304.1
MH513267.1	KP835785.1	KF179347.1
MH513268.1	KP835786.1	KR605466.1
MH513269.1	KP835787.1	KR605467.1
	KP835788.1	KR605468.1
<i>Amblyomma</i> <i>incisum</i>	KP835789.1	KR605469.1
FJ424405.1	KP835790.1	KU001155.1
KM519939.1	KX137894.1	KU001156.1
MG791917.1	MH513274.1	KU001157.1
<i>Amblyomma</i> <i>latepunctatum</i>	MH513275.1	KU001158.1
MH513270.1	MK605928.1	KU894376.1
MH513271.1	MK605929.1	KU894377.1
MH513272.1	MK605930.1	KU894378.1
	MK605931.1	KU894379.1
<i>Amblyomma</i> <i>longirostre</i>	MK706527.1	KU894380.1
EU805563.1	MK706528.1	KU894381.1
EU805564.1	MK706529.1	KU894382.1
EU805565.1		KU894383.1
FJ424401.1	<i>Amblyomma</i> <i>naponense</i>	KU894384.1
GQ891951.1	FJ424406.1	KU894385.1
JN573303.1	KC677674.1	KU894386.1
JN800424.1	KY020989.1	KX137897.1
JN800425.1	KY020990.1	KX137898.1
JN800426.1	KY020991.1	KX533941.1
JN800427.1	MH513276.1	MF353102.1
JN800428.1	MH513277.1	MF353103.1
JN800429.1	MH513278.1	MF353104.1
JN800430.1	MK705916.1	MF353105.1
KF179340.1		MH513283.1
KF179341.1	<i>Amblyomma</i> <i>nodosum</i>	MH513284.1
KF179342.1	FJ424402.1	MH513285.1
KF702345.1	FJ424403.1	
KF702346.1	KM262201.1	<i>Amblyomma</i> <i>pacae</i>
KF702347.1	KP686064.1	JX141384.1
KM262205.1	KP835782.1	KU001159.1
KM262206.1	KX999296.1	KY020985.1
KM262207.1		MH513286.1
KP686062.1	<i>Amblyomma</i> <i>oblongoguttatum</i>	MH513287.1
KP686063.1	FJ424407.1	
KP686065.1	MH513279.1	<i>Amblyomma</i> <i>parkeri</i>
KP762568.1	MH513280.1	EU805568.1
KP762569.1	MH513281.1	JN573300.1
KP762570.1	MH513282.1	JN800431.1
	MK704488.1	

<i>Amblyomma</i>	KT820271.1	MK059468.1
<i>parvum</i>	KT820272.1	MK680004.1
EU306136.1	KT820273.1	
EU306137.1	KT820274.1	<i>Amblyomma</i>
EU306138.1	KT820275.1	<i>pseudoconcolor</i>
EU306139.1	KT820276.1	AY628137.1
EU306140.1	KT820277.1	AY628134.1
EU306141.1	KT820278.1	AY628135.1
EU306142.1	KT820279.1	AY628136.1
EU306143.1	KT820280.1	
EU306144.1	KT820281.1	<i>Amblyomma</i>
EU306145.1	KT820282.1	<i>romarioi</i>
EU306146.1	KT820283.1	JN800432.1
EU306147.1	KT820284.1	KU953954.1
EU306148.1	KT820285.1	MK440570.1
EU306149.1	KT820286.1	
EU306150.1	KT820287.1	<i>Amblyomma</i>
EU306151.1	KT820288.1	<i>romitii</i>
EU306152.1	KT820289.1	MH513288.1
EU306153.1	KT820290.1	MK705914.1
EU306154.1	KT820291.1	
EU306155.1	KT820292.1	<i>Amblyomma</i>
EU306156.1	KT820293.1	<i>rotundatum</i>
EU306157.1	KT820294.1	EU805569.1
EU306158.1	KT820295.1	KJ569693.1
EU306159.1	KT820296.1	KP987773.1
EU543570.1	KT820297.1	KU720233.1
EU543571.1	KT820298.1	KU720234.1
EU543572.1	KT820299.1	KU720235.1
KF179345.1	KT820300.1	KU720236.1
KM262202.1	KT820301.1	KU720237.1
KT820252.1	KT820302.1	KU720238.1
KT820253.1	KT820303.1	KU720239.1
KT820254.1	KT820304.1	KU720240.1
KT820255.1	KT820305.1	KU720241.1
KT820256.1	KT820306.1	KU720242.1
KT820257.1	KT820307.1	KU720243.1
KT820258.1	KT820308.1	KU720244.1
KT820259.1	KT820309.1	KU720245.1
KT820260.1	KT820310.1	KU720246.1
KT820261.1	KT820311.1	KU720247.1
KT820262.1	KT820312.1	KU720248.1
KT820263.1	KT820313.1	KX278439.1
KT820264.1	KT820314.1	KY020986.1
KT820265.1	KX618853.1	KY070324.1
KT820266.1	KX618854.1	MG023141.1
KT820267.1	MK059464.1	MG023142.1
KT820268.1	MK059465.1	MG023143.1
KT820269.1	MK059466.1	MG023144.1
KT820270.1	MK059467.1	MG023145.1

MG023146.1	DQ342293.1	KU284961.1
MG023147.1	DQ342294.1	KU284962.1
MG023148.1	DQ342295.1	KU284963.1
MG023149.1	DQ342296.1	KU284964.1
MG023150.1	DQ342297.1	KU284965.1
MG023151.1	DQ342298.1	KU284966.1
MG023152.1	DQ342299.1	KU284967.1
MH236877.1	DQ342300.1	KU284968.1
MH513289.1	DQ342301.1	KU284969.1
MH513290.1	DQ342302.1	KU284970.1
	DQ342303.1	KU284971.1
	DQ342304.1	KU284972.1
<i>Amblyomma</i>	FJ965339.1	KU284973.1
<i>sculpturatum</i>	KF179344.1	KU284974.1
MH513291.1	KU285002.1	KU284975.1
MH513292.1	KU285003.1	KU284976.1
MH513293.1	KU285004.1	KU284977.1
	KU285005.1	KU284978.1
<i>Amblyomma</i>	KU285006.1	KU284979.1
<i>sculptum</i>	KU285007.1	KU284980.1
KM519934.1	KU285008.1	KU284981.1
KP686061.1	KU285009.1	KU284982.1
KT238826.1	KU285010.1	KU284983.1
KT722808.1	KX434747.1	KU284984.1
KT820361.1	MK050558.1	KU284985.1
KX622791.1		KU284986.1
KY172626.1		KU284987.1
KY652670.1	<i>Amblyomma</i>	KU284988.1
MF353127.1	<i>triste</i>	KU284989.1
MF422022.1	AY498563.1	KU284990.1
MG460313.1	JN180848.1	KU284991.1
MG460314.1	KP739869.1	KU284992.1
MG460315.1	KU284942.1	KU284993.1
MG460316.1	KU284943.1	KU284994.1
MG523424.1	KU284944.1	KU284995.1
MG523425.1	KU284945.1	KU284996.1
MH114024.1	KU284946.1	KU284997.1
MK059459.1	KU284947.1	KU284998.1
MK059460.1	KU284948.1	KU284999.1
NC_032369.1	KU284949.1	KU285000.1
	KU284950.1	KU285001.1
	KU284951.1	MF353129.1
<i>Amblyomma</i>	KU284952.1	MK059469.1
<i>tigrinum</i>	KU284953.1	MK059470.1
AY498562.1	KU284954.1	MK059471.1
AY836004.1	KU284955.1	MK059472.1
AY836005.1	KU284956.1	MK059473.1
DQ342288.1	KU284957.1	
DQ342289.1	KU284958.1	
DQ342290.1	KU284959.1	
DQ342291.1	KU284960.1	
DQ342292.1		

Amblyomma
varium
JQ771812.1
JX141386.1
KF702341.1
KM262203.1
KM262204.1
KX544818.1
KY020988.1
MH513294.1
MH513295.1
MH513296.1
MH513297.1
MH513298.1
MH513299.1

Amblyomma
yucumense
KJ914670.1
KX434748.1
KX434749.1
KX434750.1
MH282856.1

Dermacentor
nitens
KC503258.1
KY020994.1
MF353106.1
MF353107.1
MF353108.1
MF353109.1
MF353110.1
MF353111.1
MF353112.1
MF353113.1
MF353114.1
MF353115.1
MF353116.1
MH513300.1
MH513301.1

Haemaphysalis
juxtakochi
AY762323.1
AY762324.1
KX434752.1
MH513302.1
MH513303.1

Haemaphysalis
leporispalustris
JN800434.1
KU096986.1
L34309.1
MH114025.1

Ixodes
amarali
JQ598168.1

Ixodes
aragaoi
KJ650032.1
KU894392.1
KU894393.1
KU894394.1
KU894395.1
KU894396.1
KU894397.1
KU894398.1
KU894399.1
KU894400.1
KU894401.1
KU894402.1
KU894403.1
KU894404.1
KU894405.1
KU894406.1
KU894407.1
KX231831.1

Ixodes
auritulus
AF113928.1
AF549845.1
FJ392273.1
FJ392274.1
MH183252.1

Ixodes
fuscipes
AF113928.1
AF549845.1
FJ392273.1
FJ392274.1
MH183252.1

Ixodes
longiscutatus
DQ061294.1
KX231833.1

Ixodes
loricatus
AF549840.1
AY510268.1
AY510269.1
JQ598169.1
KU894390.1
KU894391.1
KX137895.1
KX434753.1
KX434754.1
U95892.1

Ixodes
luciae
AF549851.1
MH513304.1
MH513305.1
U95894.1

Ixodes
schulzei
KU894388.1
KU894389.1

Rhipicephalus
sanguineus
GU553074.1
GU553075.1
JX997391.1
JX997392.1
KR653222.1
KR653223.1
KT382448.1
KX533942.1
MF351602.1
MF351603.1
MF477856.1
MG793426.1
MG793427.1
MG793428.1
MG793429.1
MG793430.1
MG793431.1
MG793432.1

MG793433.1
MG793434.1
MG793435.1

Rhipicephalus
microplus

EU918178.1
KC503261.1
MF422023.1
NC_023335.1

ANEXO B

Anexo B – Número de acesso das sequências de *htrA*, *gltA*, *ompA* e *ompB* disponíveis no banco de dados molecular GenBank e empregadas para determinação do protocolo PCR-RFLP para identificação de *Rickettsia* spp. associadas a carrapatos e previamente reportados no Brasil ou países fronteiriços

<i>gltA</i>		
<i>Rickettsia amblyommatis</i>	<i>Rickettsia asemonensis</i>	
AY375163.1	JN315968.1	KY172868.1
DQ517290.1	JN315974.1	KY628371.1
GQ891954.1	KJ569090.1	MF154866.1
HM582435.1	KX196267.1	MF154867.1
HQ231759.1	KX533943.1	MF154868.1
JF694089.1	KX544807.1	MF154869.1
JX867425.1	KX544808.1	MF154870.1
KF179351.1	KX544810.1	MF154871.1
KF702331.1	KX544811.1	MF154872.1
KJ534310.1	KY445723.1	MF154873.1
KM262197.1	KY445724.1	MF154874.1
KM262198.1	KY445725.1	MF154875.1
KP686066.1	KY445726.1	MF154876.1
KU001170.1	KY650697.1	MF154877.1
KX099898.1	MF281711.1	MF154878.1
KX434741.1		MF154879.1
KY053884.1	<i>Rickettsia bellii</i>	MG550957.1
KY273595.1	AY362703.1	MH046195.1
KY628365.1	AY375161.1	MH392533.1
MG887825.1	DQ146481.1	
	DQ517288.1	‘<i>Candidatus Rickettsia colombianensi</i>
	DQ865204.1	JF905456.1
‘<i>Candidatus Rickettsia andeanae</i>	EU567181.1	KF691751.1
GU169050.1	FJ789813.1	KP835791.1
GU169051.1	JQ664297.1	MF034493.1
JN180849.1	JQ771810.1	MG563768.1
KF030931.1	JQ906786.1	MG970682.1
KF179353.1	KJ534309.1	
KM262199.1	KM262196.1	<i>Rickettsia felis</i>
KT153033.1	KT153036.1	HM582437.1
KT722802.1	KT153043.1	JF694092.1
KT878724.1	KU557517.1	JN375498.1
KX434742.1	KX020408.1	JN375500.1
KX434743.1	KX020409.1	KC158583.1
KX576677.1	KX077192.1	KF015600.1
KX772757.1	KX099897.1	KT153034.1
KY628369.1	KX137900.1	KT153038.1
MG887826.1	KX278442.1	KT153039.1
	KX434740.1	KT153040.1
	KY053883.1	KX446940.1
		KX446941.1

KX446942.1	MF737536.1	JN375506.1
KX446943.1	MF737537.1	JN375507.1
KY172869.1	MF737538.1	JN375508.1
KY172870.1	MF737539.1	JN375509.1
KY172871.1	MF737540.1	JN375510.1
KY172872.1	MF737541.1	JN375511.1
KY172873.1	MF737542.1	JN375512.1
KY172874.1	MF737543.1	JN375513.1
KY172875.1	MF737544.1	JN375514.1
KY172876.1	MF737545.1	JN375515.1
KY172877.1	MF737546.1	JN375516.1
KY172878.1	MF737547.1	JN375517.1
	MF737548.1	JN375518.1
	MF737549.1	JN375519.1
<i>Rickettsia</i>	MF737550.1	JN375520.1
<i>massiliae</i>	MF737551.1	JN375521.1
KF826286.1	MF737552.1	JN375522.1
KT032119.1	MF737553.1	JN375523.1
KU498299.1	MF737554.1	JN384012.1
	MF737555.1	JN384013.1
	MF737556.1	JN393854.1
<i>Rickettsia</i>	MF536974.1	JN393855.1
<i>monteiroi</i>		JN393856.1
FJ269035.1		JN393857.1
	<i>Rickettsia</i>	JN393858.1
	<i>rhipicephali</i>	JN393859.1
<i>Rickettsia</i>	DQ865206.1	JN393860.1
<i>parkeri</i>	KX018048.1	JN393861.1
EF102236.1	KX099900.1	JN393862.1
JN126320.1	KX434744.1	JN393886.1
JQ906783.1	KX434745.1	JN393887.1
KJ174527.1	U59721.1	JN393888.1
KJ657733.1		JN393889.1
KJ657735.1		JN393890.1
KM245157.1		JN393891.1
KU744411.1		JN393892.1
KX881763.1		JN393893.1
KY113109.1	<i>Rickettsia</i>	JN400363.1
KY498223.1	<i>rickettsii</i>	JN400364.1
KY581579.1	DQ115890.1	JN400365.1
KY609326.1	JF690667.1	JN400366.1
MF737524.1	JN252694.1	JN400367.1
MF737525.1	JN252695.1	JN400368.1
MF737526.1	JN252696.1	JN400369.1
MF737527.1	JN252697.1	JN400370.1
MF737528.1	JN252698.1	JN400371.1
MF737529.1	JN252699.1	JN400372.1
MF737530.1	JN375496.1	JN400373.1
MF737531.1	JN375497.1	JN400374.1
MF737532.1	JN375499.1	JN400375.1
MF737533.1	JN375501.1	
MF737534.1	JN375502.1	
MF737535.1	JN375503.1	
	JN375504.1	
	JN375505.1	

JN400376.1
 JN400377.1
 JN400378.1
 KC469610.1
 KC845927.1
 KJ184537.1
 KJ184539.1
 KJ433987.1
 KX619438.1
 MF062704.1
 MF095735.1
 MF988097.1
 KF742602.1

**‘Candidatus Rickettsia
 wissemanii’**
 LT558852.2
 MH614266.1

**Rickettsia sp.
 strain OF**
 MK294160

**Rickettsia sp. strain
 Pampulha**
 JN190455.1

htrA

***Rickettsia
 amblyommatis***
 AY375162.1
 DQ517291.1
 EU828788.1
 KY628366.1
 KY273596.1
 U11013.1

**‘Candidatus Rickettsia
 andeanae’**
 GU395295.1
 KY402186.1
 KY402187.1
 KY402188.1
 KY402189.1

KY402190.1
 KY402191.1
 KY402192.1

***Rickettsia
 asebonensis***
 KX196268.1
 KY445727.1
 KY445728.1
 KY445729.1
 KY445730.1
 KY445731.1
 KY445732.1
 KY445733.1
 KY445734.1
 KY445735.1
 KY445736.1

***Rickettsia
 bellii***
 AY362702.1
 DQ115891.1
 DQ517289.1
 DQ865205.1
 EU826508.1
 KJ534308.1

**‘Candidatus Rickettsia
 colombianensi**
 RAQN01000001.1

***Rickettsia
 felis***
 AF195118.1
 DQ102709.1
 GU447234.1
 KF241853.1
 KM365086.1
 KR709306.1
 KX446944.1
 KX446945.1
 KX446946.1
 KX446947.1
 KY273597.1
 LANQ01000001.1
 M82878.1
 MF491767.1
 MF491771.1
 MF491774.1
 MF491775.1

MF491778.1
 MG818716.1
 MG893577.1
 MH325385.1
 MH549233.1

***Rickettsia
 massiliae***
 KT032120.1

Rickettsia monteiroi
 FJ269036.1

***Rickettsia
 parkeri***
 EF102237.1
 KX196266.1
 KX018052.1

***Rickettsia
 rhipicephali***
 AY472039.1
 DQ865207.1

***Rickettsia
 rickettsii***
 AY281069.1
 DQ176856.1
 GU723476.1
 GU723477.1
 KC845924.1

**‘Candidatus Rickettsia
 wissemanii’**
 MH614268.1

***Rickettsia sp.
 strain OF***
 MK294161

***Rickettsia sp. strain
 Pampulha***
 JN190456.1

ompA

Rickettsia

Amblyommatis

DQ517292.1

GQ891955.1

HM582436.1

HQ231758.1

JF694090.1

JN126316.1

JN800436.1

JX867426.1

KF179350.1

KF702333.1

KJ534312.1

KJ557133.1

KM245156.1

KM262194.1

KP686059.1

KP686067.1

KP739867.1

KT153048.1

KT722803.1

KT722804.1

KU001173.1

KX099899.1

KX137901.1

KX434739.1

KY053885.1

KY273598.1

KY628367.1

MF188911.1

MF188912.1

MF188913.1

MF188914.1

MG887824.1

MG887828.1

'Candidatus Rickettsia andeanae'

JN180850.1

KF030932.1

KF179352.1

KT153046.1

KT878725.1

KX158266.1

KX158267.1

KX158268.1

KX158269.1

KX158270.1

KX434737.1

KX434738.1

KX576678.1

KX772758.1

KY273599.1

KY628370.1

MF428448.1

MF428449.1

MF428450.1

'Candidatus Rickettsia colombianensi'

JF905458.1

KF691749.1

MF034497.1

MF774054.1

MG563769.1

MG970683.1

MH236875.1

Rickettsia massiliae

JX101680.1

KC525893.1

KT032121.1

KU498298.1

KX506780.1

Rickettsia montei

MK166031

Rickettsia parkeri

EF102238.1

JN126318.1

JN126321.1

JQ906784.1

KJ174528.1

KJ657734.1

KJ657736.1

KM245158.1

KM259905.1

KU744412.1

KX196265.1

KY113110.1

MF737606.1

MF737607.1

MF737608.1

MF737609.1

MF737610.1

MF737611.1

MF737612.1

MF737613.1

MF737614.1

MF737615.1

MF737616.1

MF737617.1

MF737618.1

MF737619.1

MF737620.1

MF737621.1

MF737622.1

MF737623.1

MF737624.1

MF737625.1

MF737626.1

MF737627.1

MF737628.1

MF737629.1

MF737630.1

MF737631.1

MF737632.1

MF737633.1

MF737634.1

MF737635.1

MF737636.1

MF737637.1

MH351082.1

MH392532.1

MH392534.1

MH396481.1

MF536975.1

Rickettsia rhipicephali

DQ865208.1

KX018049.1

KX099901.1

KX434735.1

KX434736.1	EU544300.1	<i>Rickettsia</i>
<i>Rickettsia</i>	EU544301.1	<i>massiliae</i>
<i>rickettsii</i>	EU728827.1	KT032122.1
DQ002505.1	FJ455415.1	<i>Rickettsia</i>
FJ356230.2	JF694091.1	<i>parkeri</i>
JF690668.1	JN126317.1	AF123717.1
JF690668.1	JX867427.1	EF102239.1
JN384014.1	KJ534313.1	FJ986617.1
JN384015.1	KX151487.1	JN126319.1
JN393863.1	KX363835.1	JN126322.1
JN393864.1	KX363836.1	JQ906785.1
JN393865.1	KX363837.1	KF782321.1
JN393866.1	KX363838.1	KJ158744.1
JN393867.1	KX363839.1	KM245159.1
JN393868.1	KX363840.1	KX018050.1
JN393869.1	KX363846.1	KY113111.1
JN393870.1	KX363847.1	KY124259.1
JN393871.1	KY628368.1	MG578511.1
KC763629.1	‘Candidatus Rickettsia	MH247926.1
KC845925.1	andeanae’	
KF742603.1	GU395297.1	<i>Rickettsia</i>
KJ184538.1	KF030933.1	<i>rhipicephali</i>
KJ433988.1	KY402194.1	DQ865209.1
KJ994338.1	KY402195.1	KX018051.1
KU321853.1	KY402196.1	<i>Rickettsia</i>
KU697298.1	<i>Rickettsia</i>	<i>rickettsii</i>
KX363464.1	<i>asebonensis</i>	GU395293.1
KX619439.1	JN315972.2	GU723475.1
MF988095.1	JN315972.2	JF690669.1
MF988096.1	KX544817.1	KC845926.1
‘Candidatus Rickettsia	KY650699.1	KF056800.1
wissemanii’	<i>Rickettsia</i>	KF742604.1
LT558853.1	<i>felis</i>	KJ735646.1
<i>Rickettsia</i> sp. strain	AY394854.1	KT881098.1
Pampulha	GQ329875.1	KU587807.1
JN190457.1	KF056801.1	MG206088.1
	KF241856.1	‘Candidatus Rickettsia
	KF241857.1	wissemanii’
	KX090272.1	LT558854.2
	KX090273.1	<i>Rickettsia</i> sp.
	KX090274.1	strain OF
	KX090275.1	MK294162
	KX090276.1	
<i>ompB</i>	KX090277.1	
<i>Rickettsia</i>	KX090278.1	
<i>amblyommatis</i>	KX090279.1	
AY375164.1		
EU544299.1		

ANEXO C

Anexo C – Detalhamento de carrapatos avaliados no capítulo III. Informações relacionadas ao ano e local de coleta, estágio de desenvolvimento do exemplar, hospedeiro vertebrado (aves) e *Rickettsia* SFG detectado

Código	Amostra	Local	Hospedeiro	Carrapato	Rickettsia	Estágio	Ano
1	312	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Ninfa	2012
2	314.1	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
3	353.1	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Ninfa	2012
4	3113.18	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
5	3113.19	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
6	3113.37	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
7	3113.44	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
8	3113.49	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
9	3113.50	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
10	3113.51	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
11	3113.57	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
12	3122.1	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
13	3122.2	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
14	3122.3	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
15	3122.4	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
16	3122.5	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
17	3122.6	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
18	3122.7	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
19	3122.8	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
20	3122.9	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
21	3122.10	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
22	3122.11	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
23	3122.13	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
24	3122.14	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
25	3122.15	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
26	3122.16	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
27	3122.17	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Ninfa	2012
28	3122.18	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
29	3122.19	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
30	3122.21	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
31	3122.22	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
32	3128.3	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
33	3128.4	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
34	3128.14	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
35	3128.15	RJ (T)	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
36	3130.1	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
37	3130.2	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
38	3130.3	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
39	3130.4	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
40	3130.8	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
41	3130.15	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
42	3136.1	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
43	3136.2	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
44	3136.3	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
45	3136.13	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
46	3142.1	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
47	3142.2	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
48	3142.3	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
49	3144	RJ (T)	<i>Sittasomus griseicapillus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Ninfa	2012
50	3160.1	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012

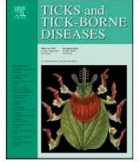
51	3160.2	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
52	3160.3	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
53	3163	RJ (T)	<i>Dendrocinda turdina</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2012
54	L 5	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
55	L 6	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
56	L 7	RJ (I)	<i>Rupornis magnirostris</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
57	L 11	RJ (I)	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
58	L 12	RJ (I)	<i>Conopophaga lineata</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
59	L 15	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
60	L 21	RJ (I)	<i>Conopophaga lineata</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
61	L 26	RJ (I)	<i>Turdus leucomelas</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
62	L 27	RJ (I)	<i>Machetornis rixosa</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
63	L 28	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
64	L 29	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
65	L 30	RJ (I)	<i>Myiarchus ferox</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
66	L 36	RJ (I)	<i>Furnarius rufus</i>	<i>A. calcaratum</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
67	L 37	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. calcaratum</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
68	L 39	RJ (I)	<i>Dendrocincla fuliginosa</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
69	L 40	RJ (I)	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
70	L 41	RJ (I)	<i>Chiroxiphia caudata</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
71	L 42	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
72	L 44	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
73	L 49	RJ (I)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
74	L 56	RJ (S)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
75	L 72	RJ (S)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
76	L 85	RJ (S)	<i>Ramphocelus bresilius</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
77	L 86	RJ (S)	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
78	L 88	RJ (S)	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
79	L 89	RJ (S)	<i>Xiphorhynchus guttatus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
80	V54-AL	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2014
81	V58-AL	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2014
82	V71-AL	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2014
83	V97-AL	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2014
84	7A-AL	MG	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
85	11A-AL	MG	<i>Basileuterus culicivorus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
86	22A-AL	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
87	10B-AL	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
88	20B-AL	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
89	V7C-AL	MG	<i>Coereba flaveola</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
90	V5D-AL	MG	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
91	V7D-AL	MG	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
92	19D-AL	MG	<i>Turdus rufiventris</i>	<i>A. longirostre</i>	<i>R. amblyommatis</i>	Larva	2015
93	9 Naz	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
94	12 Naz	MG	<i>Pyriglena leucoptera</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
95	13 Naz	MG	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
96	20 Naz	MG	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
97	25 Naz	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
98	31 Naz	MG	<i>Turdus albicollis</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
99	32 Naz	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
100	33 Naz	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
101	34 Naz	MG	<i>Attila rufus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
102	35 Naz	MG	<i>Attila rufus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
103	36 Naz	MG	<i>Sittasomus griseicapillus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
104	38 Naz	MG	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
105	43 Naz	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
106	44 Naz	MG	<i>Pyriglena leucoptera</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
107	45 Naz	MG	<i>Platyrinchus mystaceus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014

108	46 Naz	MG	<i>Platyrrhinus mystaceus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
109	47 Naz	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
110	48 Naz	MG	<i>Turdus albicollis</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
111	49 Naz	MG	<i>Turdus albicollis</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
112	50 Naz	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
113	73 Naz	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
114	79 Naz	MG	<i>Attila rufus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
115	80 Naz	MG	<i>Attila rufus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
116	81 Naz	MG	<i>Attila rufus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
117	82 Naz	MG	<i>Sittasomus griseicapillus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
118	91 Naz	MG	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
119	92 Naz	MG	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
120	93 Naz	MG	<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
121	94 Naz	MG	<i>Cyanoloxia brissonii</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2014
122	95 Naz	MG	<i>Turdus albicollis</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
123	98 Naz	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
124	104 Naz	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
125	109 Naz	MG	<i>Turdus albicollis</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
126	110 Naz	MG	<i>Turdus albicollis</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
127	112 Naz	MG	<i>Turdus albicollis</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014
128	8A- Naz	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
129	13A	MG	<i>Leptopogon amaurocephalus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
130	1C-NAZ	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
131	4C-NAZ	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
132	2C-NAZ	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
133	3C-NAZ	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
134	1B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
135	2B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
136	3B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
137	4B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
138	5B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
139	6B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
140	7B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
141	9B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
142	11B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
143	12B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
144	13B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
145	14B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
146	15B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
147	17B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
148	18B-NAZ	MG	<i>Tachyphonus coronatus</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>R. rhipicephali</i>	Larva	2015
149	21B-NAZ	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. romarioi</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2015
150	51-PAR	MG	<i>Lanio melanops</i>	<i>A. parkeri</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	Larva	2014



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ttbdis

Original article

Two for the price of one: Co-infection with *Rickettsia bellii* and spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) ticks recovered from wild birds in Brazil

Daniel Paiva Barros de Abreu^{a,*}, Maristela Peckle Peixoto^a, Hermes Ribeiro Luz^b,
Viviane Zeringóta^c, Ísis Daniele Alves Costa Santolin^a, Kátia Maria Famadas^a,
João Luiz Horacio Faccini^a, Douglas McIntosh^a

^a Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Rodovia BR 465, Km 07, s/n, Zona Rural, Seropédica, RJ, 23890-000, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Maranhão (UFMA), Av. dos Portugueses, 1966, Vila Bacanga, São Luís, MA, 65080-805, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Escola de Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Goiás (UFG), Av. Esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia, GO, 74690-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Rickettsiae
Ixodidae
PCR-RFLP
Microbiome

ABSTRACT

The bacterium *Rickettsia bellii* has been detected in 25 species of ticks in the American continents, but its pathogenic potential is considered as undetermined. A possible role for this species in the phenomenon of transovarial exclusion of pathogenic members of the spotted fever group (SFG) of *Rickettsia* has been suggested and co-infections with pathogenic species have been reported infrequently in both North and South America. Traditional methods for the molecular detection of rickettsial agents in ticks focus largely on the identification of sequences found in SFG *Rickettsia*, an approach that may overlook the presence of co-infections with *R. bellii*. Two novel, species-specific polymerase chain reaction (PCR) assays, targeting the genes encoding the surface cell antigen (Sca), autotransporter proteins sca9 and sca14, were developed and validated for the detection of *R. bellii* using 150 *Amblyomma* ticks collected from wild birds in Brazil. Co-infection of *R. bellii* infected ticks was evaluated using a novel PCR assay targeting the *ompA* sequence characteristic of SFG *Rickettsia*. Preliminary species-level identification was achieved by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis and subsequently confirmed by sequencing of amplicons. Nine out of seventy-three *Amblyomma longirostre* and one of two *Amblyomma calcaratum* ticks were shown to be co-infected with *R. bellii* and *Rickettsia amblyommatis*, while two out of sixty-seven *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré ticks were recorded as co-infected with *R. bellii* and the *Rickettsia parkeri*-like bacterium, strain ApPR. Interestingly, our data represent the first records of *R. bellii* in association with *A. calcaratum* and *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré. The novel PCR-RFLP systems reported herein, provide an alternative, rapid and cost-efficient (relative to strategies based on sequencing or real-time PCR), approach to evaluate rickettsial co-infection of ticks, a potentially significant phenomenon that has most likely been underestimated to date.

1. Introduction

The genus *Rickettsia* comprises a diverse group of Gram-negative bacteria characterized by an obligate intracellular lifestyle and the notorious role of some species as arthropod-borne pathogens of man and animals (Diop et al., 2018; Parola et al., 2013). The true extent of human infections with *Rickettsia*, is believed to be underestimated because of factors including incorrect diagnosis owing to similarities in

symptomology with other febrile illnesses, lack of knowledge concerning *Rickettsia* among medical professionals and the absence of convenient and accessible diagnostic tests (Faccini-Martínez et al., 2014; Oliveira et al., 2016).

Rickettsia bellii, a member of the ancestral group of Rickettsiae, was reported for the first time in Brazil in 2004 infecting five species of *Amblyomma* ticks (Labruna et al., 2004). It has since been recorded in an additional seven species of *Amblyomma* and in *Ixodes loricatus*, and

* Corresponding author.

E-mail address: abreudpb@ufrj.br (D.P.B.d. Abreu).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101266>

Received 30 January 2019; Received in revised form 17 June 2019; Accepted 28 July 2019
1877-959X/ © 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Haemaphysalis juxtakochi ticks (Costa et al., 2017; McIntosh et al., 2015; Parola et al., 2013). Uncertainty, in relation to the pathogenic potential of *R. bellii*, emerged based on the observation that subcutaneous inoculation induced the development of eschars in rabbits and guinea pigs (Ogata et al., 2006), a symptom considered characteristic for a number of rickettsioses (Faccini-Martínez et al., 2014). In addition, serological data from Brazilian studies indicated the capacity to cause natural infections in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Pacheco et al., 2007), dogs (Spolidorio et al., 2013) and horses (Vieira et al., 2018), albeit with no evidence to support the use of such animals as amplifier hosts; a strategy employed by pathogenic SFG *Rickettsia*, including *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia conorii* (Parola et al., 2013). Data acquired from observation of naturally infected colonies of *Amblyomma dubitatum* (Sakai et al., 2014) and *I. loricatus* (Horta et al., 2006), demonstrated highly efficient transstadial survival and transovarian transmission, suggesting that *R. bellii* is most likely maintained in nature via those mechanisms.

The term rickettsial exclusion was proposed by Burgdorfer et al. (1981), based on epidemiological observations and experimental evaluation of transovarian transmission, to describe the phenomenon whereby primary infection by one rickettsial agent (*Rickettsia peacockii*) served to impede ovarian infection by a second species (*R. rickettsii*) in *Dermacentor andersoni* ticks in the USA (Burgdorfer et al., 1981). Additional examples of this exclusion effect were subsequently reported for *Rickettsia rhipicephali* by *Rickettsia montanensis* in *Dermacentor variabilis* (Macaluso et al., 2002), and were alluded to for *R. rickettsii* by *R. bellii* in *A. dubitatum* (Sakai et al., 2014). This phenomenon has also been suggested as the most plausible explanation for the apparent exclusion of *Rickettsia parkeri* sensu stricto (s. s.) in populations of adult *A. maculatum* ticks in some states of the USA with a high prevalence of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” (Lee et al., 2017; Paddock et al., 2015). In contrast, the absence of such exclusion has been demonstrated in a recently published study by Levin et al. (2018).

Rickettsia bellii has been reported, albeit sporadically, in natural co-infections with other rickettsial agents; *R. rhipicephali* in *D. variabilis* collected in the state of Arkansas, USA (Wikswow et al., 2008), *R. montanensis* and *R. rickettsii* in *D. variabilis* collected in the state of Ohio, USA (Carmichael and Fuerst, 2010), and with *R. parkeri* in *Amblyomma ovale* in Brazil (Szabó et al., 2013). In all three cases, the initial evidence for co-infections was encountered fortuitously based on the observation of dual peaks at multiple base positions throughout sequencing electropherograms, obtained from PCR amplicons of genus-specific gene targets i.e. citrate synthase (Szabó et al., 2013; Wikswow et al., 2008), or the 17-kDa antigen (Carmichael and Fuerst, 2010). Confirmation of the presence of *R. bellii* was subsequently achieved by PCR using primers specific for the citrate synthase gene (*gltA*) of *R. bellii* (Carmichael and Fuerst, 2010; Szabó et al., 2013). In an attempt to facilitate the differential detection of *R. bellii* in ticks, Hecht et al. (2016), reported the development and validation of a real-time PCR assay for the specific detection of *R. bellii* using, once again, the *gltA* gene sequence as the target.

The current work reports the development and evaluation of a novel, rapid and cost-effective approach to investigate the phenomenon of co-infection of ticks with *R. bellii* and SFG rickettsial agents. The application of this strategy to ticks collected from wild birds, captured in different regions of Atlantic rainforest in Brazil, demonstrated that co-infections with *R. bellii* can be conveniently and differentially detected during the first round of molecular screening, reducing the requirement for more expensive techniques including sequencing or real-time PCR.

2. Material and methods

2.1. Development of species-specific PCR assays for *R. bellii*

The targets chosen for the development of *R. bellii* specific primers were four genes (*sca3*, *sca8*, *sca9* and *sca14*) encoding surface cell antigen (Sca), autotransporter proteins (Sears et al., 2012). Sequences

Table 1
Primers used in this study.

Target	Primer	Primer Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>sca3</i>	Forward	CCA CTA TTA ATT TTA ACG GGG CA	654
	Reverse	TAC CCG TAC CAC CGC TAA AC	
<i>sca8</i>	Forward	ACG ATT GAA AGA GCA GAC GG	723
	Reverse	ACC ACC GGA AGT ATG ACC TC	
<i>sca9</i>	Forward	CAG CAG CCT TTC ACG TTT CT	727
	Reverse	ACT CCA ATG TCA GCA ATA CTA GG	
<i>sca14</i>	Forward	CCA CAG AAT TTG CAC CAC GT	724
	Reverse	TTT GTT TGA GCA CTC GGT ATT TT	
<i>htrA</i>	Forward	GGA ACC AGG CCG TAT GAA TAA	407
	Reverse	ACT TGC CAT AGT CCG TCA GG	
<i>ompA</i>	Forward	GCT TTA TTC ACC TCA AC	357
	Reverse	GCC GGC AGT AAT AGT AAC AG	

of the full-length genes were obtained from the GenBank (Accession numbers; AY973495, AY973496, AY973497 and AY970512) and primers were designed (Table 1), to generate amplicons of approximately 700 base pairs (bp), using the program Primer3 (Untergasser et al., 2012). Primer specificity was examined *in silico*, via primerBLAST, with comparison to sequences in the nucleotide collection (nt) database. This was deemed necessary since the template DNAs to be examined were obtained from complex environmental samples derived from tick homogenates, many of which contained avian blood and diverse microbiotas. The composition of the PCR master-mixes and the cycling conditions were optimized using three concentrations of MgCl₂ (2.0 mM, 2.5 mM and 3.0 mM) and a temperature gradient ranging from 50 °C to 60 °C, using DNA from *R. bellii* (strain Mogi; kindly provided by Dr. Marcelo B. Labruna, Department of Preventative Veterinary and Animal Health, Faculty of Veterinary Medicine, University of São Paulo, Brazil), as the template. The *R. bellii* control DNA was derived from infected Vero cell cultures and as such, it could not be accurately quantified without the use of real-time PCR methods. Thus, to estimate the quantity of rickettsial DNA in the sample we used a limiting dilution approach, whereby dilutions were prepared from 10⁻¹ to 10⁻⁶ in AE buffer (10 mM Tris-Cl, 0.5 mM EDTA; pH 9.0). Determination of the last dilution containing detectable rickettsial DNA was assessed by amplifying a 407-bp fragment of the *htrA* gene, using primers 17KDF (5'-GGA ACC AGG CCG TAT GAA TAA-3') and 17KDR (5'-ACT TGC CAT AGT CCG TCA GG-3'), as reported by Santolin et al. (2013), employing the master-mix and cycling conditions related by Zeringóta et al. (2017). Thereafter, the sensitivity of the four sets of *R. bellii*-specific primers was compared using the same dilutions of the *R. bellii* DNA as described above, in combination with the optimized reaction conditions (annealing temperature and concentration of MgCl₂), of each assay. The primer sets designed to amplify *sca9* and *sca14*, showed sensitivities equivalent to that of the *htrA* assay, while the other two primers sets were 10-fold less sensitive and as such were not examined further. The specificity of the *sca9* and *sca14* assays was assessed using two types of negative controls. Firstly, DNA extracted from a total of 52 *Amblyomma* ticks collected from wild birds and characterized as PCR negative for rickettsial DNA as reported previously (Luz et al., 2017; Zeringóta et al., 2017). The samples used were as follows; *Amblyomma aureolatum* (n = 2), *A. brasiliense* (n = 6), *A. calcaratum* (n = 6), *A. longirostre* (n = 10), *A. naponense* (n = 2), *A. nodosum* (n = 3), *A. ovale* (n = 2), *A. parkeri* (n = 6), *A. sculptum* (n = 4), *A. varium* (n = 1), and *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré (n = 10). Secondly, DNA extracted from Vero cell cultures infected with the following species of *Rickettsia*: *R. amblyommatis* (strain AC37), *R. felis* (strain Pedreira), *R. monteiroi* (strain 7 P), *R. parkeri* (strain Atlantic rain forest-A010), *R. rhipicephali* (strain HJ5) and *R. rickettsii* (Taiacu) (all provided by Dr. Marcelo B. Labruna). Positive controls, included to confirm the ability of the assays to detect *R. bellii* DNA in tick homogenates, comprised DNA extracted from seven *Amblyomma rotundatum* ticks (five females and two nymphs), collected from toads

(*Rhinella marina*) in the Brazilian Amazon and previously characterized as infected with *R. bellii* (Luz et al., 2018). The PCR mixtures (12.5 μ L) contained 1.25 μ L of Platinum Taq DNA polymerase buffer (Thermo Fisher Scientific, Brazil), 2.5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs (Sinapse Biotecnologia, Brazil), 10 pmoles of each primer, 0.5 units of Platinum Taq DNA polymerase and 2 μ L of DNA template. The cycling conditions employed were an initial denaturation at 95 °C for 5 min; followed by 45 cycles of denaturation at 95 °C for 20 s, annealing at 52 °C for 20 s, extension at 72 °C for 25 s, with a final extension step at 72 °C for 5 min. Five microliters of PCR products were analysed by gel electrophoresis (1.5% agarose; KASVI, Spain), with confirmation of amplicon sizes achieved via comparison to a DNA molecular weight marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder; Thermo Scientific). The remainder of each reaction was stored at -20 °C for additional molecular analyses as described below.

2.2. DNA extracted from bird ticks characterized as infected with SFG *Rickettsia* and examined for the presence of rickettsial co-infection

Details of the DNA samples (n = 150), examined in this study for evidence of co-infection are provided in Supplementary data Table S1. In common with the *Rickettsia*-negative ticks detailed above, the selected material was obtained from within the arthropod nucleic acid sample collection, maintained at the Molecular Biology Laboratory, Department of Animal Parasitology, Federal Rural University of Rio de Janeiro (UFRRJ). Details of tick collection and their identification to the species level were as reported in three previous studies investigating bird-tick-*Rickettsia* interactions in four distinct regions of Brazilian Atlantic rainforest; three in the state of Rio de Janeiro (Luz et al., 2017; Santolin et al., 2013) and the fourth in the state of Minas Gerais (Zeringóta et al., 2017). The majority of the ticks (114/150), had been characterized as infected with SFG rickettsial agents in the aforementioned studies. The remaining 36 ticks, collected as a component of the study of Santolin et al. (2013), were previously identified as *A. longirostre* by sequencing of a 460-bp fragment of the mitochondrial sequence encoding 16S rDNA, using the methods reported by Mangold et al. (1998), but they had not been examined for the presence of *Rickettsia* DNA. Each of the 36 ticks were found to be infected with *R. amblyommatis*, as determined using the *ompB*/PCR-RFLP method developed by Santolin et al. (2013), and confirmed via PCR and sequencing of *ompA* amplicons generated with the primers Rr190.70p and Rr190.602n applying the cycling conditions reported in Zeringóta et al. (2017).

The choice of the samples examined (n = 150), specifically *Amblyomma calcaratum* (n = 2), *Amblyomma longirostre* (n = 73), *Amblyomma parkeri* (n = 8) and *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré (n = 67), characterized as infected with *R. amblyommatis* (n = 75), *R. parkeri* (n = 45) and *R. rhipicephali* (n = 30), was essentially random, albeit guided by the relative abundance of each tick species within the nucleic acid sample collection.

2.3. Novel PCR assay for detection of SFG *Rickettsia* using the *ompA* gene as a target

The tick DNA samples (n = 12), identified as positive for the presence of both *R. bellii* (using the *sca9* and *sca14* assays) and a SFG rickettsial agent (previously determined via PCR and sequencing of *ompA* amplicons generated with the primers Rr190.70p and Rr190.602n), were examined using a novel PCR assay designed to amplify a 357-bp fragment of the SFG-specific *ompA* gene. This assay was developed to provide a detection system that was comparable, in terms of sensitivity, to the *sca9*, *sca14* and *htrA* assays. The novel assay used the primers *ompAdogF* (5'-GCT TTA TTC ACC ACC TCA AC-3') and *ompAdogR* (5'-GCC GGC AGT AAT AGT AAC AG-3'), designed to generate a product of 357-bp for all the SFG *Rickettsia* reported to date infecting Brazilian bird ticks (Luz et al., 2017) and also for *R. rickettsii*.

In silico analysis indicated that the new primers would not amplify the *ompA* sequences of *R. felis* or *Rickettsia assemblensis*, two species associated predominately with fleas, but that have been infrequently detected in Brazilian ticks (Bitencourth et al., 2017; Dall'Agnol et al., 2017). The composition of the master-mix and the cycling conditions were the same as those used for the *sca9* assay, except for the extension time which was reduced to 15 s. This assay was assessed for specificity, defined as amplification of the SFG (*R. amblyommatis*, *R. monteiroi*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* and *R. rickettsii*) positive control DNAs, but with no amplification of the *R. bellii* DNA and for sensitivity, determined via the limiting dilution approach, using the *htrA* assay as the standard to determine the last dilution containing amplifiable rickettsial DNA.

2.4. Identification of amplicons

Owing to the complex nature of the DNA samples used in this study, it was considered necessary to perform post-amplification analysis of all presumptive *R. bellii* amplicons by nucleotide sequencing using the protocols reported in Luz et al. (2017). In addition, the possibility of using PCR-Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP), as an alternative, rapid and cost-efficient means to confirm the identity of amplicons was evaluated *in silico* using the free, online program NEB-cutter V2.0 (Vinceze, 2003). Based on the results of those analyses, the enzymes *AluI* (for *sca9*), *EcoRV* (for *sca14*) and *PstI* and *RsaI* (for *ompA*), were subsequently assessed *in vitro*. Digestion of the 407-bp, *htrA* amplicons was performed using the enzymes *MspI* and *RsaI*, as reported by (Santolin et al. 2013). Digestions were performed by combining 5 μ L of amplicon, 1.2 μ L of the appropriate reaction buffer, 1.2 units of restriction endonuclease, 1.2 μ L of bovine serum albumin (0.1 mg/mL) and molecular biology grade water to a final volume of 12 μ L. Incubation was at 37 °C for 3 h, followed by electrophoresis in agarose gels (2.5%) at a constant voltage of 5 V/cm for 90 min. Gels were stained with ethidium bromide, observed and digitally photographed under ultraviolet illumination. Banding patterns were compared between samples and via comparison to a DNA molecular weight marker (GeneRuler, 50 bp DNA Ladder). The resulting images were analyzed using the free software Gel-Analyzer (Skosyrev et al., 2013), available at <http://www.gelanalyzer.com>, to accurately determine the size of individual restriction fragments.

3. Results

The primer sets designed for the amplification of the four *sca* gene targets were considered specific for *R. bellii* based on *in silico* analysis and because they did not produce amplicons with the *Rickettsia*-negative tick extracts (n = 52), or with DNA purified from any of the other species of *Rickettsia* tested. Limiting dilution analysis of the control *R. bellii* (strain Mogi) DNA using the *htrA* assay, demonstrated the presence of amplifiable rickettsial DNA in samples diluted to a maximum of 10⁻⁵. The relative sensitivity of the four *sca* gene assays was determined using the same diluted DNA samples and demonstrated that the *sca9* and *sca14* assays were of equivalent sensitivity to the *htrA* assay. In contrast, the 10⁻⁴ sample was the last dilution to be amplified by the *sca3* and *sca8* assays and therefore those primer sets were not examined in subsequent experiments employing field samples. The *sca9* and *sca14* assays produced amplicons with the predicted sizes from the seven positive control *A. rotundatum* ticks naturally infected with *R. bellii*, indicating the suitability of both assays for the examination of field samples. However, it was observed that all samples produced bands of lower intensity in the *sca14* assay.

The sensitivity of the novel *ompA* assay was determined to be equivalent to that of the *htrA* assay for each of the positive control DNAs examined. Specificity of the new primers was confirmed by the observation that they did not generate amplicon from the control *R. felis* and *R. bellii* DNAs or from the seven *R. bellii* infected *A. rotundatum* samples. The amplicon generated from the *R. monteiroi* control DNA

Table 2
PCR-RFLP fragment sizes predicted following *in silico* endonuclease digestion of a 357-bp amplicon of the gene *ompA*, using the enzymes *Pst*I and *Rsa*I.

<i>Rickettsia</i> species	Banding pattern (bp)	
	<i>Pst</i> I	<i>Rsa</i> I
<i>Rickettsia amblyommatis</i>	295, 62	156, 108, 93
' <i>Candidatus Rickettsia andeanae</i> '	295, 62	264, 93
' <i>Candidatus Rickettsia colombianensi</i> '	222, 135	357
<i>R. monteiroi</i>	264, 72, 24	357
<i>Rickettsia parkeri</i>	135, 81, 78, 66	264, 93
<i>Rickettsia rhipicephali</i>	221, 139	159, 108, 93
<i>Rickettsia rickettsii</i>	140, 139, 81	159, 108, 93

was sequenced and showed 85% identity (272/320 nucleotides) to the sequences [KT899079](#) and [KU361217](#), deposited in the GenBank as partial sequences of '*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*' outer membrane protein A (*ompA*) gene, amplified by PCR from *Ixodes persulcatus* ticks in Russia and Mongolia respectively. In addition, the novel sequence showed 81% identity (263/323 nucleotides) to the outer membrane protein A (*ompA*) gene, contained in the complete genome of *Rickettsia canadensis* strain McKiel, ([CP000409.1](#)). The novel *ompA* sequence was deposited in the GenBank with the accession number [MK166031](#).

In silico restriction digest analysis, of predicted *ompA* amplicons, indicated that the enzymes *Pst*I and *Rsa*I would permit the differential identification of the SFG *Rickettsia* detected to date in Brazil (Table 2). *In vitro* digestion of amplicons of *R. amblyommatis*, *R. monteiroi*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. rickettsii* and '*Candidatus Rickettsia andeanae*' confirmed the discriminatory capacity of the dual enzyme PCR-RFLP approach (Fig. 1). DNA from '*Candidatus Rickettsia colombianensi*' was not available for use *in vitro* analysis.

The 150 DNA samples (Supplementary data Table S1), were examined using the *sca9* and *sca14* assays. A total of 12 samples (8%), comprising nine (9) *A. longirostre* ticks and a single *A. calcaratum* tick infected with *R. amblyommatis*, together with two (2) *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré ticks infected with *R. parkeri* (strain ApPR), generated amplicons of the expected size in both assays (Fig. 2a). Yet, as noted previously with the *A. rotundatum* samples, the bands generated in the *sca14* assay were less intense than in the *sca9* assay.

The presence of SFG rickettsial DNA in all 12 samples was confirmed using the novel *ompA* assay (Fig. 3a). The *sca9* and *sca14* amplicons were sequenced and corresponded to the predicted fragments of their respective gene targets, confirming the presence of rickettsial co-infections in all 12 samples. The presence of a single nucleotide polymorphism (SNP), resulting in a synonymous mutation at nucleotide position 1193 of the full-length *sca9* gene (Accession number [AY973497](#)), was detected in the specimen of *A. calcaratum* collected in the state of Rio de Janeiro in 2015. The novel sequence was deposited

in the GenBank with the accession number [MK253742](#). Digestion of the *sca9* amplicons with the enzyme *Alu*I, produced a banding pattern of 396, 185, 82, 46 and 18 bp, identical to that recorded for amplicon produced from the *R. bellii* (strain Mogi), positive control DNA (Fig. 2b). Digestion of the *ompA* amplicons confirmed that the nine *A. longirostre* and the single *A. calcaratum* were infected with *R. amblyommatis* and that the two *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré ticks were infected with *R. parkeri* (Fig. 3b).

4. Discussion

Brazilian wild birds are hosts to large populations of immature stages of *Amblyomma* ticks, with several records of infection with *R. bellii* and a variety of SFG *Rickettsia* in individual ticks collected from birds in diverse biomes (Ogrzewalska and Pinter, 2016; Luz et al., 2017; Ogrzewalska et al., 2010, 2011). A small number of studies have reported birds parasitized by multiple species of ticks, that in turn were found to be infected with distinct species of *Rickettsia* (Luz et al., 2017; Zeringóta et al., 2017). However, to our knowledge, there are no published records of co-infection of bird ticks with two or more species of *Rickettsia*. The data presented herein demonstrated for the first time that *A. longirostre* and *A. calcaratum* ticks can be naturally co-infected with *R. amblyommatis* and *R. bellii* and that *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré ticks can simultaneously harbor the *Rickettsia parkeri*-like bacterium strain ApPR (Pacheco et al., 2012) and *R. bellii*. Indeed, our data represent the first records of *R. bellii* in *A. calcaratum* and in haplotype Nazaré ticks. As such, the number of tick species known to be infected with this agent in Brazil is now sixteen.

The experimental design commonly used to screen ticks for *Rickettsia* has not changed significantly since the first studies that reported molecular methods for that purpose (Bouyer et al., 2001; Gage et al., 1994). The general strategy involves a first round of PCR amplification of extracted DNA from all samples, using primers targeting genus-specific genes, normally *gltA* and/or *htrA*. Ticks positive for the first round PCRs are subsequently screened for the *ompA* gene, considered specific for members of the SFG (Fournier et al., 2003), coupled to nucleotide sequencing of all *ompA* amplicons to obtain species-level identifications. In studies involving large numbers of rickettsia positive samples, sequencing of amplicons from the first round of PCRs may be limited to the samples that were *ompA* negative, with such ticks frequently found to be infected with *R. bellii* (Luz et al., 2017; McIntosh et al., 2015). Following analysis of *ompA* sequences, it is common practice to sequence only a representative subset of the first round PCR products, to avoid redundancy and to reduce costs (Luz et al., 2017; Zeringóta et al., 2017). Using this strategy, the detection of co-infections with *R. bellii* becomes essentially a game of chance wherein the only criteria employed is the presence of double peaks in sequencing electropherograms that were derived from a small portion of the SFG infected ticks.

Previous attempts to sequence *gltA* fragments amplified from two of

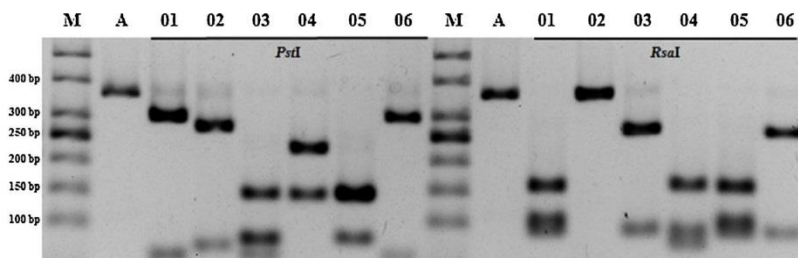


Fig. 1. Banding profiles generated following digestion of *ompA* amplicons, derived from *Rickettsia* species, using the enzymes *Pst*I and *Rsa*I. Lanes: A – undigested amplicon; 01 – *Rickettsia amblyommatis*; 02 – *Rickettsia monteiroi*; 03 – *Rickettsia parkeri*; 04 – *Rickettsia rhipicephali*; 05 – *Rickettsia rickettsii*; 06 – '*Candidatus Rickettsia andeanae*'. M = 50 bp DNA ladder. Molecular weights are indicated in base pairs (bp) on the left-hand side of the gel. Electrophoresis was performed in a 2.5% gel prepared in Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE 0.5X). Fragment sizes were determined by comparison to the bands contained in the molecular weight ladder.

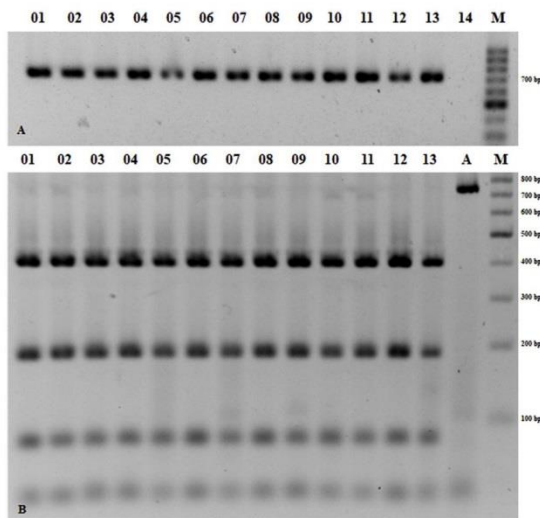


Fig. 2. A – PCR amplification of *sca9* targets in DNA extracted from nine *A. longirostre*, a single *A. calcaratum* and two *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré ticks collected from wild birds in Brazil. Lanes 01 - 3133.19; 02 - 3122.16; 03 - 3160.1; 04 - 3130.8; 05 - L36; 06 - V22A; 07 - V5D; 08 - V7C; 09 - V7D; 10 - 3130.18; 11 - 35NAZ; 12 - 13bNAZ; 13 - *Rickettsia bellii* control DNA 14- H₂O negative control. M = 100 bp ladder. Electrophoresis was performed in a 1.5% agarose gel prepared in Tris-acetic acid-EDTA buffer (TAE 0.5X). Molecular weights are indicated in base pairs (bp) on the right-hand side of the gel; **B** - Analysis of restriction digest patterns, generated for the *sca9* amplicons shown in Fig. 2a, using the enzyme *AluI*. A = undigested amplicon; Lanes 01-13 = *sca9* amplicons as identified in Fig. 2a. M = 100 bp DNA ladder. Molecular weights are indicated in base pairs (bp) on the right-hand side of the gel. Electrophoresis was performed in a 2.5% gel prepared in Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE 0.5X). Fragment sizes were determined by comparison to the bands contained in the molecular weight ladder.

the specimens of *A. longirostre* included in this study (collected in Minas Gerais in 2015 Zeringóta et al. (2017) and confirmed as infected with *R. amblyommatis* based on sequencing of fragments of *ompA* and *ompB*) had been unsuccessful, resulting in poor quality electropherograms which demonstrated double peaks at numerous locations throughout the sequence. The significance of that finding was not realized at the time of the original study. However, a careful re-analysis of the sequences indicated that both contained two distinct *gltA* amplicons, one corresponding to *R. amblyommatis* and the other to *R. bellii*. Indeed, it was the identification of those two co-infected samples which prompted the development of the methods described in the current work.

As in our earlier study (Zeringóta et al., 2017), such data may be overlooked or simply considered to represent poor-quality sequencing reactions. Through the removal of the factor of chance, the detection of co-infections with *R. bellii* will be enhanced and as a result, our comprehension of the role of *R. bellii* as a component of the bio-ecology of tick-borne rickettsial infections, including its potential role in rickettsial exclusion, should be improved.

As reported herein, the approach of using *sca9* and/or *sca14* as targets for first round PCR, in combination with the assay for *htrA*, provided a rapid method for the direct detection of *R. bellii* infections in *Amblyomma* ticks collected from wild birds, while also permitting the detection of DNA originating from the other members of the genus *Rickettsia* known to circulate in Brazil. Corroboration of the presence of *R. bellii* was rapidly (within 24 h) achieved by digestion of the *sca9* amplicons with the enzyme *AluI*, or of the *Sca14* amplicons with *EcoRV*. Confirmation of the presence of DNA originating from an additional species of *Rickettsia* could be determined by digestion of the *htrA*

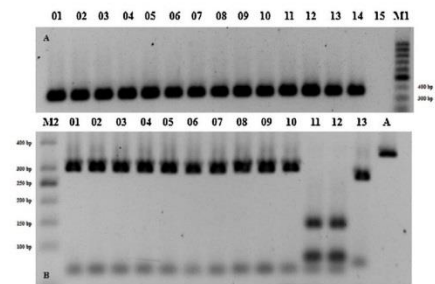


Fig. 3. A – PCR amplification of *ompA* targets in DNA extracted from nine *A. longirostre*, a single *A. calcaratum* and two *Amblyomma* sp. haplotype Nazaré ticks collected from wild birds in Brazil. Lanes 01 - 3133.19; 02 - 3122.16; 03 - 3160.1; 04 - 3130.8; 05 - L36; 06 - V22A; 07 - V5D; 08 - V7C; 09 - V7D; 10 - 3130.18; 11 - 35NAZ; 12 - 13b NAZ; 13 & 14 - *Rickettsia monteiroi* positive control DNA; 15- H₂O negative control. M1 = 100 bp ladder. Electrophoresis was performed in a 1.5% agarose gel prepared in Tris-acetic acid-EDTA buffer (TAE 0.5X). Molecular weights are indicated in base pairs (bp) on the right-hand side of the gel; **B** – Analysis of restriction digest patterns, generated for the *ompA* amplicons shown in Fig. 3a, using the enzyme *PstI*. A = undigested amplicon; Lanes 01-13 = *ompA* amplicons as identified in Fig. 2a. M2 = 50 bp DNA ladder. Molecular weights are indicated in base pairs (bp) on the right-hand side of the gel. Electrophoresis was performed in a 2.5% gel prepared in Tris-Boric acid-EDTA buffer (TBE 0.5X). Fragment sizes were determined by comparison to the bands contained in the molecular weight ladder.

amplicon as described by Santolin et al. (2013). To determine if the ticks were infected with an SFG *Rickettsia* and if so with which species, the novel *ompA* PCR was combined with RFLP analysis of amplicons using *PstI* and *RsaI*. The development of the novel *ompA* assay included in this study was considered necessary because an evaluation, using serially diluted SFG control DNAs, of the *ompA* assay routinely used by our group (employing the primers Rr190.70p and Rr190.602n), showed it to be 5 to 10-fold less sensitive than the *htrA* assay. Interestingly, the new *ompA* assay provided two unforeseen results; firstly, it permitted the differential identification by PCR-RFLP using the enzymes *PstI* and *RsaI* of the SFG agents detected in this study as well as of *R. rickettsii*. Secondly, it generated an amplicon for *R. monteiroi*, a rickettsial agent isolated from *A. incisum* ticks in Brazil that was placed in the canadensis group based on phylogenetic analysis of multiple gene sequences (Pacheco et al., 2011). Sequencing of the *ompA* amplicon supported the findings reported for the other genes.

It should be noted, that the inability of the *ompA* PCR to detect *R. felis* or *R. assembonensis* represented a potential shortcoming in the detection strategy, albeit one that can be countered by digestion of the 407-bp *htrA* amplicon with the enzyme *MspI*, resulting in the differential banding profile of 200, 157 and 50 bp as reported by Santolin et al. (2013). It is important to note, that the use of PCR-RFLP for post-amplification identification of *Rickettsia* was commonplace in the past (Eremeeva et al., 1994; Gage et al., 1994; Peniche-Lara et al., 2013) but has largely been replaced, during the last decade, by sequencing of amplicons. Nonetheless, even with the on-going reduction in the costs associated with sequencing, it is clear that the use of PCR-RFLP should be recognized as a convenient means of cutting both the costs and the time taken to establish a robust identification of tick-borne *Rickettsia* in Brazil, particularly in situations where sequencing would involve outsourcing to third party service providers (Santolin et al., 2013).

The rickettsial exclusion theory was established via simple, yet refined, experiments and is widely accepted by the majority of rickettsiologists. Nevertheless, there are some gaps in the theory, which were elegantly examined in the evenhanded review of the evidence by Telford (2009) and in the more recent data presented by Levin et al. (2018). Moreover, the application of next-generation sequencing

(NGS), technologies to the examination of tick microbiomes has indicated that the exclusion effect may not be limited to rickettsia-rickettsia interactions but rather it may also involve interactions between other components of the microbiota including facultative intracellular *Francisella*-like endosymbionts (Gurfield et al., 2017). It has even been suggested, also based on NGS analysis of tick microbiomes, that co-infection of ticks with *Rickettsia* and other pathogenic microbes (*Anaplasma*, *Babesia*, *Bartonella* and *Borrelia*), and/or endosymbionts (*Candidatus* Midichloria, *Spiroplasma*, and *Wolbachia*), may be the rule rather than the exception (Cerutti et al., 2018; Moutailler et al., 2016). Deciphering the biological significance of such interactions is a daunting task. However, it has recently been reported that the presence of “*Candidatus* Midichloria mitochondrii” in conjunction with selenoproteins, was essential for the growth of *R. parkeri* in *A. maculatum*, the gulf coast tick (Budachetri et al., 2018), demonstrating that improvements in our comprehension of microbe-microbe interactions in arthropod vectors of human and animal disease, may provide the basis for novel control strategies via microbiome and/or metabolome manipulation (Cabezas-Cruz et al., 2018; de la Fuente et al., 2017).

Unfortunately, the destructive nature of the DNA extraction method used herein, prevented an assessment of the tissue distribution of the co-infecting bacteria. Thus, it was impossible to reach any conclusions regarding the possible rickettsial exclusion capabilities of *R. bellii*. Although both technically and logistically demanding, future studies could be designed wherein tick samples would be collected and processed to produce histological sections for evaluation by immunofluorescence (Hirunkanokpun et al., 2011) and/or *in situ* fluorescent hybridization (Bagheri et al., 2017), to determine the tissue localization of the different rickettsial agents within individual ticks, as was reported for fleas infected by *R. felis* (Hirunkanokpun et al., 2011) and for *Ixodes pacificus* ticks infected with a variety of rickettsial agents (Bagheri et al., 2017). Subsequent evaluation of DNA extracted from sectioned material, using the *sca9/ompA* PCR-RFLP approach would provide confirmation of co-infection together with species-level identification of the *Rickettsia* species contained therein.

Rickettsia bellii is the earliest divergent known species of Rickettsia and demonstrates, by far, the widest host range in the American continents having been reported in association with 25 different tick species (Costa et al., 2017). However, our general understanding of the bacterium (including its potential to influence the biology of the host or its interactions with other components of the microbiome), is far from complete. The findings of the current work indicate that the distribution of *R. bellii* in Brazilian tick populations, particularly as a co-infecting species, is most likely underestimated. It is envisaged that the adoption of the methods reported herein will enhance our capacity to accurately detect the occurrence of co-infections and may serve to improve our comprehension of the role of *R. bellii* in the bio-ecology of tick-associated *Rickettsia*, including its potential participation in rickettsial exclusion.

Declaration of Competing Interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) [process E-26/101.385/2014]; the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Grant (PQ) protocol number 305217/2013-5] (awarded to JLH Faccini).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101266>.

References

- Bagheri, G., Lehner, J.D., Zhong, J., 2017. Enhanced detection of *Rickettsia* species in *Ixodes pacificus* using highly sensitive fluorescence *in situ* hybridization coupled with Tyramide Signal Amplification. *Ticks Tick. Dis.* 8, 915–921. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.08.001>.
- Bitencourth, K., Amorim, M., de Oliveira, S.V., Caetano, R.L., Voloch, C.M., Gazeta, G.S., 2017. *Amblyomma sculptum*: genetic diversity and rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. *Med. Vet. Entomol.* 31, 427–437. <https://doi.org/10.1111/mve.12249>.
- Bouyer, D.H., Stenos, J., Crocquet-Valdes, P., Moron, C.G., Popov, V.L., Zavala-Velazquez, J.E., Foil, L.D., Stothard, D.R., Azad, A.F., Walker, D.H., 2001. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 339–347. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-2-339>.
- Budachetri, K., Kumar, D., Crispell, G., Beck, C., Dasch, G., Karim, S., 2018. The tick endosymbiont *Candidatus* Midichloria mitochondrii and selenoproteins are essential for the growth of *Rickettsia parkeri* in the Gulf Coast tick vector. *Microbiome* 6, 141. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0524-2>.
- Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Mavros, A.J., 1981. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer, W., Anacker, R. (Eds.), *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. Academic Press, New York, pp. 585–594.
- Cabezas-Cruz, A., Vayssier-Taussat, M., Greub, G., 2018. Tick-borne pathogen detection: what's new? *Microbes Infect.* 20 (7–8), 441–444. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.12.015>.
- Carmichael, J.R., Fuerst, P.A., 2010. Molecular Detection of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montanensis*, and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* Tick from Nature. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10, 111–115. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0083>.
- Cerutti, F., Modesto, P., Rizzo, F., Cravero, A., Jurman, I., Costa, S., Giammarino, M., Mandola, M.L., Gorla, M., Radovic, S., Cattonaro, F., Acutis, P.L., Peletto, S., 2018. The microbiota of hematophagous ectoparasites collected from migratory birds. *PLoS One* 13, e0202270. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202270>.
- Costa, F.B., Barbieri, A.R., Szabó, M., Pablo, J., Ramos, V.N., Piovezan, U., Labruna, M.B., 2017. New records of *Rickettsia bellii*-infected ticks in Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 54, 92. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.114141>.
- Dall'Agnol, B., Souza, U., Webster, A., Weck, B., Stenzel, B., Labruna, M., Klafke, G., Martins, J.R., Ferreira, C.A.S., Reek, J., 2017. “*Candidatus* Rickettsia assembensis” in *Rhipicephalus sanguineus* ticks, Brazil. *Acta Trop.* 167, 18–20. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.12.008>.
- de la Fuente, J., Antunes, S., Bonnet, S., Cabezas-Cruz, A., Domingos, A.G., Estrada-Peña, A., Johnson, N., Kocan, K.M., Mansfield, K.L., Nijhof, A.M., Papa, A., Rudenko, N., Villar, M., Alberdi, P., Torina, A., Ayllón, N., Vancova, M., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Caracappa, S., Fooks, A.R., Gortazar, C., Rego, R.O.M., 2017. Tick-pathogen interactions and vector competence: identification of molecular drivers for tick-borne diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 114. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>.
- Diop, A., Raoult, D., Fournier, P.-E., 2018. Rickettsial genomics and the paradigm of genome reduction associated with increased virulence. *Microbes Infect.* 20, 401–409. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.009>.
- Eremeeva, M., Yu, X., Raoult, D., 1994. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J. Clin. Microbiol.* 32 (3), 803–810.
- Faccini-Martínez, Á.A., García-Álvarez, L., Hidalgo, M., Oteo, J.A., 2014. Syndromic classification of rickettsioses: an approach for clinical practice. *Int. J. Infect. Dis.* 28, 126–139. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.025>.
- Fournier, P.-E., Dumler, J.S., Greub, G., Zhang, J., Wu, Y., Raoult, D., 2003. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5456–5465. <https://doi.org/10.1128/JCM.41.12.5456-5465.2003>.
- Gage, K.L., Schrupf, M.E., Karstens, R.H., Burgdorfer, W., Schwan, T.G., 1994. DNA typing of rickettsiae in naturally infected ticks using a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism system. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 247–260. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.247>.
- Gurfield, N., Grewal, S., Cua, L.S., Torres, P.J., Kelley, S.T., 2017. Endosymbiont interference and microbial diversity of the Pacific coast tick, *Dermacentor occidentalis*, in San Diego County, California. *PeerJ*, e3202. <https://doi.org/10.7717/peerj.3202>.
- Hecht, J.A., Allerdice, M.E.J., Krawczak, F.S., Labruna, M.B., Paddock, C.D., Karpathy, S.E., 2016. Development of a *Rickettsia bellii*-specific taq man assay targeting the citrate synthase gene. *J. Med. Entomol.* 53, 1492–1495. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw111>.
- Hirunkanokpun, S., Thepparit, C., Foil, L.D., Macaluso, K.R., 2011. Horizontal transmission of *Rickettsia felis* between cat fleas, *Ctenocephalides felis*. *Mol. Ecol.* 20, 4577–4586. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05289.x>.
- Horta, M.C., Pinter, A., Schumaker, T.T.S., Labruna, M.B., 2006. Natural infection, transovarial transmission, and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 285–290. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.053>.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Bouyer, D.H., McBride, J., Camargo, L.M.A., Camargo, E.P., Popov, V., Walker, D.H., 2004. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J. Med. Entomol.* 41, 1073–1081. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1073>.
- Lee, J.K., Moraru, G.M., Stokes, J.V., Wills, R.W., Mitchell, E., Unz, E., Moore-Henderson, B., Harper, A.B., Varela-Stokes, A.S., 2017. *Rickettsia parkeri* and “*Candidatus* Rickettsia andeanae” in Questing *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) From Mississippi. *J. Med. Entomol.* 54, 476–480. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw175>.
- Levin, M.L., Schumacher, L.B.M., Snellgrove, A., 2018. Effects of *Rickettsia amblyommatis*

- infection on the vector competence of *Amblyomma americanum* ticks for *Rickettsia rickettsii*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 18 (11), 579–587. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2284>.
- Luz, H.R., Faccini, J.L.H., McIntosh, D., 2017. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. *Ticks Tick. Dis.* 8, 657–665. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.012>.
- Luz, H.R., Silva-Santos, E., Costa-Campos, C.E., Acosta, I., Martins, T.F., Muñoz-Leal, S., McIntosh, D., Faccini, J.L.H., Labruna, M.B., 2018. Detection of *Rickettsia* spp. in ticks parasitizing toads (*Rhinella marina*) in the northern Brazilian Amazon. *Exp. Appl. Acarol.* <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0270-y>.
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M., Azad, A.F., 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia* sp. *J. Med. Entomol.* 39, 809–813. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.6.809>.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.* 84, 478–484. <https://doi.org/10.1007/s004360050433>.
- McIntosh, D., Bezerra, R.A., Luz, H.R., Faccini, J.L.H., Gaiotto, F.A., Giné, G.A.F., Albuquerque, G.R., 2015. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. *Braz. J. Microbiol.* 46, 879–883. <https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140623>.
- Moutailler, S., Valiente Moro, C., Vaumourin, E., Michelet, L., Tran, F.H., Devillers, E., Cosson, J.-F., Gasqui, P., Van, V.T., Mavingui, P., Vourch, G., Vayssier-Tausat, M., 2016. Co-infection of ticks: the rule rather than the exception. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004539. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004539>.
- Ogata, H., La Scola, B., Audic, S., Renesto, P., Blanc, G., Robert, C., Fournier, P.-E., Claverie, J.-M., Raoult, D., 2006. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genet.* 2, e76. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020076>.
- Ogrzewalska, M., Pinter, A., 2016. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* 53, 1. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p1-31>.
- Ogrzewalska, M., Uezu, A., Labruna, M.B., 2011. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitol. Res.* 108, 665–670. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2111-8>.
- Ogrzewalska, M., Uezu, A., Labruna, M.B., 2010. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitol. Res.* 106, 809–816. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1733-1>.
- Oliveira de, S.V., Caldas de, E.P., Colombo, S., Gazeta, G.S., Labruna, M.B., Santos dos, F.C.P., Angerami, R.N., 2016. A fatal case of Brazilian spotted fever in a non-endemic area in Brazil: the importance of having health professionals who understand the disease and its areas of transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 653–655. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0088-2016>.
- Pacheco, R.C., Arzu, M., Nieri-Bastos, F.A., Moraes-Filho, J., Marcili, A., Richtzenhain, L.J., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2012. Rickettsial Infection in Ticks (Acari: Ixodidae) Collected on Birds in Southern Brazil. *J. Med. Entomol.* 49, 710–716. <https://doi.org/10.1603/ME11217>.
- Pacheco, R.C., Horta, M.C., Moraes-Filho, J., Ataliba, A.C., Pinter, A., Labruna, M.B., 2007. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. *Biomédica Rev. del Inst. Nac. Salud* 27, 364–371. <https://doi.org/10.7705/biomedica.v27i3.199>.
- Pacheco, R.C., Moraes-Filho, J., Marcili, A., Richtzenhain, L.J., Szabó, M.P.J., Catroxo, M.H.B., Bouyer, D.H., Labruna, M.B., 2011. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 5207–5211. <https://doi.org/10.1128/AEM.05166-11>.
- Paddock, C.D., Denison, A.M., Dryden, M.W., Noden, B.H., Lash, R.R., Abdelghani, S.S., Evans, A.E., Kelly, A.R., Hecht, J.A., Karpathy, S.E., Ganta, R.R., Little, S.E., 2015. High prevalence of “*Candidatus Rickettsia andeanae*” and apparent exclusion of *Rickettsia parkeri* in adult *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae) from Kansas and Oklahoma. *Ticks Tick. Dis.* 6, 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.02.001>.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., Abdad, M.Y., Stenos, J., Bitam, I., Fournier, P.-E., Raoult, D., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 657–702. <https://doi.org/10.1128/CMR.00032-13>.
- Peniche-Lara, G., Zavala-Velazquez, J., Dzul-Rosado, K., Walker, D.H., Zavala-Castro, J., 2013. Simple method to differentiate among *Rickettsia* species. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 23 (3), 203–208. <https://doi.org/10.1159/000348298>.
- Sakai, R.K., Costa, F.B., Ueno, T.E.H., Ramirez, D.G., Soares, J.F., Fonseca, A.H., Labruna, M.B., Barros-Battesti, D.M., 2014. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. *Ticks Tick. Dis.* 5, 917–923. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.003>.
- Santolin, I.D.A., Famadas, K.M., McIntosh, D., 2013. 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. *Rev. Bras. Med. Veterinária* 35, 68–73.
- Sears, K.T., Ceraul, S.M., Gillespie, J.J., Allen, E.D., Popov, V.L., Ammerman, N.C., Rahman, M.S., Azad, A.F., 2012. Surface proteome analysis and characterization of surface cell antigen (Sca) or autotransporter family of *Rickettsia typhi*. *PLoS Pathog.* 8, e1002856. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002856>.
- Skosyrev, V.S., Vasil'eva, G.V., Lomaeva, M.G., Malakhova, L.V., Antipova, V.N., Bezlepkin, V.G., 2013. Specialized software product for comparative analysis of multicomponent DNA fingerprints. *Genetika* 49, 531–537.
- Spolidorio, M.G., Minervino, A.H.H., Valadas, S.Y.O.B., Soares, H.S., Neves, K.A.L., Labruna, M.B., Ribeiro, M.F.B., Gennari, S.M., 2013. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 22, 214–219. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612013005000023>.
- Szabó, M.P.J., Nieri-Bastos, F.A., Spolidorio, M.G., Martins, T.F., Barbieri, A.M., Labruna, M.B., 2013. *In vitro* isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. *Parasitology* 140, 719–728. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002065>.
- Telford III, S.R., 2009. Status of the “East side hypothesis” (Transovarial Interference) twenty five years later. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1166, 144–150. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04522.x>.
- Untergasser, A., Cutcutache, I., Koressaar, T., Ye, J., Faircloth, B.C., Remm, M., Rozen, S.G., 2012. Primer3—new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 40, e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gks596>.
- Vieira, F., de, T., Acosta, I.C.L., Martins, T.F., Filho, J.M., Krawczak, F., da, S., Barbieri, A.R.M., Egert, L., Fernandes, D.R., Braga, F.R., Labruna, M.B., Dietze, R., 2018. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. *Vet. Parasitol.* 249, 43–48. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.11.005>.
- Vince, T., 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res.* 31, 3688–3691. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg526>.
- Wilkswo, M.E., Hu, R., Dasch, G.A., Krueger, L., Arugay, A., Jones, K., Hess, B., Bennett, S., Kramer, V., Eremeeva, M.E., 2008. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor* species from Southern California. *J. Med. Entomol.* 45, 509–516.
- Zeringóta, V., Maturano, R., Luz, H.R., Senra, T.O.S., Daemon, E., Faccini, J.L.H., McIntosh, D., 2017. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. *Ticks Tick. Dis.* 8, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.10.001>.

ANEXO E

Anexo E. Orientação para confecção de géis de agarose 2,5% para separação de bandas resultantes do protocolo de PCR-RFLP

Volume do gel: Devemos considerar o tamanho do suporte utilizado (e número de poços necessários) para confecção do gel e determinação do volume (quadro abaixo). Para separação das bandas resultantes após a realização do PCR-RFLP, utilizamos géis com aproximadamente 0,5 cm de altura, o que possibilita a visualização de bandas menores.

Determinação do volume do gel de agarose:

$$C \times L \times A = V$$

C = comprimento do suporte (cm)

L = largura do suporte (cm)

A = altura desejada (0,5 cm)

V = volume de tampão necessário (resultado em $\text{cm}^3 = \text{ml}$)

Tampão de corrida: Tendo em vista a duração da corrida de eletroforese para separação de bandas e o tamanho de fragmentos esperado, utiliza-se o tampão [Tris-Borato-EDTA](#) (TBE). Utiliza-se o tampão na concentração 0,5x para confecção do gel de agarose.

Concentração do gel de agarose: Objetivando a separação adequada das bandas após a digestão, preparamos géis na concentração 2,5%.

Preparação:

1. Determina-se o volume de tampão necessário para confecção do gel e realiza-se a mensuração, com auxílio de proveta. O tampão é então transferido para o Erlenmeyer;
2. Pesando a agarose em pó em balança de precisão, esta é adicionada ao mesmo Erlenmeyer. Após leve homogeneização, aguarda-se aproximadamente 10 min, possibilitando a hidratação da agarose em pó;
3. Pesa-se o volume total do conjunto Erlenmeyer + TBE + agarose, o que permitirá a adição do volume evaporado no decorrer da fundição;
4. Utilizando micro-ondas, realiza-se a fundição da agarose. É necessário homogeneizar a mistura cautelosamente a cada 30 segundos (utilizando luvas térmicas). O número de repetições pode variar de acordo com a potência do micro-ondas (usualmente de 2 a 2,5 min).
5. Pesa-se novamente o conjunto Erlenmeyer + TBE + agarose (agora fundido), adicionando H_2O destilada até alcançar o volume registrado no passo 3;
6. Manter o Erlenmeyer em Banho-maria (50°C) durante 10 min, reduzindo a temperatura da agarose, sem possibilitar sua solidificação;

7. Utilizando suporte previamente nivelado para gel de agarose, adicionado do pente com o número de poços necessários, adicionar a agarose lentamente. Com o auxílio de ponteira, remover imediatamente toda e qualquer bolha presente na superfície do gel. Após 20 min, o gel estará solidificado e pronto para uso.

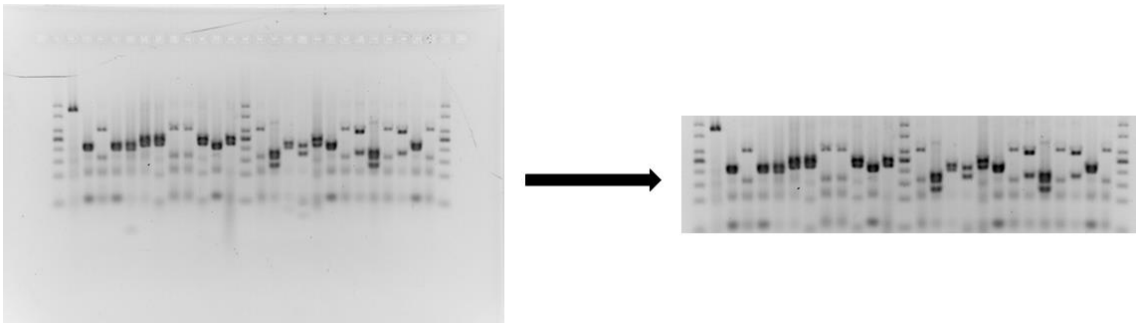
ANEXO F

Anexo F. Tutorial para mensuração de fragmentos de banda resultantes da digestão enzimática, a partir de meios automáticos ou manuais

Gel Analyzer 2010a (Mensuração Automática):

Diversos softwares encontram-se disponíveis para auxiliar na determinação aproximada de fragmentos de banda em gel de agarose. Na presente instrução, consideraremos o emprego do software **GelAnalyzer 2010a** (software gratuito com instruções para download [aqui](#)).

1. Anterior a análise da imagem, sugere-se que ela seja editada, removendo os excessos e facilitando a detecção de bandas e redução de artefatos pelo software.



2. Inicie uma nova análise (“New Analysis”), selecionando o local de armazenamento da ilustração registrada. O programa reconhece arquivos nos formatos .png, .jpg, .jpeg e .gif.

3. Ao selecionar a imagem a ser trabalhada, é necessário determinar o tipo de contraste empregado (“Light on Dark” ou “Dark on Light” – nos exemplos abaixo, selecionamos a opção “Dark on Light”).

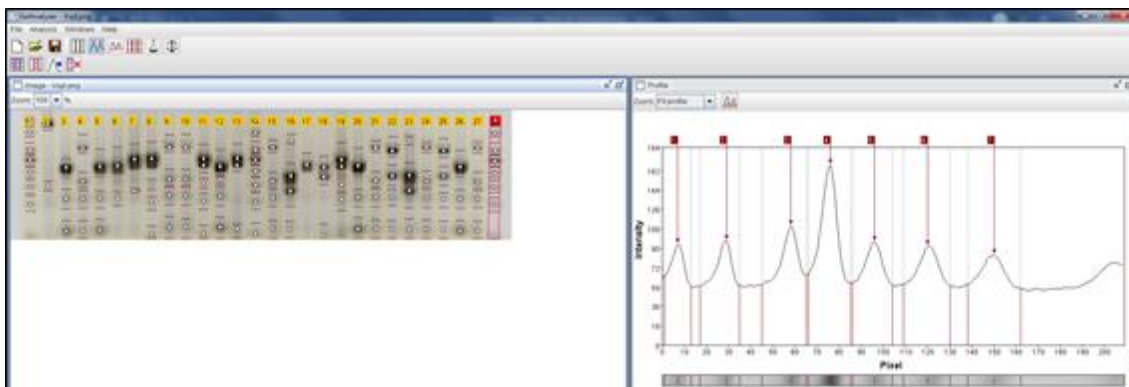
Dica: Atente para o contraste da sua imagem, pois ele auxiliará no processamento da imagem.

4. Em **Lanes mode**, opte pela ação **Detect lanes**. Com isso, o software deve reconhecer cada uma das linhas do seu gel de agarose, facilitando as próximas etapas. Caso não funcione adequadamente, é possível realizar esta operação de forma manual.



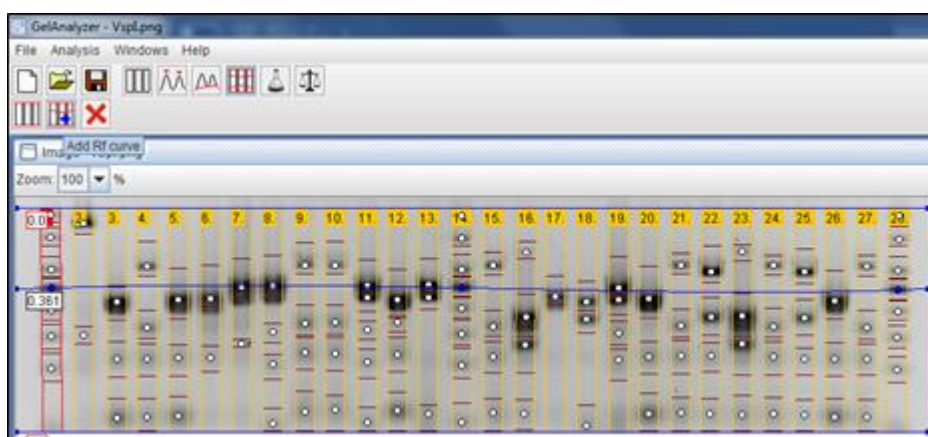
5. Em **Bands mode**, selecione a opção **Detect bands on every line** e o software automaticamente detectará as bandas presentes no seu gel, gerando um gráfico na janela “Profile” do software. Novamente, é possível realizar esta operação manualmente, caso a detecção automática não funcione devidamente.

Dica: Assim como é possível adicionar bandas, há ainda a possibilidade de deletar possíveis “bandas” erroneamente reconhecidas (bandas de digestão parcial, sujidades no gel etc.). Faça isso clicando com o botão direito do mouse na sobre a banda que deseja deletar, na janela “Profile”. A soma dos fragmentos resultantes, ao final do processo, com posterior comparação com o tamanho total do fragmento amplificado fornecerá uma indicação de possível sobreposição de bandas ou detecção de bandas extras.



6. Caso haja algum tipo de distorção como resultado da eletroforese, é possível reduzir os impactos desta na análise, acessando a opção **Rf calibration mode**, seguido da opção **Add Rf curve**. Então, na janela onde sua imagem encontra-se exposta, posicione a linha no local desejado e realize seu posicionamento utilizando pontos de referência ao longo do gel (no exemplo abaixo, utilizamos a banda de 250 pb do Ladder para esta função).

Dica: A adição de Ladder em diferentes pontos do gel fornece uma excelente referência para a calibração.



7. Finalmente, acessando a opção **MW calibration mode**, selecione bandas no gel de tamanho previamente conhecido e insira estas informações no sistema. A partir da adição de três pontos de referência, o software gerará uma curva que possibilita determinar pontos de tamanho desconhecido no gel de agarose.

Dica: Embora o ladder possa ser utilizado como ponto referencial para enzima *DraI*, o mesmo não pode ser dito para enzima *VspI*, onde há uma redução na velocidade de eletroforese de produtos de PCR digeridos. Desta forma, a adição de amostras com identidade conhecida no gel (preferencialmente com padrões de banda que englobem uma faixa diversa), atendem a esta função (no exemplo abaixo, utilizamos as espécies *Amblyomma brasiliense*, *A. longirostre* e *A. romarioi*).



8. Após informar os pontos referência, ainda no **MW calibration mode**, ao selecionar qualquer uma das linhas do gel, surgirá uma tabela no canto inferior esquerdo da tela, onde é possível obter a interpretação do software para o padrão de bandas resultante (na coluna **MW**).

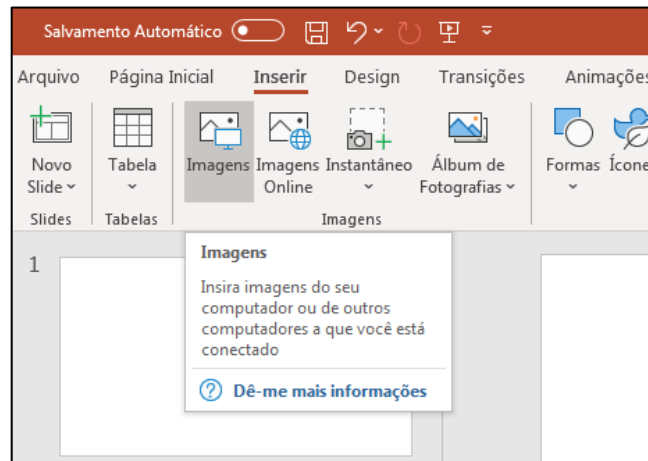
Dica: Ao realizar a soma das bandas, atente para o resultado. Números muito superiores a 460 pb (no caso de 16S rRNA para caracterização de ixodídeos) podem indicar a detecção de bandas de digestão parcial, ou mesmo artefatos. Em contrapartida, resultados muito inferiores sugerem a ocorrência de sobreposição de bandas ou a não contagem de fragmentos muito pequenos (nossa ferramenta de busca considera apenas fragmentos ≥ 70 pb).

Analysis info					
Show					
Lane #	Band #	Rf	Raw volume	Cal. volume	MW
8.	1.	0.361	5679	-	230
8.	2.	0.417	1925	-	201

Power Point (Mensuração Manual):

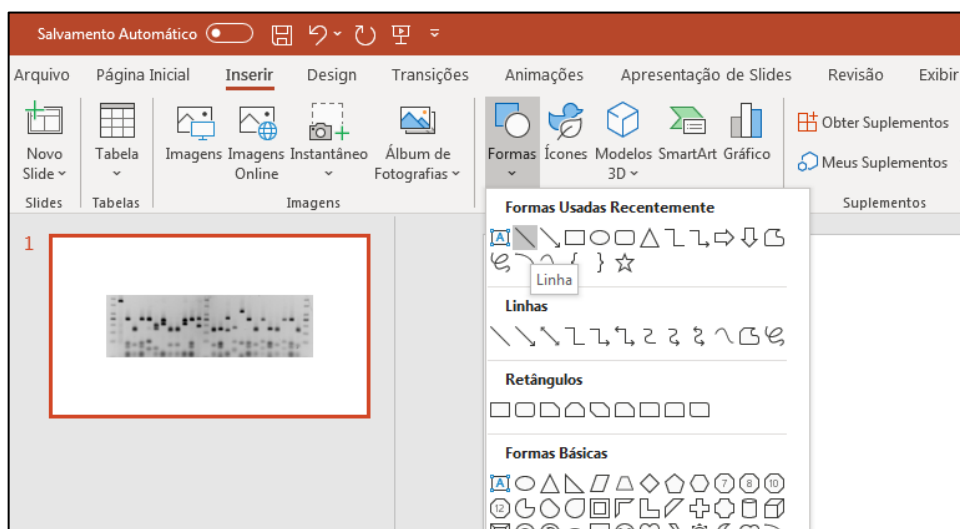
Utilizando softwares como PowerPoint (Microsoft Office) ou similar, é possível realizar a mensuração estimada das bandas obtidas, empregando padrões de banda já conhecidos. Para o presente guia, empregamos a versão **Office 365**;

1. Ao iniciar um novo arquivo, vá em **Inserir**, e opte pela introdução de uma nova **Imagem** em sua apresentação;

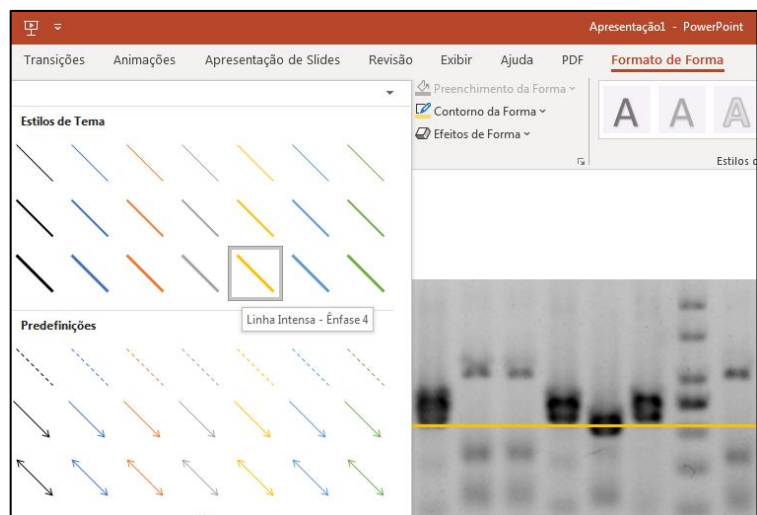


2. Ainda em **Inserir**, selecione pela opção **Formas** e localize a opção **linha**, posicionando-a com o comprimento necessário para a análise de sua imagem;

Dica: Ao inserir a linha pressionando a tecla **Shift** do teclado, ela será automaticamente introduzida horizontal



3. A selecionar a linha e acessar a opção **Formato de Forma** é possível editar sua espessura e coloração, favorecendo o contraste com a imagem e interpretação do gel;



4. Utilizando a linha como ferramenta auxiliar para análise comparativa de fragmentos de bandas de tamanho conhecido e perfis avaliados, é possível determinar o tamanho aproximado das bandas.

Dica: Para auxiliar a interpretação, é possível colocar caixas de texto sobre as bandas de tamanho conhecido, facilitando a análise.

