

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

LAIS MIGUEL REZENDE

Pesquisa de riquétsias em áreas antropizadas

DOUTORADO

**UBERLÂNDIA
2020**

Lais Miguel Rezende

Pesquisa de riquétsias em áreas antropizadas

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Doutora em Ciências Veterinárias.

Área de Concentração: Saúde Animal

Orientador: Prof. Dr. Matias Pablo Juan Szabó
Coorientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Uberlândia, MG

Julho-2020



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

| | | | | |
|------------------------------------|---|-----------------|-------|-----------------------|
| Programa de Pós-Graduação em: | CIÊNCIAS VETERINÁRIAS | | | |
| Defesa de: | TESE DE DOUTORADO Nº PPGCV/015/2020 | | | |
| Data: | 30 de julho de 2020 | Hora de início: | 09:00 | Hora de encerramento: |
| Matrícula do Discente: | 11613VET011 | | | |
| Nome do Discente: | LAIS MIGUEL REZENDE | | | |
| Título do Trabalho: | PESQUISA DE RIQUÉTSIAS EM ÁREAS ANTROPIZADAS | | | |
| Área de concentração: | SAÚDE ANIMAL | | | |
| Linha de pesquisa: | CLÍNICA MÉDICA E INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA | | | |
| Projeto de Pesquisa de vinculação: | A RELAÇÃO HOSPEDEIRO-CARRAPATO-AMBIENTE E EPIDEMIOLOGIA DAS DOENÇAS TRANSMITIDAS PELO VETOR | | | |

Reuniu-se por Videoconferência (meio eletrônico), a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, assim composta: Professores Doutores: **Jean Ezequiel Limongi - UFU; Stefan Vilges de Oliveira - UFU; Álvaro Adolfo Faccini Martinez - Associação Colombiana de Infectologia; Sebastian Alejandro Munoz Leal - Universidade de Concepción; Matias Pablo Juan Szabó** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa, Dr. Matias Pablo Juan Szabó, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença do público, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(as) examinadores(as), que passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

Aprovado(a).

Esta defesa faz parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor.

O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Matias Pablo Juan Szabo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/07/2020, às 16:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Stefan Vilges de Oliveira, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/07/2020, às 16:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Alvaro Faccini, Usuário Externo**, em 30/07/2020, às 17:26, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sebastián Alejandro Muñoz Leal, Usuário Externo**, em 30/07/2020, às 17:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jean Ezequiel Limongi, Professor(a) do Magistério Superior**, em 30/07/2020, às 18:55, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2135677** e o código CRC **EF418317**.

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

| | |
|--|--|
| R467 | Rezende, Laís Miguel, 1988- |
| 2020 | Pesquisa de riquétsias em áreas antropizadas [recurso eletrônico] / Laís Miguel Rezende. - 2020. |
| <p>Orientador: Matias Pablo Juan Szabó. Coorientador: Jonny Yokosawa. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Ciências Veterinárias. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2020.522 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> | |
| <p>1. Veterinária. I. Szabó, Matias Pablo Juan,1964-, (Orient.). II. Yokosawa, Jonny,1966-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Ciências Veterinárias. IV. Título.</p> | |
| CDU: 619 | |

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074

“Aceita as dificuldades com paciência, procurando guardar contigo as lições de que se façam portadoras. Nada acontece por acaso e, embora te pareça ao contrário, até mesmo o mal permanece ao serviço do bem.”

André Luiz

Agradecimentos

Talvez os agradecimentos sejam a melhor parte de toda a Tese, porque é nesse espaço, geralmente o último a ser escrito, dando aquela sensação de trabalho finalizado, que eu anseie por algum tempo, quando as coisas pareciam travadas. Mas são nesses exatos momentos, onde nada parece dar certo, que aparecem pessoas que de alguma forma te auxiliam para que tudo aos poucos, voltem a se movimentar. Então a vocês, meus sinceros agradecimentos:

A Deus, sua equipe espiritual e meu guia protetor, porque a fé move montanhas e sem Deus nada seríamos.

Agradeço a minha família, mãe, pai e minha irmã, pela paciência, amor e ajuda incondicional durante todos esses anos.

A todos os meus amigos do LADOC, em especial, Dayane, Andréia, minhas gêmeas amadas, Lara, Gabi e Fernanda, obrigada pela amizade e pelos diversos momentos de alegria que compartilhamos.

A minha orientadora da graduação e mestrado, Prof. Dra. Anna Lima que me incentivou a iniciar minha jornada na vida acadêmica e sempre me apoiou e acreditou no meu potencial mesmo de longe.

Ao Prof. Dr. Matias Szabó, com o **qual** eu obtive um aprendizado imenso, um exemplo de orientador, agradeço toda paciência e tempo gasto em meu processo de aprendizagem e por melhorar muito a minha tese, por aguentar e retirar carinhosamente os muitos “o qual” que eu acidentalmente posso ter colocado durante a escrita. Sou muito grata pela sua orientação.

Ao meu coorientador Jonny Yokosawa, agradeço a paciência, o aprendizado e a confiança em mim depositada.

Agradeço a Jamile, pela disposição em sempre me socorrer quando necessário e por todo o ensinamento inicial que foi essencial para o desenvolvimento do meu Doutorado.

Ao Centro Espírita Obreiros do Bem por ser minha fonte de energia, refúgio e paz e a todos os meus amigos lá cultivados.

A Universidade Federal de Uberlândia minha segunda casa por muito anos, por fornecer toda a estrutura necessária para minha formação.

E a toda família do LABIX, em especial, Vinícius, Marlene, Adri, Carol, Raissa e Ana Carolina, obrigada por me acolherem tão bem e estarem presentes nos momentos em que precisei, vocês tornaram esses quatro anos e uns quebrados muito mais leves e com certeza muito mais divertidos e até mesmo emocionantes (abelhas) em alguns momentos.

Por fim, gostaria de agradecer ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Capítulo I - Considerações gerais

| | |
|------------------|---------|
| Introdução..... | pág. 9 |
| Referências..... | pág. 13 |

Capítulo II - Dinâmica da infestação e da infecção por *Rickettsia parkeri* em carapatos de cervos- do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em centro de conservação.....

| |
|---------|
| pág. 18 |
|---------|

Capítulo III - Pesquisa de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica no Parque Nacional do Iguaçu e em áreas adjacentes em Foz de Iguaçu-Paraná.....

| |
|---------|
| pág. 39 |
|---------|

Capítulo IV - Pesquisa de *Rickettsia* sp. em *Ornithodoros cerradoensis* em uma área antropizada em Araguapaz, Goiás.....

| |
|--------|
| pág 57 |
|--------|

| | |
|--------------|--------|
| Anexo I..... | pág 71 |
|--------------|--------|

Capítulo I

Considerações Gerais

Resumo: Os carapatos são vetores eficientes de vários agentes infecciosos, como protozoários, vírus e bactérias, tanto para humanos como para animais, sendo sua importância na saúde pública, cada vez mais reconhecida. Dentre as várias enfermidades infecciosas transmitidas ao homem as rickettsioses possuem um papel de destaque nas Américas. No Brasil as bactérias *Rickettsia rickettsii* e a *Rickettsia parkeri* são as únicas transmitidas por carapatos e comprovadamente associadas a doença infecciosa humana. Sendo as infecções por ambas associadas a cenários epidemiológicos de origem antrópica com modificações comportamentais de hospedeiros e ambientais. Nos dois casos há um desequilíbrio nas relações entre hospedeiros e parasitas e incremento das doenças infecciosas. Nesta tese são discutidas em três artigos a relação entre riquetsias patogênicas ou de patogenicidade desconhecida, com vetores, hospedeiros e ambiente em três cenários eco epidemiológicos, distintos e caracterizados por alterações ambientais de origem antrópica de intensidade diversa. No primeiro, foi estudada a relação entre riquetsias e populações dos carapatos *Amblyomma triste*, *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma sculptum* em cervos-do- pantanal mantidos em piquetes após sua retirada de seu ambiente natural, a várzea. No segundo artigo foi pesquisada a relação entre cães, riquetsias e carapatos *Amblyomma ovale* no remanescente mais bem preservado de Mata Atlântica do interior, o Parque Nacional de Iguaçu (PNI) e em fragmentos florestais urbanos deste. No terceiro artigo pesquisou-se em área sob efeito antrópico intenso riquetsias em carapato argasídeo nidícola, *Ornithodoros cerradoensis*, espécie recém descrita no Cerrado goiano na região de Araguapaz-GO.

Palavras chaves: Áreas antropizadas; Carapatos; *Rickettsia spp*

Abstract: Ticks are efficient vectors of various infectious agents, such as protozoa, viruses and bacteria, for both humans and animals, and their importance in public health is increasingly recognized. Among the various infectious diseases transmitted to man, rickettsial diseases have a prominent role in the Americas. In Brazil, *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* are the only bacteria transmitted by ticks and have been shown to be associated with human infectious disease. As infections by both are associated with epidemiological scenarios of anthropic origin with host and environmental behavioral changes. In both cases there is an imbalance in the relationship between hosts and parasites and an increase in infectious diseases. In this thesis, the relationship between pathogenic rickettsiae or unknown pathogenicity is discussed in three articles, with vectors, hosts and the environment in three different eco-epidemiological scenarios characterized by environmental changes of anthropic origin of different intensity. In the first, the relationship between rickettsiae and populations of ticks *Amblyomma triste*, *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma sculptum* in wetland deer kept in paddocks after their removal from their natural environment, the floodplain, was studied. In the second article, the relationship between dogs, rickettsiae and ticks *Amblyomma ovale* was investigated in the best-preserved remnant of inland Atlantic Forest, the Iguaçu National Park (PNI) and in urban forest fragments of it. In the third article, an area under intense anthropic effect was investigated for rickettsiae in argasid tick, *Ornithodoros cerradoensis*, a species recently described in the Cerrado of Goiás in the region of Araguapaz-GO.

Key words: Anthropized areas; Ticks; *Rickettsia spp*

Introdução

Estima-se que aproximadamente 60% dos patógenos humanos são zoonóticos e que 75% das doenças humanas emergentes são de origem animal (OIE, 2015). Além disso, observações multidisciplinares apontam que a intensificação da agricultura e de outras alterações ambientais de origem antrópica em associação com alterações do comportamento humano, elevam o risco de emergência destas doenças (Jones et al., 2013). Segundo estas observações, as informações disponíveis não são suficientes para avaliar a complexidade das inter-relações bióticas e abióticas das zoonoses o que limitam nossa capacidade de prever, prevenir e responder à emergência delas. Por este motivo, uma abordagem baseada no conceito de Saúde única, que integre a saúde humana, animais e meio ambiente pode fornecer uma oportunidade antecipada para detecção e prevenção de doenças zoonóticas. Pesquisas que conectem a dinâmica das alterações ambientais com seu efeito sobre populações de patógenos, vetores e variações no risco de exposição humana, são essenciais para medicina preventiva e a saúde global.

Vetores são importantes agentes de transmissão de patógenos zoonóticos. Estes animais não apenas transportam patógenos entre hospedeiros como ajudam no processo infeccioso ao transportar e/ou controlar barreiras do hospedeiro. Entre outros, vetores perfuram a principal barreira física, a pele, e ainda são capazes de controlar os processos reativos do hospedeiro como inflamação e resposta imune facilitando, respectivamente, o acesso e a proliferação em hospedeiros de microrganismos patogênicos (Wikle et al., 2017).

Carapatos são vetores que transmitem a maior variedade de organismos patogênicos em relação a qualquer outro grupo de artrópodes e sua saliva pode causar toxicoses locais ou sistêmicas graves em hospedeiros (Jongejan e Uilenberg, 2004). Além disso, em função de sua longevidade ambiental e transmissão transovariana e perpetuação transestadal de microrganismos, carapatos além de vetores são reservatórios de agentes patogênicos como é o caso do agente da Febre Maculosa Brasileira, a bactéria *Rickettsia rickettsii* e vírus da Peste Suína Africana (Dixon et al., 1988; Labruna 2009).

Em sistemática, carapatos são artrópodes da classe Arachnida, subclasse Acari e ordem Ixodida subdividida nas famílias, Ixodidae e Argasidae, amplamente distribuídas no mundo, Nuttalliellidae, com apenas uma espécie conhecida, com distribuição restrita à África do Sul e Tanzânia (Guglielmone et al., 2010) e uma última família já extinta denominada Deinocrotonidae,

São ectoparasitas de uma ampla variedade de espécies terrestres, incluindo aves, répteis e mamíferos (Sonenshine et al., 2002). Carapatos obrigatoriamente, necessitam de sangue para seu desenvolvimento em pelo menos um estágio de seu ciclo de vida, possuem uma longevidade excepcional, grande potencial reprodutivo, e a capacidade de transmissão transovariana e perpetuação transestadal de patógenos (Labuda e Nuttall., 2004).

As duas principais famílias de carapatos, Ixodidae e Argasidae englobam espécies vetores de microrganismos com considerável importância para a saúde pública. Por exemplo, membros do gênero *Ornithodoros* são transmissores do vírus da peste suína africana (Beck et al., 1986), bactéria *Coxiella burnetii*, agente da febre Q aguda e de endocardite em seres humanos e animais (Almeida et al. 2012; Griffin et al. 2012) e de diversas espécies de *Borrelia* que causam a febre recorrente, em humanos e animais (Estrada-Peña e

Jongejan, 1999). No Brasil, algumas espécies desse gênero estão ligadas a casos de toxicose em humanos, com manifestações clínicas que incluem prurido no local da picada, edema e eritema, lesões em bolhas e envolvimento sistêmico (febre transitória, dispneia e mal-estar) (de Oliveira et al., 2018). E mais recentemente foi realizado o isolamento de *Borrelia venezuelensis* a partir de *Ornithodoros rufus* coletados no Maranhão (Muñoz-Leal et al., 2018).

Dentre as várias enfermidades infecciosas transmitidas pela família Ixodidae, ao homem estão, as riquetsioses, encefalites virais, erliquiose, anaplasmosse, babesiose e borreliose (Jongejan e Uilenberg, 2004). A doença de Lyme, causada pela infecção pela bactéria *Borrelia burgdorferi*, é a doença transmitida por vetores com maior impacto sobre a saúde pública nos Estados Unidos e Europa (Brisson et al. 2008).

Dentre as doenças transmitidas por carapatos a seres humanos nas Américas as riquetsioses possuem uma grande relevância. Riquetsias são bactérias do gênero *Rickettsia* da ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae, parasitas intracelulares obrigatórios, em formato de bastonetes, Gram-negativas, que podem ser transmitidas aos seres humanos através da picada de vetores artrópodes (Raoult e Roux, 1997). Os membros deste gênero são subdivididos em diversos grupos: 1) grupo tifo (GT), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; 2) grupo da febre maculosa (GFM) representado por mais de vinte espécies, a exemplo da *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*; 3) grupo de transição, onde estão inseridas *Rickettsia akari*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia australis*; 4) grupo Canadensis, formado pela espécie *Rickettsia canadensis* e afins; 5) grupo Bellii, representado pela espécie *Rickettsia bellii* (Weinert et al., 2009).

Cerca de 22 espécies e subespécies de riquetsias são relatadas como patogênicas para o ser humano sendo alguma destas: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia conorii* subsp. *Conorii*, *Rickettsia conorii* subsp. *israelensis*, *Rickettsia conorii* subsp. *caspia*, *Rickettsia conorii* subsp. *indica*, *Rickettsia sibirica* subsp. *sibirica*, *Rickettsia sibirica* subsp. *mongolotimonae*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia akari* e *Rickettsia felis* (Merhej e Raoult, 2011).

No Brasil duas riquetsioses pertencentes ao grupo da febre maculosa possuem relevância na saúde pública, *Rickettsia rickettsii* e a *Rickettsia parkeri* (Oliveira et al., 2016). Estas bactérias são transmitidas através da picada de carapatos infectados e a infecção humana é caracterizada por sintomatologia inespecífica principalmente no início da doença, como febre elevada, náuseas e vômitos,cefaléia e mialgia intensa e/ou prostração. Alguns pacientes podem desenvolver manifestações dermatológicas sugestivas com exantema predominantemente nas regiões palmar e plantar e/ou escara de inoculação (Faccini-Martínez et al., 2014). A evolução do quadro clínico pode ser variável, de leves e atípicos até casos graves, com manifestações hemorrágicas e disfunção múltipla dos órgãos, dependendo de fatores como patogenicidade da espécie de riquetsia infectante e tempo do início do tratamento com antibióticos (Angerami et al., 2009; Faccini-Martínez et al., 2014).

A *Rickettsia rickettsii*, o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira e a espécie mais patogênica, associada a casos graves, de rápida evolução e elevada letalidade. Duas espécies de carapatos no Brasil reconhecidamente transmitem doença. Um deles, o carapato estrela, *Amblyomma sculptum* é vetor em áreas

antropizadas com elevada densidade de capivaras principalmente na região Sudeste. O outro carrapato, *Amblyomma aureolatum*, é vetor em áreas de interface de Mata Atlântica de altitude, com o cão atuando como agente de transporte de carrapatos infectados da mata aos domicílios (Pinter e Labruna, 2006; Szabó et al., 2013a; Scinachi et al., 2017).

A bactéria *R. parkeri* foi isolada pela primeira vez nos Estados Unidos no ano de 1937 de um carrapato da espécie *Amblyomma maculatum* coletado de bovino, no Texas. Porém sua patogenicidade foi reconhecida apenas em 2004 (Paddock et al., 2004). A infecção humana gerada por essa bactéria causa uma doença febril não letal, com sintomas clínicos mais brandos quando comparados com aqueles causados pela *R. rickettsii*. De forma contrastante com a ricketsiose citada acima a doença pela *R. parkeri* é frequentemente associada a uma lesão necrótica, a escara de inoculação no local da picada e linfadenopatia regional (Angerami et al., 2009; Faccini-Martínez et al., 2018).

Segundo Nieri-Bastos et al., (2018) no Brasil a *R. parkeri* é representada por três clados: *R. parkeri* sensu stricto (s.s.), associada aos carrapatos *Amblyomma triste*, a linhagem NOD, composta por dois isolados de carrapatos de *Amblyomma nodosum*; e a linhagem da Mata Atlântica, composta por seis isolados das espécies *Amblyomma ovale* ou *Amblyomma aureolatum*.

Destas, duas são sabidamente patogênicas para humanos, a *Rickettsia parkeri* sensu stricto (s.s.) e *Rickettsia parkeri* cepa mata Atlântica. Esta última é a única associada a casos clínicos humanos confirmados em laboratório no Brasil. Considera-se a *R. parkeri* cepa Mata Atlântica como uma das principais espécies na gênese de febre maculosa no país, predominantemente em áreas de Mata Atlântica nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste associada sempre associada ao carrapato *Amblyomma ovale* (Spolidorio et al., 2010; Silva et al., 2011; Krawczak, 2016; Sevá et al., 2019).

Outro cenário de transmissão de Febre Maculosa no Brasil ainda sem uma prova direta é causada por *R. parkeri* s.s. Neste cenário o patógeno está associado ao vetor, carrapatos adultos da espécie *Amblyomma tigrinum* no Pampa brasileiro no Rio Grande do Sul (Weck et al., 2017, 2016; Dall'Agnol et al., 2018). Perfil semelhante ao padrão epidemiológico sugerido em algumas regiões da Argentina, onde *A. tigrinum* é apontado como o vetor de *R. parkeri* (Romer et al., 2014).

No Brasil, a emergência e reemergência das febres maculosas estão associadas aos efeitos da ação antrópica, para fins econômicos e/ou sociais, com dois cenários ecoepidemiológicos em áreas endêmicas. O cenário mais prevalente é aquele em que houve a expansão e aumento da densidade populacional da capivara, hospedeiro amplificador da bactéria *Rickettsia rickettsii* e do carrapato vetor *Amblyomma sculptum* em áreas urbanas e rurais (Szabó et al., 2013b).

Diversos fatores levaram ao aumento populacional da capivara, destacam-se entre estes a maior oferta de alimentos em especial de cana-de-açúcar e o carisma do animal cujas populações são toleradas em estreito contato com o homem (Polo et al., 2015; Pajuaba et al., 2019). O segundo cenário se dá pela expansão urbana nas proximidades ou em remanescentes florestais da Mata Atlântica e posse irresponsável de cães. A incursão destes carnívoros domésticos em áreas de mata, estabelece um fluxo de vetores (*Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale*) e dois patógenos associados (*R. rickettsii* e *R. parkeri* cepa da Mata Atlântica,

respectivamente) para dentro dos domicílios (Pinter et al., 2004; Pinter e Labruna, 2006; Angerami et al., 2012; Szabó et al., 2013a;).

Por outro lado, por motivos não claros, determinadas riquetsioses transmitidas por carapatos no Brasil não estão descritas ou não estão presentes em todas as áreas propensas, apesar de contextos ecoepidemiológicos supostamente adequados. Por exemplo a riquetsiose causada pela bactéria *R. parkeri* s.s. e transmitida para humanos pelo carapato *Amblyomma triste* a qual foi diagnosticada no Uruguai e Argentina (Romer et al., 2011; Venzal et al., 2012) mas nunca foi descrita no Brasil muito embora o patógeno tenha sido relatado no país em elevadas taxas (Silveira et al., 2007; Barbieri et al., 2019). Também não há relatos de febre maculosa por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica na região da maior reserva de Mata Atlântica do interior do Brasil, o Parque Nacional do Iguaçu, apesar da abundância do vetor, o carapato *Amblyomma ovale* (Suzin et al., 2020).

No conjunto, as observações indicam que ações antrópicas estão implicadas no aumento dos casos de doença humana transmitidas por determinadas espécies de carapatos e causadas por seus patógenos. Isso poderia ocorrer por desequilíbrios populacionais (aumento) do vetor e seus microrganismos ou simplesmente maior exposição e contato do ser humano com populações em equilíbrio natural. De fato, sabe-se que interferências humanas resultam em mudanças nas relações patógeno-parasita e ou hospedeiro parasita. Uma das consequências que podem ser geradas é o de incremento de doenças infeciosas existentes e ou surgimento de outras novas (Szabó et al., 2003; Rhyan e Spraker, 2010).

Em face dos expostos, esta tese explorou três contextos ecoepidemiológicos (três artigos) envolvendo carapatos e riquetsias patogênicas ou de patogenicidade desconhecida, porém sob efeito antrópico diverso. Explorou-se em cada uma delas as espécies de carapatos e de riquetsias e suas possíveis interações com outras espécies de vetores e de riquetsias do meio, a relação com o hospedeiro mantenedor do vetor principal e o ambiente deste. Em cada caso foram discutidas as condições ecoepidemiológicas que poderiam favorecer ou desfavorecer infecção e doença humana.

O primeiro artigo descreve a dinâmica ao longo de anos das taxas de infecção por *R. parkeri* s.s. de carapatos *A. triste* de cervos do pantanal em cativeiro mantidos em piquetes após retirada do seu habitat natural, a várzea. Neste artigo é ainda explorado um possível “spill over” da riquetsia para carapatos *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma sculptum* infestando os mesmos hospedeiros. O segundo artigo discorre sobre pesquisa pelo patógeno *R. parkeri* cepa Mata Atlântica em carapatos *A. ovale* em uma área com impacto antrópico reduzido, o Parque Nacional do Iguaçu e fragmentos próximos. Neste caso é ainda analisada a possível interferência da *Rickettsia bellii* sobre a amplificação da riquetsia patogênica. Por último estudou-se em uma área do Cerrado goiano muito antropizado uma provável nova espécie de riquetsia em uma espécie recém descoberta de carapato do gênero *Ornithodoros*, *O. cerradoensis*, encontrada em uma área modificada e destinada para criação de tartarugas.

Referências:

- Angerami, R.N., da Silva, A.M.R., Nascimento, E.M.M., Colombo, S., Wada, M.Y., dos Santos, F.C.P., Mancini, D.M., de Oliveira, R.C., Katz, G., Martins, E.C., da Silva, L.J., 2009. Brazilian spotted fever: Two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 207–208. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02160.x>
- Almeida, A.P., Marcili, A., Leite, R.C., Nieri-Bastos, F.A., Domingues, L.N., Martins, J.R., Labruna, M.B., 2012. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis* 3: 203–206.
- Angerami, R. N.; Câmara, M.; Pacola, M. R.; Rezende, R. C. M.; Duarte, R. M. R.; Nascimento, E. M. M.; Colombo, S.; Santos, F. C. P.; Leite, R. M.; Katz, G.; Silva, L. J. Features of Brazilian Spotted Fever in two different endemic areas in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 3, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.010>
- Angerami, R. N.; Resende, M. R.; Feltrin, A. F. C.; Katz, G.; Nascimento, E. M.; Stucchi, R. S. B.; Silva, L. J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from a Endemic Area in Southeastern Brazil – Clinical Aspects. *Annals New York Academy Sciences*, v. 1078, p. 252-254, 2006. <https://doi.org/10.1196/annals.1374.044>
- Barbieri, A.R.M.; Szabó, M.P.J.; Costa, F.B.; Martins, T.F.; Soares, H.S.; Pascoli, G.; Torga, K.; Saraiva, D.G.; Ramos, V.N.; Osava, C.; Gerardi, M.; Dias, R.A.; Moraes, E.A. Jr.; Ferreira, F.; Castro, M.B.; Labruna, M.B., 2019. Species richness and seasonal dynamics of ticks with notes on rickettsial infection in a Natural Park of the Cerrado biome in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 10 (2):442-453. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.010>.
- Beck, A., Holscher, K., Butler, J., 1986. Life cycle of *Ornithodoros turicata americanus* (Acari: Argasidae) in the laboratory. *J. Med. Entomol.* 23: 313–319. <https://doi.org/10.1093/jmedent/23.3.313>
- Brisson, D., Dykhuizen, D.E., Ostfeld, R.S., 2008. Conspicuous impacts of inconspicuous hosts on the Lyme disease epidemic. *Proc Biol Sci*, 275(1631):227-235. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1208>.
- Dall’Agnol, B., Souza, U.A., Weck, B., Trigo, T.C., Jardim, M.M.A., Costa, F.B., Labruna, M.B., Peters, F.B., Favarini, M.O., Mazim, F.D., Ferreira, C.A.S., Reck, J., 2018. Rickettsia parkeri in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa. *Transbound. Emerg. Dis.* 65, e224–e230. <https://doi.org/10.1111/tbed.12743>
- de Oliveira, S.V., Bitencourt, K., Borsoi, A.B.P., et al., 2018. Human parasitism and toxicosis by *Ornithodoros rietcorreai* (Acari: Argasidae) in an urban area of Northeastern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2018 Sep;9(6):1494-1498. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.011>.
- Dixon, L.K., Wilkinson, P.J., 1988. Genetic Diversity of African Swine Fever Virus Isolates from Soft Ticks (*Ornithodoros moubata*) Inhabiting Warthog Burrows in Zambia. *J. gen. Virol.* 69, 2981-2993. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-69-12-2981>
- Estrada-Pena, A., Jongejan, F., 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology*, v.23, p.685-715.
- Faccini-Martínez, Á.A., Oliveira, S.V. de, Cerutti Junior, C., Labruna, M.B., 2018. Febre Maculosa por Rickettsia parkeri no Brasil: condutas de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento. *J. Heal. Biol. Sci.* 6, 299. <https://doi.org/10.12662/2317-3076jhbs.v6i3.1940.p299-312.2018>
- 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>.
- Gibbs, E.P.J., 2005. Emerging zoonotic epidemics in the interconnected global community. *The Veterinary Record*, November 26 157: 673-679. <http://dx.doi.org/10.1136/vr.157.22.673>

- Griffin, A.T., Espinosa, M., Nakamatsu, R., 2012. Q fever endocarditis: An unusual presentation. *Am. J. Med. Sci.* 344, 480–484. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3182684979>
- Guglielmone, A. A., Robbins, R. G., Apaneskevich, D. A., Petney, T. N., Estrada-Peña, A.. Horak, I. G., Shao, R.; Barker, S. A., 2010. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, v. 2528, p. 1–28. <https://doi.org/10.5281/zenodo.196488>
- Jones, B.A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M.H., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J., Pfeiffer, D.U., 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS)* 110(21): 8399-8404. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1208059110>
- Jongejan, F. and Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129: S3-S14.
- Krawczak, F.S., Agostinho, W.C., Polo, G., Moraes-Filho, J., Labruna, M.B., 2016. CompArative evaluation of *Amblyomma ovale* ticks infected and noninfected by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, the agent of an emerging rickettsiosis in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 502–507. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.007>.
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1166: 156-166. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>
- Labuda, M. and Nuttall, P.A., 2004. Tick-borne viruses. *Parasitology*, v.129: S221-245. <http://dx.doi.org/10.1017/s0031182004005220>
- Merhej, V and Raoult, D., 2011. Rickettsial evolution in the light of compArative genomics. *Biological Reviews*, v. 86, n. 2, p. 379–405. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00151.x>
- Muñoz-Leal S., Faccini-Martínez, Á.A., Costa, F.B., Marcili, A., Mesquita, E.T.K.C., Marques, E.P., Labruna, M.B. 2018. Isolation and molecular characterization of a relapsing fever *Borrelia* recovered from *Ornithodoros rufus* in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 9(4):864-871. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.008>
- Nieri-Bastos, F.A., Marcili, A., de Sousa, R., Paddock, C.D., Labruna, M.B., 2018. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.02872-17>
- Oliveira, S. V., Caldas, E. P., Colombo, S., Gazeta, G. S., Labruna, M. B., Santos, F. C. P., Angerami, R., 2016. Case of Brazilian Spotted Fever in a Non-Endemic Area in Brazil: the importance of having health professionals understanding the disease and its areas of transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 49, 653–655. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0088-2016>
- Paddock, C.D., Sumner, J.W., Comer, J.A., Zaki, S.R., Goldsmith, C.S., Goddard, J., McLellan, S.L., Tamminga, C.L., Ohl, C.A., 2004. *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 38 (6), 805–811. <https://doi.org/10.1086/381894>
- Pajuaba Neto A.A.; Limongi, J.E.; Silva, V.P.; Szabó, M.P.J., 2019. Conhecimentos atitudes e práticas em áreas antropizadas indenes para febre maculosa: percepção da sociedade. *Hygeia* 15 (34): 35-52. <http://dx.doi.org/10.14393/Hygeia153450844>
- Pinter A. and Labruna M.B., 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078:523-529. <http://dx.doi.org/10.1196/annals.1374.103>
- Pinter, A., Dias, R.A., Gennari, S.M., Labruna, M.B., 2004. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *J.Med. Entomol.*, 41(3): 324-332. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.324>
- Polo, G., Labruna, M.B., Ferreira, F., 2015. Satellite Hyperspectral Imagery to Support Tick-Borne Infectious Diseases Surveillance. *Plos One* 10(11): e0143736. doi:10.1371/journal.pone.0143736.

- Polo, G., Labruna, M.B., Ferreira, F., 2015. Satellite Hyperspectral Imagery to Support Tick-Borne Infectious Diseases Surveillance. *Plos One* 10(11): e0143736. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0143736>.
- Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin Microbiol Rev.* 1997;10(4):694-719.
- Rhyan, J.C., Spraker, T.R. 2010. Emergence of Diseases from wildlife reservoirs. *Veterinary Pathology* 47(1), 34-39. <https://doi.org/10.1177/0300985809354466>
- Romer Y, Nava S, Govedic F, et al. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis in different ecological regions of Argentina and its association with *Amblyomma tigrinum* as a potential vector. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(6):1156-1160. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0334>
- Romer, Y., Seijo, A. C., Crudo, F., Nicholson, W. L., Varela-Stokes, A., Lash, R., Paddock, C. D., 2011. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 17(7), 1169-1173. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1707.101857>
- Scinachi, C. A., Takeda, G. A. C. G., Mucci, L. F., Pinter, A., 2017. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. *Acta Tropica*, 166, 225–233. <https://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica>.
- Sevá, P., Martins, T.F., Leal, S.M., Rodrigues, A.C., Pinter, A., Luz, H.R., Angerami, R.N., Labruna, M.B., 2019. SHORT REPORT A human case of spotted fever caused by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest and its association to the tick *Amblyomma ovale*. *Parasit. Vectors* 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3730-2>
- Silva, N., Eremeeva, M.E., Rozental, T., Ribeiro, G.S., Paddock, C.D., Ramos, E.A.G., Dasch, G.A., Lemos, E.R.S. De, Ko, A.I., 2011. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil 17, 275–278. <https://doi.org/10.3201/eid1702.100859>
- Silveira, I., Pacheco, R.P., Szabó, M.P.J., Ramos, H.G.C., Labruna, M.B., 2007. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 13(7): 1111-1113. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1307.061397>
- Sonenshine, D.E., Nicholson, W.L., Lane, R.S., 2002. Ticks (Ixodida). In: Mullen G, Durden L, editors. *Medical and veterinary entomology*. 1st ed. Amsterdã: Academic Press Elsevier Science. p. 517-558.
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Mantovani, E., Brandão, P.E., Richtzenhain, L.J., Yoshinari, N.H., 2010. Fever Group 16, 521–523. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091338>
- Suzin, A., Vogliotti, A., Nunes, P.H., Barbieri, A.R.M., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., 2020. Free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the Iguaçu National Park, Brazil: Temporal dynamics and questing behavior on vegetation. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11, 101471. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101471>
- Szabó, M.P.J., Spolidorio, M.G., Martins, T.F., 2013a. 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 719–728. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002065>
- Szabó, M.P.J., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013b. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers Cellular and Infection Microbiology*, 3, 30-38. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>.
- Szabó, M. P. J., Labruna, M. B., Pereira, M. C. 2003. Ticks (Acari: Ixodidae) on Wild Marsh-Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil: Infestations Before and After Habitat Loss. *Journal of Medical Entomology*, 40(3), 268-274. <https://doi.org/10.1093/jmedent/40.3.268>
- Venzal, J.M., Estrada Peña, A., Portillo, A., Mangold, A.J., Castro, O., Souza, C.G., Félix, M.L., Pérez-Martínez, L., Santibáñez, S., Oteo, J.A., 2012. *Rickettsia parkeri*: a rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic áreas for spotted fever rickettsiosis in southern Uruguay. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*, 54(3):131-134. <https://doi.org/10.1590/S0036-4665201200030003>

Weck, B., Dall'Agnol, B., Souza, U., Webster, A., Stenzel, B., Klafke, G., Martins, J.R., Reck, J., 2017. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. *Acta Trop.* 171, 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.028>

Weck, B., Dall'Agnol, B., Souza, U., Webster, A., Stenzel, B., Klafke, G., Martins, J.R., Reck, J., 2016. Spotted fever group *Rickettsia* in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. *Emerg. Infect. Dis.* 22, 2014–2016. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160859>

Weinert, L.A., Werren, J.H., Aebi, A., Stone, G.N., Jiggins, F.M., 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biol.* 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6>

Wikle, S.K., Aksoy, S., Dimopoulos, G., 2017. Arthropod Vector: Controller of Disease Transmission, Volume 2: Vector Saliva-Host Pathogen Interactions. Volume 2. Academic Press (Elsevier Inc.) London. pp253

World Organization for Animal Health. 2015. Biological Threat Reduction Strategy, in OIE Global Conference on Biological Threat Reduction, Paris. Disponível em: https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/StrategyBiothreat2015-FINAL.pdf

Capítulo II

Dinâmica da infestação por *Rickettsia parkeri* em carapatos de Cervos- do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em centro de conservação

Dinâmica da infestação e da infecção por *Rickettsia parkeri* em carapatos de Cervos- do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) em centro de conservação

Lais Miguel Rezende^{a,*}; Maria Marlene Martins^a, Luciana Tonelotto^b; Rodrigo Costa Maia^c; Vinícius Silva Rodrigues^a; Carolina Fonseca Osava^d; Thiago Fernandes Martins^e; Marcelo Bahia Labruna^e; Matias Pablo Juan Szabó^a

^aLaboratório de Ixodologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720/Campus Umuarama-Bloco 2T, CEP 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

^b Médica veterinária autônoma.

^cLaboratório de Imunopatologia, Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, R. Três, 408-462, Campus Universitário - Morro do Cruzeiro, Ouro Preto - MG, CEP 35400-000, Brasil

^d Instituto Federal Goiano- Campos Urutáí, Rod. Geraldo S.Nascimento, Km 2,5. CEP 75790-000, Urutáí, Goiás, Brasil.

^e Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, CEP 05508-270, Brasil

*Corresponding author: laismr16@yahoo.com.br

Resumo: Carapatos possuem grande especificidade macro e microambiental e alterações de origem antrópica podem provocar profundas modificações nas relações com seus hospedeiros. Entre outros, podem alterar a transmissão de microrganismos patogênicos e amplificar a ocorrência de doenças infecciosas nos hospedeiros. O objetivo do trabalho foi avaliar a relação entre as populações de carapatos *Amblyomma triste*, *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma sculptum* em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) após sua retirada de ambiente natural a várzea, para cativeiro em um centro de conservação, devido a construção da Usina Hidrelétrica Três Irmãos, no rio Tietê e realizar a pesquisa de riquétsias nesses ectoparasitas. Para esse fim, foram realizadas coletas de carapatos em cervos-do-pantanal no Centro de Conservação do Cervo do Pantanal (CCCP) em Promissão, SP durante nove anos consecutivos (2000 a 2008) os quais ficavam alocações em recintos no interior de piquetes, que poderiam se tornar alagáveis dependendo da época do ano. Amostras de DNA dos carapatos coletados foram testadas para presença de material genético de *Rickettsia* por uma sequência de reações em cadeia pela polimerase (PCR). No total, foram coletados 1012 carapatos de 26 cervos-do-pantanal. A prevalência por *A. triste* diminuiu em 45% a partir do 3^a ano de coleta, enquanto a prevalência por *R. microplus* aumentou em aproximadamente 40% e o *A. sculptum* foi o carapato com menor intensidade de infestação em todo o período. A mudança na proporção entre as duas espécies mais prevalentes foi atribuída ao novo ambiente, restrito em tamanho e com uma área mais seca e propícia para o *R. microplus* e menos adequado para o *A. triste*. A pesquisa do DNA de riquétsia (PCR) em 424 carapatos (42% do total), divididos em 276 pools identificou, 20 amostras positivas, para o gene *gltA*, característico do gênero *Rickettsia* sp. Destas, 18 eram provenientes de carapatos *A. triste* e revelaram também o gene *ompA* característico do grupo da febre maculosa. As amostras com DNA estavam distribuídas ao longo dos nove anos de observação. Onze amostras, sequenciadas demonstraram identidade de 100% com a *Rickettsia parkeri* sensu stricto. Nas duas amostras provenientes de *R. microplus*, não houve amplificação do gene *ompA* e também não geraram produto em uma PCR específica para *Rickettsia bellii*. O sequenciamento do gene *gltA* também foi 100% semelhante com *Rickettsia parkeri* s.s.. sugerindo uma degradação parcial do DNA da *Rickettsia* neste carapato. Em conclusão, as mudanças no ambiente dos cervos-do-pantanal alteraram as populações de carapatos e revelou a manutenção, pelo menos temporária, da bactéria *R. parkeri* em carapatos *A. triste*, mesmo em cativeiro.

Palavras-chave: *Amblyomma triste*; Cervos-do-pantanal ; *Rhipicephalus microplus*, *Rickettsia parkeri* s.s.

Abstract: Ticks have high macro and microenvironmental specificity, and environmental changes of anthropic origin can alter relationships with their hosts. Among others, they may alter the transmission of pathogenic

microorganisms and amplify the occurrence of infectious diseases. The objective of the work was to evaluate the relationship between the populations of ticks *Amblyomma triste*, *Rhipicephalus microplus*, *Amblyomma sculptum* in deer of the Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) after its removal from its environment for captivity in a conservation center, due to the construction of the Três Irmãos Hydroelectric Plant, on the Tietê River and to carry out rickettsial research on these ectoparasites. For this purpose, deer ticks were collected at the Pantanal Deer Conservation Center (CCCP) in Promissão, SP for nine consecutive years (2000 to 2008), which were allocated in enclosures inside floodable paddocks but with a small and constantly dry area. DNA samples from the collected ticks were tested for the presence of *Rickettsia* genetic material by a sequence of polymerase chain reactions (PCR). In total, 1012 ticks from 26 deer were collected over nine consecutive years. The prevalence of *A. triste* decreased by 45% after the 3rd year of collection, while the prevalence by *R. microplus* increased by approximately 40% and *A. sculptum* was the tick with the lowest infestation intensity throughout the period. The change in the proportion between the two most prevalent species was attributed to the new environment with a restricted size and with the dry area more suitable for *R. microplus*. The search for rickettsia DNA (PCR) in 424 ticks (42% of the total), divided into 276 pools, identified 20 positive samples for the *gltA* gene, characteristic of the genus *Rickettsia* sp. Of these, 18 were from *A. triste* ticks and revealed the presence of the *ompA* as well, a gene characteristic of the spotted fever group. These samples were distributed over the nine years of observation. Eleven samples, sequenced, showed 100% identity with *Rickettsia parkeri* ss. Two samples from *R. microplus* did not amplify *ompA* gene neither yielded product in a PCR specific for *Rickettsia bellii*. Sequencing of the *gltA* gene in the DNA of these two ticks was also 100% similar with *Rickettsia parkeri* sensu stricto. indicating DNA degeneration in *R. microplus*. In conclusion, the changes in the deer environment changed the tick populations and revealed the maintenance, at least temporary, of the *R. parkeri* bacteria in *A. triste* ticks, even in captivity.

Keywords: *Amblyomma triste*; Marsh deer; *Rhipicephalus microplus*, *Rickettsia parkeri*

1. Introdução

De acordo com Sauer et al. (1995) os carrapatos superam todos os outros artrópodes em número e variedade de doenças transmissíveis para animais domésticos e perdem apenas para os mosquitos como vetores de doenças humanas. No entanto, a maior parte dos estudos estão relacionados a carrapatos e seus hospedeiros domésticos, mesmo que a maior parte das espécies de ixodídeos tenham relação com animais silvestres (Hoogstraal, 1985; Tatchell, 1987; Szabó et al., 2007).

O cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) originalmente encontrado por toda a América do Sul, tem sido apontado como um dos principais hospedeiros dos adultos de *Amblyomma triste* no Brasil (Szabó et al., 2003; Barros-Battesti et al., 2006). Tanto o hospedeiro quanto o parasita estão associados a áreas úmidas, pantanosas e ambientes propensos a inundações (Sinkoc et al., 1998; Labruna et al., 2002; Szabó et al., 2003 e 2007).

Andriolo et al. (2013) observou que populações deste cervídeo sofreram um declínio populacional entre 30% a 50% nos últimos 18 anos, associado, à redução drástica do seu habitat pelo represamento de rios para construção de usinas hidrelétricas. O que gera mudanças ambientais significativas em vários níveis ecológicos, sendo uma delas, o aumento nas infestações de carrapatos nos cervos-do-pantanal remanescentes após a perda de habitat (Szabó et al., 2003).

Merece destaque a noção de que níveis elevados de infestação e alta concentração de hospedeiros podem favorecer a disseminação de patógenos associados aos carrapatos (Paddock e Yabsley, 2007). Entre as doenças transmitidas por esses artrópodes, as bactérias do gênero *Rickettsia*, pertencentes ao grupo da Febre Maculosa,

possuem grande relevância na saúde pública, sendo a bactéria *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, as únicas bactérias com patogenicidade associada a doenças humanas no Brasil (Oliveira et al., 2016).

A bactéria *R. parkeri* foi descrita pela primeira vez nos Estados Unidos durante a primeira metade do século 20, em carapato *Amblyomma maculatum* no Texas (Parker et al., 1939). No entanto, sua patogenicidade para seres humanos foi reconhecida somente em 2004 (Paddock et al., 2004). Nesse mesmo ano, foi relatada, infectando carapatos *A. triste* no Uruguai e mais tarde, foi considerada o agente etiológico da febre maculosa Uruguaia (Conti-Díaz et al., 2009). Caso semelhante ocorreu na Argentina em 2008, sendo a *R. parkeri* o agente etiológico de casos clínicos de febre maculosa, associado a picadas do carapato *A. triste* (Romer et al., 2001; Nava et al., 2008).

Segundo Nieri-Bastos et al., (2018) no Brasil a *R. parkeri* é representada por 3 clados: *R. parkeri* sensu stricto (s.s.), associada aos carapatos *A. triste*; a linhagem NOD, composta por dois isolados de carapatos de *Amblyomma nodosum*; e a linhagem da Mata Atlântica, composta por seis isolados das espécies *Amblyomma ovale* ou *Amblyomma aureolatum*. Duas delas, são sabidamente patogênicas para humanos, *Rickettsia parkeri* sensu stricto e *Rickettsia* cepa Mata Atlântica, sendo esta última, associada a casos clínicos humanos confirmados em laboratório, nos estados de São Paulo (Spolidorio et al. 2010), dois casos na Bahia (Silva et al., 2011, da Paixão Sevá et al., 2019) e Santa Catarina (Krawczak et al., 2016) e atualmente, tem sido reconhecida como uma das principais espécies de riquétias envolvidas em casos de febre maculosa no país.

Rickettsia parkeri sensu stricto no Brasil, ainda não foi associada a casos humanos da doença, porém é encontrada em carapatos adultos de *A. triste* com uma taxa de infecção variando entre 7,23 a $\pm 10\%$ (Silveira et al., 2007; Melo et al., 2015). No Uruguai e na Argentina o carapato *A. triste* está frequentemente associado a picadas humanas e em animais (Venzal et al., 2003; Guglielmone et al., 2006; Nava, 2011). No entanto, ao contrário do observado nestes países, no Brasil nunca houve relato fidedigno de picadas por este carapato em humanos (Silveira et al., 2007; Szabó et al. 2019a).

Em condições naturais o *A. triste* é um carapato de três hospedeiros, e os estágios imaturos (larvas e ninfas) alimentam-se, principalmente, em roedores e aves. No Brasil, os estágios adultos são encontrados principalmente parasitando cervo-do-pantanal (Szabó et al., 2003). Sabe-se que a maioria das doenças causadas por vetores emergem de maneira accidental, principalmente por atitudes antropogênicas como, invasões de áreas naturais, que favorecem um maior contato, dos seres humanos com a vida selvagem (Rhyan e Spraker, 2010). Essas alterações ambientais em detrimento de motivos econômicos e ou sociais, geram, mudanças nas relações patógeno-parasita e ou hospedeiro parasita. Como exemplo, o próprio cervo-do-pantanal, naturalmente infestado por carapatos *A. triste*, contudo, devido a constante perda de habitat, acabam partilhando áreas de pastagens com bovinos e consequentemente são parasitados pelo carapato bovino *Rhipicephalus microplus* os tornando potencialmente expostos a agentes infecciosos transmitidos por este carapato (Szabó et al., 2003; Szabó et al., 2007).

Entre os patógenos relacionados ao *R. microplus*, podemos citar bactérias do gênero *Anaplasma* e protozoários do gênero *Babesia* e *Mogiana* vírus, pertencente ao grupo *Jingmenvirus*, patogênico para humanos. Apesar de ser considerado pouco relevante na epidemiologia da Febre Maculosa, existem relatos destes

carrapatos infectados por riquetsias do GFM (Guglielmone et al., 2006; Bermudez et al., 2009; Moura-Martiniano et al., 2014; Pesquera et al., 2015; Pascoal, 2018; Tayra et al., 2020). Assim como, há exposição do *R. microplus* a patógenos associados ao *A. triste*, como exemplo a *R. parkeri* quando as duas espécies de carrapato infestam o mesmo cervo.

De acordo com Cunningham (1996) e Zeimes et al (2014) mudanças no ambiente do hospedeiro ou do parasito dificultam o monitoramento e o controle de patógenos. Em vista dos expostos, o trabalho propôs realizar a pesquisa de riquetsias nesses ectoparasitas e avaliar a relação entre as populações de *A. triste*, *R. microplus*, *A. sculptum* em cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) nascidos em cativeiro no Centro de Conservação do Cervo do Pantanal e descendentes de várias gerações da população resgatada da Usina Hidrelétrica (UHE) de Três Irmãos, no rio Tietê, bacia do Alto Paraná.

2. Material e Métodos

2.1 Local da coleta

Carrapatos para este estudo foram coletados no Centro de Conservação do Cervo do Pantanal (CCCP) de 2000 a 2008. O CCCP localiza-se em uma Área de Preservação permanente de aproximadamente 765 hectares, no município de Promissão, São Paulo em um dos remanescentes de várzea do rio Tietê, junto ao Bolsão do Ribeirão dos Patos. O clima na cidade de Promissão é úmido e quente, com temperaturas em geral variando de 17 °C a 31 °C, com chuvas ao longo do ano inteiro com precipitação média mensal de 80 mm.

Os cervos-do-pantanal que se encontravam no CCCP nos períodos da coleta, à exceção de uma fêmea oriunda do resgate e que viveu por 16 anos no local, eram animais nascidos em cativeiro e descendentes de várias gerações da população resgatada em 1990 da Usina Hidrelétrica de Três Irmãos, no rio Tietê, bacia do Alto Paraná. Os animais eram mantidos em três recintos de nove hectares subdivididos em vários piquetes, com aproximadamente 2.000m² cada e cercados por um alambrado com dois metros de altura (Figura A).

Cada recinto abrigava um ou vários indivíduos, a depender de sua faixa etária (filhotes ou jovens) e sexo (casal ou grupo de fêmeas à espera do manejo reprodutivo). A parte externa ao fundo dos recintos, encontrava-se a várzea com vegetação nativa da margem do rio Tietê.

Em cada recinto, na parte mais alta dos piquetes onde o solo era menos úmido havia uma área de aterro gramada de aproximadamente 100 a 200m², onde se localizava o comedouro e bebedouro dos animais. O aterro teve com o objetivo, servir de refúgio para os animais em períodos de alagamentos sazonais nos recintos ou quando havia a abertura das comportas da Usina Mário Lopes Leão localizada acima do CCCP.



Szabó., M.P.J

Figura 1 - Ambientes onde se encontravam os cervos-do-pantanal no Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal em Promissão SP

O CCCP possui uma fauna muito rica e diversa, com relatos, frequentes de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) nas proximidades dos piquetes e de outros mamíferos (cervos-do-pantanal nativos da região, *Puma yagouaroundi*, *Leopardus tigrinus*, *Dasyurus novemcinctus*, *Chrysocyon brachyurus*, *Myrmecophaga tridactyla*, *Puma concolor*). Foram ainda registrados répteis (*Salvator merianae*, *Tropiduridae*, *sucuri*, *Bothrops spp*, *Polychrus acutirostris*, *Caiman latirostris*), aves migratórias (*Cairina moschata*, *Anhima cornuta*, *Chauna torquata*, *Mycteria americana*, *Nannopterum brasilianus*) e alguns anfíbios com o *Chaunus paranaenses*.

Aves e pequenos roedores como preás (*Cavia aperea*) tinham acesso aos recintos através das malhas do alambrado. Embora não houvesse a circulação de animais domésticos nos piquetes, uma propriedade particular confrontante ao CCCP mantinha gado de corte, sendo sua divisa próxima aos recintos dos cervos-do-pantanal. Episódios de invasão dos bovinos ocorreram ocasionalmente. Posteriormente, o gado de corte da propriedade foi substituído pelo cultivo de cana de açúcar. Os equinos que existiam no centro, permaneciam em uma área distante dos recintos dos cervos-do-pantanal, entretanto eram utilizados para realização de rondas de segurança em todo o CCCP, incluindo os arredores dos piquetes dos animais.

2.2 Coleta e identificação dos carrapatos

As coletas de carrapatos foram realizadas em 26 cervos-do-pantanal durante nove anos consecutivos entre 2000 a 2008. Para as análises as coletas foram agrupadas em três períodos, cada um compreendendo três anos; 2000 a 2002 (147 coletas em 15 cervos-do-pantanal), 2003 a 2005 (30 coletas em 12 cervos-do-pantanal) e 2006 a 2008 (39 coletas em 11 cervos-do-pantanal). O número de coletas por hospedeiro individual variou no período compreendido pelo estudo e foi realizado em média cinco vezes por animal.

As coletas foram realizadas sem nenhuma forma de contenção e de acordo com a visualização de carrapatos, em sua maioria durante a alimentação dos animais. Sendo então subordinada ao temperamento do animal e aceitação da aproximação humana. Por esse motivo, animais mais agressivos (machos adultos) ou

ariscos não foram examinados. Portanto, em função da visualização e acesso mais fáceis, as coletas foram preponderantemente de carapatos adultos e da região cervical. Exames em que não se coletou carapatos não foram anotados.

Os carapatos coletados foram acondicionados em frascos em álcool 70º GL até sua identificação e processamento no Laboratório de Ixodologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia (LABIX). Ninfas e adultos dos carapatos foram identificados de acordo com chaves dicotômicas (Martins et al. 2010; Onofrio et al. 2006).

2.3 Extração de DNA e detecção molecular de Riquétsia

Para a detecção de *Rickettsia*, o DNA foi extraído de amostras de carapato usando a técnica de guanidina isotiocianato fenol de acordo com Sangioni, et al. (2005) e submetidos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Para confirmar o sucesso da extração de DNA foi realizada uma PCR para amplificação do gene mitocondrial 16S rDNA de carapatos (Mangold et al, 1998). Confirmado o sucesso da extração, cada amostra de DNA foi testada para presença de material genético de *Rickettsia* por uma sequência PCRs usando os primers CS-78 e CS-323, visando um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*), comum ao gênero *Rickettsia* (Labruna et al., 2004). Amostras que apresentaram fragmento visível do tamanho esperado, foram então testadas usando os iniciadores Rr190.70p e Rr190.701n que amplificam um fragmento do gene que codifica uma proteína de membrana externa 190-kDa (*ompA*) presentes apenas em riquétsias do GFM (Regnery et al., 1991). Amostras que produziram fragmentos de DNA visíveis para o gene *gltA*, mas não apresentaram produtos para o gene *ompA*, eram então submetidas a uma última amplificação usando iniciadores específico para um fragmento de 338 pb do gene *gltA* da *Rickettsia bellii* (Szabó et al., 2013).

Cada reação de PCR incluiu controles negativos (água ultrapura) e positivos (*Rickettsia vini* para gene *gltA* e *ompA* e *R. bellii* para gene específico da *R. bellii*).

Amostras positivas foram purificadas com o kit PureLink® (Invitrogen Life Technologies) e enviadas para sequenciamento em laboratório credenciado de acordo com protocolo do fabricante. As sequências parciais obtidas foram editadas manualmente pelo programa SeqMan Pro da Lasergene versão 15 (DNASTAR, Inc. Madison, WI, EUA) e comparadas através do programa BLASTn (Altschul et al., 1990).

2.4. Análise dos dados

Apesar da coleta de carapatos, subordinada e restringida pelo temperamento de cada cervo, ser muito subestimada, houve um padrão representativo das infestações. Consideramos a avaliação da região cervical e a coleta preponderantemente de carapatos adultos como o padrão e que permitiu uma comparação entre as infestações da mesma espécie de carapato ao longo do período de nove anos do estudo. Para esse fim os dados das infestações foram agrupados em triênios (2000-2002, 2003-2005 e 2006-2008) por espécie de carapato e a evolução das infestações dada pela comparação entre os triênios. Como os dados não apresentaram uma distribuição normal pelo teste de D'Agostino & Pearson, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn ($P < 0.05$) para comparar as medianas das infestações entre os triênios.

Para essa análise foi utilizado o software Prisma 5.0. Para as comparações das infestações entre os triênios foram também calculados parâmetros de infestação adaptados de Bush et al. (1997) da seguinte forma: 1) intensidade média de infestação por espécie de carrapato (número total de carrapatos de uma espécie/número de coletas em hospedeiros infestados com aquela espécie) e 2) prevalência de infestação (número total de coletas de carrapatos/número de coletas em hospedeiros infestados com uma espécie específica de carrapato)

A análise dos dados sobre a detecção de DNA de riquetsias em carrapatos foi descritiva.

2.5. Autorizações

A captura e manuseio de animais selvagens foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente-MMA-Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade ICMBio, Nº 36413-1. Os carrapatos e outras amostras biológicas foram coletadas como parte da rotina de manejo e avaliação sanitária dos animais dispensando a necessidade de aprovação por Comitê de Ética em Experimentação Animal.

3. Resultados

3.1. Infestações por carrapatos

Um total de 216 coletas de carrapatos foram realizadas em 26 cervos-do-pantanal ao longo dos nove anos. O número de coletas por animal variou de um a 38. No total foram coletados 1012 carrapatos de três espécies, *R. microplus*, *A. triste* e *A. sculptum* (Tabela 1). Os cervos-do-pantanal foram infestados, predominantemente, por carrapatos adultos com exceção da espécie *A. sculptum* em que o parasitismo por ninfas prevaleceu em dois dos períodos do estudo (2000-2002/2003-2005) (Tabela 1).

Tabela 1. Espécies de carrapatos de acordo com estágio e gênero coletados de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (n= 26) no Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal em Promissão- CPPP, São Paulo, em três triênios consecutivos, de 2000-2008.

| Espécies de carrapatos | 2000-2002 | | | 2003-2005 | | | 2006-2008 | | | Total |
|------------------------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|----------|------------|-----------|----------|-------------|
| | Adultos | | Ninfas | Adultos | | Ninfas | Adultos | | Ninfas | |
| | F | M | | F | M | | F | M | | |
| <i>R. microplus</i> | 176 | 3 | - | 27 | 8 | - | 264 | 46 | 4 | 528 |
| <i>A. triste</i> | 254 | 126 | 39 | 11 | 4 | 2 | 17 | 18 | - | 471 |
| <i>A. sculptum</i> | 1 | - | 5 | 1 | - | 3 | 2 | - | 1 | 13 |
| Total | 431 | 129 | 44 | 39 | 12 | 5 | 283 | 64 | 5 | 1012 |

Ao longo de nove anos a espécie mais prevalente foi o carrapato *A. triste*, encontrado em 58,8 % das coletas (Tabela 2). De forma oposta, o carrapato *A. sculptum* foi encontrado apenas ocasionalmente (4,6% das coletas) nos cervos-do-pantanal infestados. Embora encontrado em apenas 36,6% das coletas em animais infestados o maior número de carrapatos coletados foi da espécie *R. microplus* (Tabela 2).

Tabela 2. Número total de carapatos por espécie e sua prevalência em 216 coletas ao longo de nove anos de 26 cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) infestados do Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal em Promissão- CPPP, São Paulo. 2000-2008.

| Espécie de carapato | Total de carapatos | Nº de coletas com a espécie | Prevalência (%) |
|---------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------|
| <i>R. microplus</i> | 528 | 79 | 36,6 |
| <i>A. triste</i> | 471 | 127 | 58,8 |
| <i>A. sculptum</i> | 13 | 10 | 4,6 |
| Total | 1012 | 216 | --- |

*prevalência: (número de coletas em hospedeiros infestados com uma espécie específica de carapato/número total de coletas ao longo dos nove anos)*100.

Dados sobre as coletas de carapatos por triênio, prevalência de espécies, intensidade média e amplitude de infestação nos animais infestados estão apresentados na Tabela 3. O carapato *A. sculptum* foi o menos prevalente com valores sempre inferiores a 7% no período do estudo. A maior intensidade média de infestação ocorreu pelo carapato *R. microplus* no terceiro triênio.

Tabela 3. Número de coletas, hospedeiros, carapatos e prevalência, intensidade média e amplitude de infestação por espécie de carapato de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (n=26) infestados do Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal em Promissão- CPPP, São Paulo, em três triênios consecutivos, de 2000-2008.

| Espécie | Nº de carapatos | Nº de coletas (Nº hospedeiros) | Prevalência (%) | Intensidade média (amplitude) |
|---------------------|-----------------|-----------------------------------|--------------------|-------------------------------|
| 2000-2002 | | | | |
| <i>R. microplus</i> | 179 | 29 (6) | 19,7 | 6,2 (1-27) |
| <i>A. triste</i> | 419 | 116 (13) | 78,9 | 3,6 (1-61) |
| <i>A. sculptum</i> | 7 | 7 (3) | 4,8 | 1 (1-1) |
| 2003-2005 | | | | |
| <i>R. microplus</i> | 35 | 19 (6) | 63,3 | 1,8 (1-4) |
| <i>A. triste</i> | 17 | 9 (8) | 30 | 1,9 (1-5) |
| <i>A. sculptum</i> | 4 | 2 (2) | 6,7 | 2 (1-3) |
| 2006-2008 | | | | |
| <i>R. microplus</i> | 314 | 31 (8) | 79,5 | 10,1 (1-211) |
| <i>A. triste</i> | 35 | 8 (5) | 20,5 | 4,4 (1-21) |
| <i>A. sculptum</i> | 2 | 1 (1) | 2,6 | 2 (2-2) |

No período do estudo foi observado uma inversão na prevalência das duas espécies mais numerosas do primeiro para o terceiro triênio (Tabela 3 e Figura 2). No período de 2000 a 2002 houve maior prevalência do *A. triste* (78,9%) nas coletas em relação as outras espécies. No entanto, essa prevalência diminuiu para 20,5% no último triênio. De forma oposta a prevalência de *R. microplus* de 19,5% do primeiro triênio, aumentou para 79,5% no terceiro triênio.

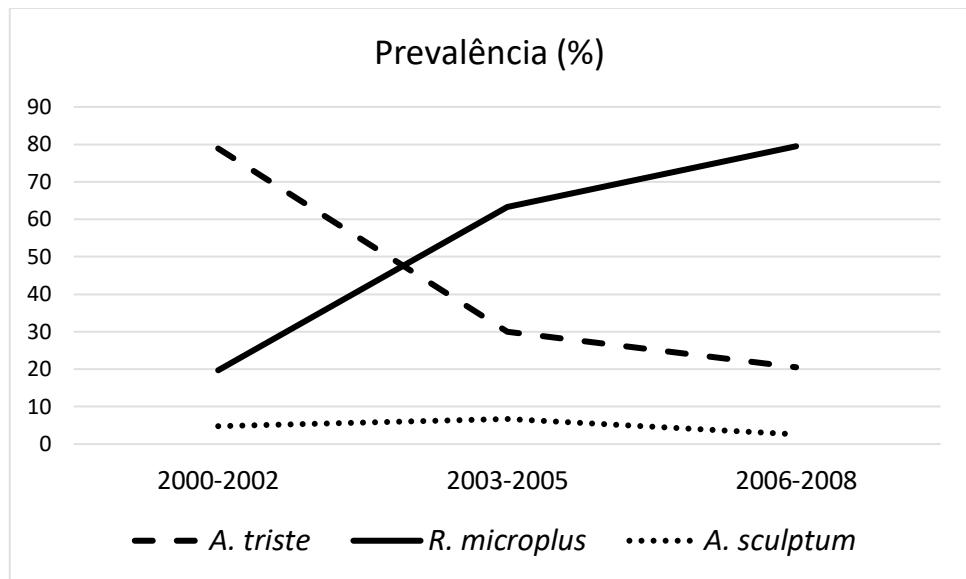


Figura 2. Prevalência de infestação por espécie de carapatos de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) infestados do Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal em Promissão- CPPP, São Paulo, em três triênios consecutivos, de 2000-2008.

Na comparação entre a intensidade das infestações por espécie de carapato ao longo do tempo observou-se que a mediana das infestações pelo carapato *A. triste* foi significativamente maior ($P<0.0001$) no primeiro triênio em relação aos outros dois triênios. De forma inversa, a mediana das infestações pelo carapato o carapato *R. microplus* foi significativamente maior ($P<0.0001$) no terceiro triênio em relação aos outros dois triênios (Figura 3).

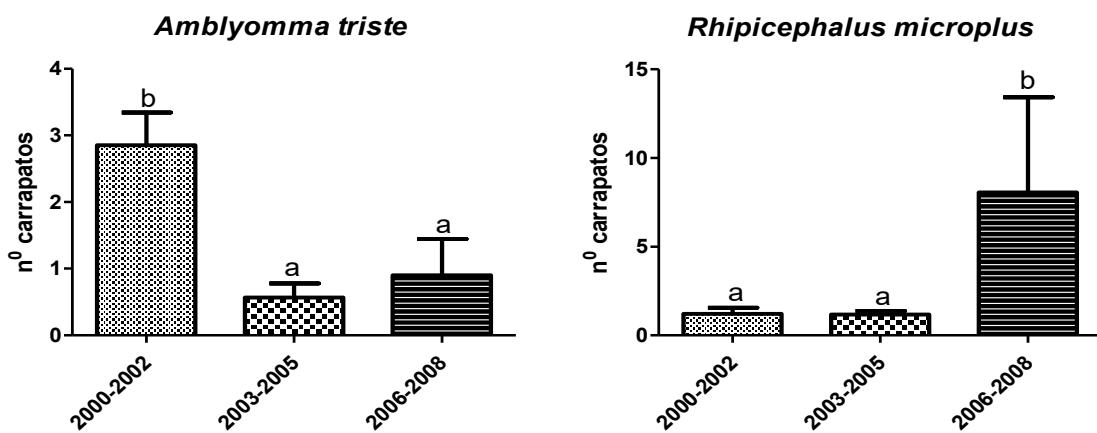


Figura 3. Média e desvio padrão da infestação por carapatos *Amblyomma triste* e *Rhipicephalus microplus* de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) infestados do Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal em Promissão- CPPP, São Paulo, em três triênios consecutivos, de 2000-2008. Letras diferentes indicam medianas significativamente diferentes ($P<0.0001$).

Em relação a prevalência mista de parasitismo nos hospedeiros, no período de 2000-2002 cinco cervos-do-pantanal foram parasitados simultaneamente por carapatos *A. sculptum* e *A. triste* e um animal foi parasitado pelos carapatos *R. microplus* e *A. triste* no terceiro triênio.

3.2. Pesquisa do DNA de *Rickettsia* sp. em carapatos

Pesquisa de DNA de *Rickettsia* sp. foi realizada em pelo menos 50% dos carapatos disponíveis por hospedeiro, levando em consideração, espécie e data de coleta, totalizando 424 carapatos dos 1012 disponíveis (42% do total). Destes 236 eram da espécie *R. microplus*, 181 *A. triste* e 7 *A. sculptum*. Para extração e PCR os carapatos foram processados individualmente ou agrupados em 276 pools de amostras contendo cada entre 2 a 16 carapatos sempre da mesma espécie, estágio e data de coleta (Tabela 5).

Em 20 amostras do DNA de carapatos de oito cervos-do-pantanal obteve-se amplificação do gene *gltA*. A maioria das amostras amplificadas foi do triênio de 2000 a 2002 (Tabela 5).

Tabela 4. Número amostras de carapatos por espécie submetidos à pesquisa molecular de *Rickettsia* sp oriundos de cervos-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) do Centro de Conservação do Cervo-do-Pantanal em Promissão- CPPP, São Paulo de 2000-2008. Número de pools entre parênteses.

| Espécies de carapatos | Período 2000-2002 | | | | Período 2003-2005 | | | | Período 2006-2008 | | | |
|-----------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| | Nº Hospedeiros Analisados | Nº Hospedeiros Positivos | Nº Amostras de carapatos analisado | Nº amostras de carapatos positivas | Nº Hospedeiros Analisados | Nº Hospedeiros Positivos | Nº Amostras de carapatos analisado | Nº amostras de carapatos positivas | Nº Hospedeiros Analisados | Nº Hospedeiros Positivos | Nº Amostras de carapatos analisado | Nº amostras de carapatos positivas |
| <i>R. microplus</i> | 06 | 02 | 79 | 02 | 07 | - | 23 | - | 08 | - | 53 | - |
| <i>A. triste</i> | 13 | 03 | 91 | 14 | 09 | 01 | 14 | 01 | 06 | 02 | 11 | 03 |
| <i>A. sculptum</i> | 02 | - | 02 | - | 01 | - | 01 | - | 01 | - | 02 | - |

Entre os oito cervídeos em que as amostras amplificaram fragmentos para o gene *ompA*, dois animais, apresentaram amostras positivas em meses e anos de coletas diferentes (2000, 2001 e ou 2002). O restante dos cervos-do-pantanal tinha um ou dois carapatos *A. triste* com DNA de *Rickettsia* spp. em apenas uma coleta.

Das 20 amostras positivas para o gene *gltA*, 18 eram de *A. triste* (taxa de infecção 9,9%) provenientes de seis cervos- do- pantanal diferentes. Nestas amostras uma sequência parcial do gene *ompA* foi também amplificada. Desses nove amostras foram sequenciadas e apresentaram homologia de 100% com *Rickettsia parkeri* sensu stricto detectado em *A. tigrinum* no bioma Pampa no Rio Grande do Sul (acesso no GenBank KX196265.1).

As duas amostras restantes eram de *R. microplus* coletados em dois cervos- do- pantanal distintos, uma coletada em janeiro de 2000 e a outra em novembro de 2001. Ambas amplificaram o gene *gltA* (taxa de infecção de 0,8%) mas não o fizeram para o gene *ompA*. As duas amostras foram sequenciadas e apresentaram 100% de identidade com *Rickettsia parkeri* isolada de *A. triste* coletado em Paulicéia, SP (acesso no GenBank EF102236.1). Nenhuma amostra foi positiva para o gene específico de *Rickettsia bellii*.

No total, 11 amostras foram sequenciadas sendo uma amostra de cada cervo e/ou amostras do mesmo animal, porém, coletadas em anos diferentes.

4. Discussão

Duarte et al. (2012), observou que a expansão agrícola, urbanização de áreas naturais e alagamentos, para construções de usinas hidrelétricas, levam a eliminação de áreas naturais e consequentemente a retração da população de cervos-do-pantanal. Em vista disso, sua criação em áreas de conservação é uma alternativa para preservação da espécie. De forma temporária ou ainda para estudos, os animais podem ser mantidos em áreas mais reduzidas que permitam manejo e reprodução, como é o caso do Centro de Conservação do Cervo do Pantanal em Promissão.

No entanto, com o deslocamento do habitat natural, o risco de mudanças ou introdução de novas relações parasita-hospedeiro deve ser considerado (Cunningham, 1996). Neste contexto é importante ponderar que o cervo-do-pantanal vive em ambientes alagados como várzeas de rios (Andriolo et al., 2013). Neste trabalho a relação entre carapatos e cervo-do-pantanal foi avaliada por nove anos em um centro de conservação em uma área de várzea ligeiramente alterada. As alterações compreendiam, a formação de piquetes que restringiam a movimentação dos animais e a presença de aterro de dimensões reduzidas, que, entretanto, foram suficientes para modificar as relações cervo-carapato. A possibilidade dessas modificações influenciarem a difusão de patógenos (*Rickettsia*) foi também estudada.

A obtenção e quantificação das amostras de carapatos foi restrita pela inviabilidade de acesso e de contenção frequentes de um animal selvagem de grande porte. A coleta, da forma realizada, foi parcial e restrita a carapatos maiores. Porém, apesar dos vieses, esta situação criou um padrão definido pela região cervical como ponto anatômico e, majoritariamente de carapatos adultos como alvos da coleta. Interessante mencionar a este respeito que o padrão adotado mundialmente para avaliação dos níveis de infestação de bovinos pelo

carrapato *R. microplus* segue padrões grosseiramente semelhantes; contagem de teleóginas entre 4,5 a 8 mm de tamanho em apenas um dos lados do animal (Campos Pereira et al., 2008). Com essa metodologia foi possível avaliar a infestação dos cervos- do- pantanal com frequência e período prolongados e, mesmo que as infestações determinadas tenham sido subdimensionadas, refletiram as variações nos níveis de infestação ao longo do tempo. As comparações das infestações foram feitas apenas por espécie e não entre espécies. A base desta atitude é o saber que as duas espécies prevalentes em cervos- do- pantanal possuem biologia distinta, sendo uma monóxena (*R. microplus*) e a outra trioxena (*A. triste*). Além disso, enquanto esta última realiza um ciclo de vida por ano (Nava et al., 2011), a primeira pode realizar vários anualmente (Campos Pereira et al., 2008). Nestas condições o carrapato *R. microplus* pode atingir infestações muito mais intensas e que impedem uma comparação numérica direta das infestações entre as duas espécies.

Observou-se no trabalho a prevalência de infestação dos cervos- do- pantanal por *R. microplus* crescente do primeiro para o terceiro triênio e de forma oposta decrescente tanto por *A. triste* como por *A. sculptum*. A intensidade média de infestação foi elevada nas três espécies de carapatos no primeiro triênio, e depois decresceram, com exceção do *R. microplus*. A intensidade de infestação média de cervos- do- pantanal por *R. microplus* no terceiro triênio foi a maior observada entre todas as infestações dos nove anos de observação.

Labruna et al. (2003) e Szabó et al., (2003) observaram que em seu ambiente natural, a várzea, o cervo-do-pantanal é o hospedeiro primário do adulto de *A. triste*. Posteriormente Szabó et al. (2007) descreveram a associação da várzea com a infestação ambiental de *A. triste*. Observações estas reforçadas por Nava et al. (2011), que também associou essa espécie de carapatos com áreas alagadiças no delta do rio Paraná, na província de Buenos Aires, Argentina.

Dessa forma a diminuição da população dessa espécie de carrapato pode ser atribuída às áreas de ambiente mais seco dos recintos dos cervos- do- pantanal em cativeiro, inadequados para a fase não parasitária do *A. triste*. Outra possibilidade é a diminuição nos recintos e no entorno, de hospedeiros para as fases imaturas do carrapato *A. triste*. Ao contrário do carrapato *R. microplus*, a espécie *A. triste* é trioxena e as larvas e ninhas se alimentam em roedores da subfamília Sigmodontinae e de cavídeos e os adultos nos cervos- do- pantanal (Nava et al., 2011). Observações anedóticas no local indicaram a diminuição da população de preás (*C. aperea*) no CCCP (L. Tonelotto, observação pessoal) considerado um importante hospedeiro para larvas e ninhas de *A. triste* (Nava et al., 2011). No entanto é importante ressaltar que, a diminuição da população de *A. triste* não foi absoluta até o final das coletas. Essa situação deve ter ocorrido pela manutenção do ciclo de vida deste carrapato nas áreas com ambiente de várzea existentes nos recintos.

Por outro lado, o incremento na prevalência e intensidade média de infestação dos animais pelo *R. microplus* ocorreu pelo ambiente mais seco e permissivo ao desenvolvimento da fase não parasitária nos piquetes. Apesar do CCCP localizar-se em uma área de preservação com áreas alagáveis, várzea, nas partes mais baixas, no intuito de facilitar o manejo dos animais, houve uma modificação importante no ambiente. A construção de um pequeno aterro com pastagem criou um microambiente seco ao longo de todo o ano para o desenvolvimento da fase não parasitária do *R. microplus*.

Além disso, há de se considerar o acesso diário dos cervos- do- pantanal ao aterro fornecendo aos carapatos hospedeiro frequentemente. Esta condição equivale a uma elevada densidade de hospedeiro para o parasita e favorece seu ciclo de desenvolvimento (Goater et al., 2014; Estrada-Peña et al., 2006). No conjunto estas alterações favoreceram o carapato bovino e são considerados os principais fatores para a infestação mais intensa e prevalente dos cervos- do- pantanal com *R. microplus* no terceiro triênio.

Situação similar ao do CCCP foi registrada em condições mais naturais por Szabó et al (2003) ao longo das margens do rio Paraná. Esses autores observaram que as populações de cervos- do- pantanal mais infestados por *R. microplus* provinham de áreas com várzea mais estreita e com inclusão de pastos de bovinos em sua área de vida.

Rhipicephalus microplus é um carapato exótico originário da Ásia tropical e subtropical introduzido no Brasil com bovinos (Barré e Uilenberg, 2010). O ciclo de vida deste carapato é monoxeno e está associado em toda sua abrangência geográfica a bovinos (Guglielmone et al., 2003). Esta espécie é frequentemente coletada de uma ampla diversidade de hospedeiros como onça pintada (*Panthera onca*), raposinha (*Lycalopex vetulus*); Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*); cão doméstico (*Canis familiaris*) mas sempre em áreas partilhadas com bovinos (Cançado et al., 2009; Campos Pereira et al., 2008; Guglielmone et al., 2003; Labruna et al., 2001; Szabó et al., 2001; 2019b). Considerando a ausência de bovinos nos piquetes e a frequência elevada de teleóginas nos cervos- do- pantanal, este trabalho demonstra de forma inequívoca que o cervo-do-pantanal, nas condições do Centro de Conservação, é capaz de manter populações do carapato *R. microplus* mesmo na ausência do hospedeiro principal.

O carapato *A. sculptum* foi aquele com a menor intensidade de infestação em todo o trabalho e cuja prevalência decresceu do primeiro período do estudo até o terceiro. Esta espécie é típica do Cerrado (Martins et al., 2016) e tem como um dos seus principais hospedeiros os equinos, utilizados no CCCP para a ronda de segurança no entorno dos recintos. Apesar de não terem acesso ao interior dos recintos dos cervos- do- pantanal, os cavalos foram as mais prováveis fontes de infestação dos cervos- do- pantanal por *A. sculptum*. Apesar de serem capazes de sobreviver em pastos, necessitam de um certo grau de sombreamento por plantas invasoras (Labruna et al., 2001). Podemos supor neste caso que os piquetes não forneceram ambiente propício e o/ou os cervos- do- pantanal não são hospedeiros adequados para um ou todos os estágios parasitários do *A. sculptum*.

Alguns fatores que não foram abordados neste trabalho podem ter influenciado as infestações. As alterações sazonais e variações interanuais do clima da região podem ter contribuído com alterações ambientais de relevância na biologia dos carapatos. A exemplo, redução de chuvas (volume e frequência) e períodos mais prolongados de seca e temperatura elevadas, podem ter contribuído para a redução da umidade do solo e diminuição da lâmina de água nos recintos dos animais.

Mesmo considerando a degradação do DNA em carapatos estocados em álcool por muitos anos a prevalência de carapatos *A. triste* com DNA da bactéria *R. parkeri* s.s. neste estudo (9,9%), foi semelhante a registrada em estudos anteriores realizados na Argentina (Nava et al., 2008), Brasil (Silveira et al., 2007), (Melo et al., 2015) e Uruguai (Pacheco et al. 2006). Nestes a taxa de infecção variou de 2,6 a $\pm 10\%$. Esta taxa parece ser relativamente constante e um dado relevante por se tratar de um microrganismo patogênico para seres

humanos. Neste sentido sabe-se que na Argentina e Uruguai carrapatos *A. triste* são responsabilizados como vetores da riquétsia e doença humana (Monje et al., 2016; Venzal et al., 2012). Situação similar é observada nos Estados Unidos com uma espécie de carrapato morfológica e geneticamente muito próxima do *A. triste*, o *Amblyomma maculatum* (Lado et al., 2018). Existem registros de *R. parkeri* em *A. maculatum* nos Estados Unidos, associados a casos humanos de riquetsiose com presença de escara de inoculação (Paddock e Goddard, 2015; Biggs et al., 2016).

Outro carrapato morfológico e geneticamente muito próxima do *A. triste*, *Amblyomma tigrinum* (Lado et al., 2018) parece ter a mesma relação com *R. parkeri* e doença humana no sul do Brasil. Em um estudo conduzido por Weck et al. (2016) foi proposto pela primeira vez, que a *R. parkeri* s.s. poderia estar associada a febre maculosa no pampa brasileiro, devido a detecção de carrapatos *A. tigrinum*, coletados no domicílio de um paciente com febre maculosa.

Contudo até o momento, não existem relatos fidedignos de picadas humanas por *A. triste* no Brasil um fato curioso, uma vez que seres humanos são sabidamente expostos a este vetor (Szabó et al., 2019b). Há de se considerar, porém, que condições não antevistas poderão alterar o comportamento deste carrapato e assim causarem infecção humana por *R. parkeri* à semelhança do Uruguai e Argentina.

Um dado interessante é o fato que mesmo isolados em piquetes e fora de seu habitat natural, cervos- do- pantanal e *A. triste* foram capazes de manter a infecção dos carrapatos por *R. parkeri* até o final do período de estudo. Neste sentido algumas hipóteses são possíveis. Por exemplo, é possível que o *A. triste* mantenha *R. parkeri* por infecção transovariana e transestacial perpetuando-se na população de carrapatos. Esta situação foi comprovada em condições laboratoriais por Nieri - Bastos et al. (2013). Estes autores observaram a manutenção da infecção por cinco gerações consecutivas a partir de carrapatos obtidos naturalmente infectados por *R. parkeri*. Outra possibilidade a ser considerar nesta situação é a infecção de carrapatos pelo processo da co-alimentação (Labuda et al., 1993) sobre cervos- do- pantanal com outros carrapatos infectados.

Neste estudo encontramos parasitismo simultâneo de *A. triste* e *R. microplus* nos cervídeos, e de dois carrapatos desta última espécie, foi possível amplificar o gene *gltA*, com identidade de 100% com *R. parkeri* s.s., mas sem amplificação do gene *ompA* característico do grupo da febre maculosa. Por se tratar de amostras estocadas no álcool 70% por até 18 anos, o DNA pode ter se degradado, não amplificando fragmentos especificamente do para o gene *ompA*. Porém é mais provável que a degradação tenha ocorrido no carrapato *R. microplus* por não ser hospedeiro e vetor da bactéria. Neste contexto, Cordeiro et al. (2018) observaram experimentalmente que o carrapato *R. microplus* não era capaz de transmitir a *R. parkeri* s.s. para cobaias. Em nosso caso a hipótese de aquisição por co-alimentação e posterior degradação do DNA de *R. parkeri* pelo carrapato *R. microplus*, pode ser aventada pela observação de uma das amostras positivas de *R. microplus* ser oriunda de um cervo que partilhava o mesmo recinto na mesma data de coleta com outro animal que forneceu um carrapato *A. triste* positivo para o gene *ompA*.

DNA bacteriano não foi amplificado em nenhuma das amostras do carrapato *A. sculptum* apesar da observação das infestações mistas com o carrapato *A. triste*. Isso poderá ter ocorrido pelo número menor de amostras testadas e pela inadequação desta espécie de artrópode como hospedeiro para a *R. parkeri* s.s. como

observado para o carapato do boi. A relação entre *A. sculptum* e *R. parkeri* é desconhecida. Recentemente Szabó et al. (2019a) relatou *A. sculptum* infectado com *R. parkeri* cepa NOD, porém o mesmo a atribui como uma infecção accidental, resultante de uma co-alimentação simultânea com *A. nodosum* em um mesmo hospedeiro. Em verdade o carapato *A. sculptum* está mais associado a transmissão de outra espécie de bactéria, *R. rickettsii* em áreas com presença de capivaras (Labruna, 2009).

Em conclusão podemos observar que mudanças no ambiente para cervo-do-pantanal podem alterar de forma significativa as infestações por carapatos e que este hospedeiro se torna susceptível ao carapato do boi, *R. microplus*. A infestação simultânea de cervos- do- pantanal com *R. microplus* e *A. triste* infectado por *R. parkeri* s.s parece ser capaz de transmitir o patógeno através da co-alimentação. Contudo o papel do *R. microplus* como vetor dessa bactéria, precisa ser melhor investigado, assim como o intercâmbio entre estas espécies de carapatos e outros microrganismos patogênicos como *Babesia*, *Anaplasma* ou ainda outras espécies de riquêtsias.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por apoio financeiro. Os autores agradecem à Companhia Energética de São Paulo -CESP, unidade gestora do CCCP à época, e a atual gestora, Tijoá Energia pelas amostras e informações.

Referências

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215, 403–410.
- Andriolo, A., Piovezan, U., Costa, M. J.R. P., Torres, H. A., Vogliotti, A., Zerbini, A.N., Duarte, J.M. B., 2013. Decline of marsh deer, *Blastocerus dichotomus* (*Cetartiodactyla*: *Cervidae*), a threatened species, caused by flooding related to a hydroelectric power plant, *Sociedade Brasileira de Zoologia*, 30(6),630–638. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-46702013005000015>
- Barré, N. and Uilenberg, G.. 2010. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick, *Revue scientifique et technique*, 29(1), 149–160.
- Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H., 2006. Carapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3) /Butantan, 223 p.
- Bermúdez, S. E., Eremeeva, M. E., Karpathy, S. E., Samudio, F., Zambrano, M. L., Zaldivar, Y., Motta, J.A., Dasch, G. A. 2009., Detection and Identification of Rickettsial Agents in Ticks from Domestic Mammals in Eastern Panama. *Journal of Medical Entomology*, 46(4), 856–861. <https://doi.org/10.1603/033.046.0417>
- Biggs, H.M., Behravesh, C.B, Bradley, K.K., Dahlgren, F.S., Drexler, N.A., Dumler, J.S,et.al.. 2016. Diagnosis and management of Tickborne Rickettsial diseases: Rocky mountain spotted fever and other spotted fever group rickettsioses, Ehrlichioses, and Anaplasmosis. *The MMWR Recommendations and Reports*, 65(3),1-44. <http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.rr6502a1>

- Bush, A. O., Lafferty, K. D., Lotz, J. M., Shostak, A. W. 2010. Parasitology Meets Ecology on Its Own Terms: Margolis et al. Revisite, 83(4), 575–583.
- Campos Pereira, m.; Labruna, M. B.; Szabó, M. P. J.; Klafke, G, M., 2008. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: biologia, controle e resistência. Medicina Veterinária, São Paulo, 169 p.
- Cançado, P. H. D., Zucco, C. A., Piranda, E. M., Faccini, J. L. H., Mourão, G. M. 2009. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) as a parasite of pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, 18 (01), 42–46 <https://doi.org/10.4322/rbpv.01801008>
- Conti-Díaz, I. A., Moraes-Filho, J., Pacheco, R. C., Labruna, M. B. 2009. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as the etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 51(6), 337–339. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652009000600005>
- Cordeiro, M. D., de Azevedo Baêta, B., Cepeda, P. B., Teixeira, R. C., Ribeiro, C. C. D. U., de Almeida Valim, J. R., Rodrigues, J., Pinter, A., Da Fonseca, A. H. (2018). Experimental infection of *Rickettsia parkeri* in the *Rhipicephalus microplus* tick. Ticks and Tick-Borne Diseases, 9(1), 93–96. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.10.003>
- Costa FB, Gerardi M, Binder LC, Benatti HR, Serpa MC, Lopes B, et al. *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infecting *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) ticks and capybaras in a Brazilian spotted fever-endemic area of Brazil. J Med Entomol. 2019 (in press). <https://doi.org/10.1093/jme/tjz141>
- Cunningham, A. A. 1996. Disease risks of wildlife translocations. Conservation Biology, 10 (2), 349–353.
- Estrada-Peña, A., Corson, M., Venzal, J.M., Mangold, A.J., Guglielmone A. 2006. Changes in climate and habitat suitability for the cattle tick *Boophilus microplus* in its southern neotropical distribution. Journal of Vector Ecology, 31(1):158–167. [https://doi.org/10.3376/1081-1710\(2006\)31](https://doi.org/10.3376/1081-1710(2006)31)
- Faccini-Martínez ÁA, de Oliveira SV, Cerutti Junior C, Labruna MB. (2018). Febre maculosa por *Rickettsia parkeri* no Brasil: Condutas de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento. J. Health Biol Sci, 6, 299-312.
- Goater, T.M., Goater, C.P., Esch, G.W. 2014. Parasitism - The Diversity and Ecology of 342 Animal Parasites, 2nd ed. Cambridge University Press, New York - USA.
- Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Keirans, J.E., Robbins, R.G. 2003. Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical zoogeographic region. Atlanta, Houten, The Netherlands, International Consortium on Ticks and Tick-Borne Diseases (ICTTD-2). 173 pp.
- Guglielmone, A.A., Beati, L., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Nava, S., Venzal, J.M., et al. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Experimental and Applied Acarology. 40(2), 83-100. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0>
- Hoogstraal, H. 1985. Argasid and nuttalliellid ticks as parasites and vectors. Advances in parasitology, 24, 135–238. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(08\)60563-1](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(08)60563-1)
- Krawczak, F, S., Agostinho, W. C., Polo, G., Moraes-Filho, J., Labruna, M.B. 2016. Comparative evaluation of *Amblyomma ovale* ticks infected and noninfected by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, the agent of an emerging rickettsiosis in Brazil. Ticks Tick Borne Diseases, 7(3), 502-507. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.007>
- Labruna, M.B., Kerber, C.E., Ferreira, F., Faccini, J.L.H., De Waal, D.T., Gennari, S.M. 2001. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. Veterinary Parasitology, 97, 51–64. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00387-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00387-9)

Labruna, M. B., De Paula, C. D., Lima, T. F., Sana, D. A. 2002. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 97(8), 1133–1136. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762002000800012>

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, *Brazilian Journal of Medical Entomology*, 41, 1073–1081. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1073>

Labruna, M.B. 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1166, 156–166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>

Labruna M B. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. In: Moreira JR, Ferraz KMPMB, Herrera EA, Macdonald DW (Eds.), *Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species* (p. 371–383). New York: Springer Science Business Media: 2013. p. 175.

Labuda, M.; Jones, L.D.; Williams, T.; Danielova, V.; Nuttall, P.A. 1993. Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks. *Journal of Medical Entomology*, 30 (1), 295–299. <https://doi.org/10.1093/jmedent/30.1.295>

Lado, P., Nava, S., Mendoza-Uribe, L., Caceres, A.G., Delgado-de la Mora, J., Licona -Enriquez, J.D., Delgado-de la Mora, D., Labruna, M.B., Durden, L.A., Allerdice, M.E., Paddock, C.D., Szabó, M.P.J., Venzal, J.M., Guglielmone, A.A., Beati, L. 2018. The *Amblyomma maculatum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) group of ticks: phenotypic plasticity or incipient speciation? *Parasit Vectors*, 11(1), 610. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3186-9>

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). *Parasitology Research*, 84: 478–484. <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs004360050433>

Martins, T.F., Barbieri, A.R., Costa, F.B., Terassini, F.A., Camargo, L.M., Peterka, C.R.l., Pacheco, R.C., Dias, R.A., Nunes, P.H., Marcili, A., Scofield, A., Campos, A.K., Horta, M.C., Guilloux, A.G., Benatti, H.R., Ramirez, D.G., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B. 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). *Parasites and Vectors*, 9(1), 186. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>

Melo, A. L. T., Alves, A. S., Nieri-Bastos, F. A., Martins, T. F., Witter, R., Pacheco, T. A., Soares, H. S., Marcili, A., Chitarra, C. S., Dutra, V., Nakazato, L., Pacheco, R. C., Labruna, M. B., Aguiar, D. M. 2015. *Rickettsia parkeri* infecting free-living *Amblyomma triste* ticks in the Brazilian Pantanal. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 6(3), 237–241. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2015.01.002>

Monje, L.D., Nava, S., Antoniazzi, L.R., Colombo, V. C., Beldomenico, P.M. 2014. In vitro isolation and infection intensity of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* ticks from the Paraná River Delta region, Argentina. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5, 924–927. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.002>

Moura-Martiniano, N.O., Machado-Ferreira, E., Cardoso, K.M., Gehrke, F.S., Amorim, M., Fogaca, A.C., Soares, C.A., Gazeta, G.S., Schumaker, T.T. 2014. *Rickettsia* and Vector Biodiversity of Spotted Fever Focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 20(3), 498–500. <https://doi.org/10.3201/eid2003.131013>

Nava, S., Elshenawy, Y., Eremeeva, M.E., Sumner, J.W., Mastropaoletti, M., Paddock, C.D. 2008. *Rickettsia parkeri* in Argentina. *Emerging Infectious Diseases journal* 14, 1894–1897. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080860>.

Nava S., Mangold, A. J., Mastropaoolo, M., Venzal, J.M., Fracassi, N., Guglielmone, A.A. 2011. Seasonal dynamics and hosts of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. Veterinary Parasitology, 181, 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.03.054>

Nieri-Bastos, F. A., Szabó, M. P. J., Pacheco, R. C., Soares, J. F., Soares, H. S., Moraes-Filho, J., Dias, R. A., Labruna, M. B. 2013. 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. <https://doi.org/10.1155/2013/402737>

Nieri-Bastos, Fernanda A., Marcili, A., de Sousa, R., Paddock, C. D., Labruna, M. B. 2018. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. Applied and Environmental Microbiology, 84(8), 1–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.02872-17>

Oliveira, S. V., Caldas, E. P., Colombo, S., Gazeta, G. S., Labruna, M. B., Santos, F. C. P., Angerami, R. N. 2016, Fatal Case of Brazilian Spotted Fever in a Non-Endemic Area in Brazil: the importance of having health professionals understanding the disease and its areas of transmission. A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 49, 653–655. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0088-2016>

Onofrio, V.C., Venzal, J.M., Pinter, A., Szabó, M.P.J. 2006. Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros. In: Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H., (Eds.), Carrapatos de importância médica veterinária da região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, pp. 29-35.

Pacheco, R. C., Venzal, J. M., Richtzenhain, L. J., Labruna, M. B. 2006. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. Emerging Infectious Diseases, 12(11), 1804–1805. <https://doi.org/10.3201/eid1211.060577>

Paddock, C.D., Sumner, J.W., Comer, J.A., Zaki, S.R., Goldsmith, C.S., Goddard, J., McLellan, S.L, Tamminga, C.L., Ohl, C.A. 2004. *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. Clinical Infectious Diseases, 38 (6), 805–811. <https://doi.org/10.1086/381894>

Paddock, C.D and Yabsley, M.J. 2007. Ecological Havoc, the Rise of White-Tailed Deer, and the Emergence of *Amblyomma americanum*, Associated Zoonoses in the United States. Current topics in microbiology and immunology, 315, 289-324. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-540-70962-6_12

Paddock, C.D., Goddard, J. 2015. The evolving medical and veterinary importance of the gulf coast tick (Acari: Ixodidae). O Journal of Medical Entomology, 52(2), 230-252. <https://doi.org/10.1093/jme/jtu022>

Parker, R.R., Kohls, G.M., Cox, G.W., Davis, G.E. 1939. Observations of an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. Public Health Reports, 54(32), 1482–1484.

Pascoal, J. de O., Siqueira, S.M. de, Maia, R. da C., Juan Szabó, M.P., Yokosawa, J. 2019. Detection and molecular characterization of Mogiana tick virus (MGTv) in *Rhipicephalus microplus* collected from cattle in a savannah area, Uberlândia, Brazil. Ticks Tick Borne Diseases 10, 162–165. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.10.002>

Pesquera, C., Portillo, A., Palomar, A. M., Oteo, J. A. 2015. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. Parasites and Vectors, 8(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0662-3>

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D. 1991. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two *Rickettsial* genes. Journal of Bacteriology, 173(5), 1576–1589. <https://doi.org/10.1128/jb.173.5.1576-1589.1991>

Rhyan, J.C., Spraker, T.R. 2010. Emergence of Diseases from wildlife reservoirs. Veterinary Pathology 47(1), 34–39. <https://doi.org/10.1177/0300985809354466>

- Romer, Y., Seijo, A.C., Crudo, F., Nicholson, W.L., Varela-Stokes, A., Lash R.R., Paddock, C.D. 2011. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. Emerging Infectious Diseases, 17(7), 1169-1173. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1707.101857>
- Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A.M., Schumaker, T.T.S., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M.B. 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. Emerging Infectious Diseases, 11, 255-270. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1102.040656>
- Sauer, J. R., McSwain, J. L., Bowman, A. S., Essenberg, R. C. 1995. Tick salivary gland physiology. Annual Review of Entomology, 40, 245-267. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.40.010195.001333>
- Silva, N., Eremeeva, M.E., Rozental, T., Ribeiro, G.S., Paddock, C.D., Ramos, E.A., Favacho, A.R., Reis, M.G., Dasch, G.A., Lemos, E.R., Ko, A.I., 2011. Eschar-associated spotted fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 17, 275-278. <https://dx.doi.org/10.3201%2Feid1702.100859>
- Silveira, I., Pacheco, R.C., Szabó, M.P., Ramos, H.G., Labruna, M.B. 2007. *Rickettsia parkeri* in Brazil. Emerging Infectious Diseases, 13, 1111-1113. <https://doi.org/10.3201/eid1307.061397>
- Sinkoc, A.L, Brum, J.G.W., Moraes, W., Crawshaw, P., 1998. Ixodidae parasitos de animais silvestres na região de Foz do Iguaçu, Brasil e Argentina. Arquivos do Instituto Biológico, 65, 29-33.
- Szabó, M.P.J., Cunha, T.M., Pinter, A., Vicentin. F. 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. Experimental and Applied Acarology, 25, 909-916. <https://doi.org/10.1023/A:1020433003028>
- Szabó, M. P. J., Labruna, M. B., Pereira, M. C. 2003. Ticks (Acari: Ixodidae) on Wild Marsh-Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil: Infestations Before and After Habitat Loss. Journal of Medical Entomology, 40(3), 268-274. <https://doi.org/10.1093/jmedent/40.3.268>
- Szabó, M.P.J., Castro, M.B., Ramos, H.G., Garcia, M.V., Castagnolli, K.C., Pinter, A., Veronez, V.A., Magalhães, G.M., Duarte, J.M., Labruna, M.B., 2007. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. Veterinary Parasitology, 143(2), 147-154. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.08.009>
- Szabó, M.P.J., Martins, T.F., Mar Barbieri, A.R., Costa, F.B., Soares, H.S., Tolesano-Pascoli, G.V., Torga, K., Saraiva, D.G., Do Nascimento, V.R., Osava, C.F., Castro, M.B., Labruna, M.B. 2019a. Ticks biting humans in the Brazilian savannah: attachment sites and exposure risk in relation to species, life stage and season. Ticks and Tick-borne Diseases, 8, 101328 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101328>
- Szabó, M.P.J., Pascoal, J.O., Martins, M.M., Ramos, V.D.N., Osava, C.F., Santos, A.L.Q., Yokosawa, J., Rezende, L.M., Tolesano-Pascoli, G.V., Torga, K., de Castro, M.B., Suzin, A., Barbieri, A.R.M., Werther, K., Silva, J.M.M., Labruna, M.B., 2019b. Ticks and *Rickettsia* on anteaters from Southeast and Central-West Brazil. Ticks Tick Borne Diseases, 10, 540-545. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.01.008>
- Tatchell, R.J. 1987. Interaction between ticks and their hosts. International Journal of Parasitology, 17(2), 597-605. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(87\)90136-6](https://doi.org/10.1016/0020-7519(87)90136-6)
- Venzal J.M., Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Cabrera, P.A., Castro, O. 2003. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasitising humans in Uruguay. Annals of Tropical Medicine Parasitology, 97, 769-72. <https://doi.org/10.1179/000349803225002327>
- Venzal, J.M., Estrada Peña, A., Portillo, A., Mangold, A.J., Castro, O., Souza, C.G., Félix, M.L., Pérez-Martínez, L., Santibáñez, S., Oteo, J.A. 2012. *Rickettsia parkeri*: a rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for Spotted Fever rickettsiosis in southern Uruguay. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 54(3), 131-134. <http://dx.doi.org/10.1590/S0036-46652012000300003>

Weck, B., Dall'Agnol, B., Souza, U., Webster, A., Stenzel, B., Klafke, G., Martins, J.R., Reck, J. 2016. Spotted fever group *Rickettsia* in the Pampa Biome, Brazil, 2015-2016. Emerging Infectious Diseases, 22(11), 2014-2016. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2211.160859>

Zeimes, C. B., Olsson, G.E., Hjertqvist, M., Vanwambeke, S. O. 2014. Shaping zoonosis risk: landscape ecology vs. landscape attractiveness for people, the case of tick-borne encephalitis in Sweden. Parasites and vectors, 7(1), 370. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-370>.

Capítulo III

**Pesquisa de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica no Parque Nacional do Iguaçu
e em áreas adjacentes em Foz de Iguaçu-Paraná.**

Pesquisa de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica no Parque Nacional do Iguaçu e em áreas adjacentes em Foz do Iguaçu-Paraná.

Lais Miguel Rezende^{a,*}; Amalia Regina Mar Barbieri^b, Adriane Suzin^a; Alexandre Vogliotti^c, Pablo Henrique Nunes^c; Matheus Henrique Tognolli^d; Marcelo Bahia Labruna^b; Matias Pablo Juan Szabó^a

^a- Laboratório de Ixodologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720/Campus Umuarama-Bloco 2T, CEP 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

^b- Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, CEP 05508-270, Brasil

^c-Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA), Foz do Iguaçu, Paraná, 85866-970, Brasil.

^d-Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Campus do PICI, Bloco 209. Av. Humberto Monte s/n, 60455-760, Fortaleza, CE, Brasil.

*Corresponding author: laismr16@yahoo.com.br

Resumo: A *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (RPMA) é uma bactéria associada a fragmentos do bioma Mata Atlântica, responsável por uma doença febril não letal, caracterizada por uma escara de inoculação no local da picada, e linfadenopatia. A epidemiologia desta riquetsia está intimamente conectada ao *Amblyomma ovale* e cães. O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) é o maior remanescente florestal de Mata Atlântica de interior do Brasil, mantendo seu *status* de conservação, com pouca interferência humana. A saber, nenhuma pesquisa por riquetsias em carapatos foi conduzido neste local. Portanto o objetivo deste trabalho foi pesquisar e determinar taxas de infecção de riquetsias em especial a RPMA, em carapatos *A. ovale* do PNI, fragmentos florestais urbanos próximos e de cães com acesso aos mesmos. Além disso, bem como comparar os resultados com aqueles obtidos em trabalhos realizados em áreas de Mata Atlântica costeira. Amostras de DNA dos carapatos coletados foram testadas para presença de material genético de *Rickettsia* por uma sequência de reações em cadeia pela polimerase (PCR). Foram processados 180 pools de carapatos destes, 62 (34,4%) foram positivos para *Rickettsia bellii* e não houve amplificação para o gene *ompA* de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa. Em cinco anos de coleta e pesquisa não se detectou nenhuma amostra de RPMA, o que difere das taxas de infecção encontradas em *A. ovale* coletados em Mata Atlântica costeira no Brasil. Uma explicação para esse resultado, seria a ocorrência de uma interferência riquetsial em que as elevadas taxas de infecção por *R. bellii* na população de *A. ovale* estariam impedindo a transmissão transovariana de RPMA o que explicaria a relação inversa observada no PNI e fragmentos. Em conclusão, presumimos que a exposição de seres humanos a RPMA transmitida pelo carapato *A. ovale* nas área de Mata Atlântica dentro do PNI e em fragmentos urbanos adjacentes pode ser minimizada pela alta taxa de infecção encontrada por *R. bellii*.

Palavras chaves: *Amblyomma ovale*; Cães; *Rickettsia bellii*; *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica.

Abstract: *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest (RPMA) is a bacterium associated with fragments of the Atlantic forest biome, responsible for a non-lethal febrile disease, characterized by an inoculation eschar at the site of the bite, and lymphadenopathy. The epidemiology of this rickettsia is closely linked to *Amblyomma ovale* and dogs. The Iguaçu National Park (PNI) is the largest forest remnant of the Atlantic Forest in the interior of Brazil, maintaining its conservation status, with little human interference. Namely, no research for tick rickettsiae has been conducted at this location. Therefore, the aim of this work was to research and determine infection rates of rickettsiae, especially RPMA, in *A. ovale* ticks from the PNI, nearby urban forest fragments and from dogs with access to them. In addition, as well as comparing the results with those obtained in works carried out in coastal Atlantic Forest areas. DNA samples from the collected ticks were tested for the presence of *Rickettsia* genetic material by a sequence of polymerase chain reactions (PCR). 180 tick pools of these were

processed, 62 (34.4%) were positive for *Rickettsia bellii* and there was no amplification for the *Rickettsia ompA* gene of the spotted fever group. In five years of collection and research, no RPMA sample was detected, which differs from the infection rates found in *A. ovale* collected in coastal Atlantic Forest in Brazil. One explanation for this result would be the occurrence of rickettsial interference in which the high rates of infection by *R. bellii* in the population of *A. ovale* would be preventing the transovarian transmission of RPMA, which would explain the inverse relationship observed in the PNI and fragments. In conclusion, we assume that the exposure of humans to RPMA transmitted by the *A. ovale* tick in the Atlantic Forest areas within the PNI and in adjacent urban fragments can be minimized by the high infection rate found by *R. bellii*.

Key words: *Amblyomma ovale*; Dogs; *Rickettsia bellii*; *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica

1. Introdução

As riquetsioses são doenças infecciosas causadas por bactérias intracelulares do gênero *Rickettsia*. Muitas são zoonoses transmitidas por carapatos, possuem ampla distribuição geográfica e representam um potencial risco a saúde humana (Parola et al., 2013).

Tradicionalmente, as espécies de *Rickettsia* são classificadas em dois grupos principais: o grupo tifo (GT) e o grupo da febre maculosa (GFM), além de duas espécies genética e antigeneticamente distintas desses grupos a *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* (Fournier and Raoult, 2009; Parola et al., 2013).

O GFM é o de maior relevância para saúde pública no Brasil, com duas espécies desse grupo, *Rickettsia rickettsii* e a *Rickettsia parkeri*, consideradas agentes de doença infecciosa para os seres humanos (Oliveira et al., 2016).

Segundo Nieri-Bastos e colaboradores (2018) no Brasil a *R. parkeri* é representada por três clados, sendo a *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (RPMA) um destes. Esta riquetsia foi descoberta no país em 2009, e está associada a fragmentos do bioma Mata Atlântica, com quatro casos confirmados em laboratório através de técnicas moleculares, um no estado de São Paulo (Spolidorio et al., 2010), dois na Bahia (Silva et al., 2011; Sevá et al., 2019) e outro em Santa Catarina (Krawczak, 2016).

A infecção por RPMA causa uma doença febril não letal, com sintomas clínicos mais brandos quando comparados com aqueles causados pela *R. rickettsii*, incluindo uma escara de inoculação no local da picada e linfadenopatia (Angerami et al., 2009; Faccini-Martínez et al., 2020).

O diagnóstico sorológico padrão do Ministério da Saúde, não distingue riquetsioses por espécie de agente infectante e sintomatologia. Contudo, doença com epidemiologia e características clínicas da RPMA foi observada em dezenas de casos em Santa Catarina (Angerami et al., 2009). Portanto, considerando essa sintomatologia, mais branda, é possível supor um número muito maior de infecções por RPMA entre as doenças febris em áreas de Mata Atlântica no Brasil.

Outra característica importante da RPMA é a sua associação com o carapato *Amblyomma ovale* e cães (Szabó et al., 2013a). O DNA da RPMA através de pesquisas moleculares é recorrentemente encontrado nesta espécie de carapato, mas, não em outras, sendo isolada unicamente em carapatos deste espécime.

Cães com acesso à Mata Atlântica ao longo das costa brasileira são frequentemente infestados com carrapatos *A. ovale* infectados com RPMA e desenvolvem elevados títulos de anticorpos contra a riquetsia, finalmente os quatro casos confirmados da doença no Brasil estão associados a este contexto epidemiológico descrito (Spolidorio et al., 2010; Silva et al., 2011; Szabó et al., 2013b; Barbieri et al., 2014; Krawczak et al., 2016; Luz et al., 2016; Moerbeck et al., 2016; Oliveira et al., 2019; Sabatini et al., 2019; Sevá et al., 2019; Faccini-Martinez et al., 2020).

O *A. ovale* é um carrapato de três hospedeiros; os estágios imaturos parasitam pequenos roedores e aves e os adultos se alimentam em carnívoros (Guglielmone et al., 2014). Cães com acesso à Mata Atlântica são hospedeiros alternativos aos carnívoros selvagens e carreiam carrapatos aos domicílios elevando a probabilidade de contato entre humanos, carrapatos e RPMA (Szabó et al., 2013a; 2013b). A situação assim descrita é considerada a retaguarda epidemiológica da RPMA (Szabó et al., 2013a; 2013b).

Embora pesquisa por RPMA em carrapatos da espécie *A. ovale* tenha sido conduzida na Mata Atlântica ao longo de toda a costa brasileira, o mesmo não ocorreu em Mata Atlântica do interior. O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) possui o maior remanescente florestal de Mata Atlântica da região Sul e do interior do Brasil. Com um perímetro de 420 km, cercado em sua maioria por fazendas e áreas de monoculturas, o PNI se estendendo por 14 municípios, abriga uma elevada diversidade de carrapatos incluindo os da espécie *A. ovale* (Suzin et al., 2020).

Entretanto, apesar da grande biodiversidade de animais vertebrados e de ixodídeos, nenhuma pesquisa sistemática por riquetsias em carrapatos foi conduzida nesta região. Em função dos expostos, este trabalho teve por objetivo coletar carrapatos da espécie *A. ovale* do PNI e fragmentos florestais urbanos em Foz do Iguaçu, tanto do ambiente como de cães com acesso aos mesmos e pesquisar nestes riquetsias em especial a RPMA. Foi ainda objetivo determinar as taxas de infecção por riquetsias em carrapatos e comparar estas taxas entre os locais de coleta e entre carrapatos do ambiente e com aqueles coletados em cães.

2. Material e Métodos

2.1 Local da coleta

Este estudo foi realizado no Parque Nacional do Iguaçu - PNI (25° 05' a 25° 41'S; 53° 40' a 54° 38'W) e em fragmentos florestais espalhados na cidade de Foz do Iguaçu de maio de 2015 a janeiro de 2020. O parque fica no sudeste do Estado do Paraná, no sul do Brasil, e faz uma tríplice fronteira Argentina-Brasil-Paraguai. Possui o maior remanescente da floresta atlântica do sul do Brasil (Ribeiro et al., 2009), com uma área de 185.262,5 ha e um perímetro de 420 km em 14 municípios.

O parque é coberto por Mata Atlântica semi-decídua e Floresta de Araucária. O clima é temperado úmido, com precipitação anual de 1.800 mm (Di Bitteti et al., 2003; Alvares et al., 2013). A umidade relativa do ar está acima de 60% e a temperatura média anual da região é de 20,7 ° C (Maack, 2012).

O PNI possui uma fauna muito diversificada, incluindo mamíferos de médio a grande porte, como onça-pintada, anta, quati, veado, cutia e queixada, entre outras espécies (Suzin et al. 2020).

2.2 Amostragem de carrapatos *Amblyomma ovale*

As coletas foram realizadas visando carrapatos *Amblyomma ovale*, vetor da *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica e parasitas comuns de cães que têm acesso às florestas tropicais do Atlântico (Szabó et al., 2013a).

Ambiente: Os carrapatos de vida livre foram coletados no Parque Nacional do Iguaçu através de duas técnicas em sete trilhas utilizadas por animais silvestres dentro da floresta as quais compreendiam 3.375 m. Cinco destas trilhas ficavam no município de Foz do Iguaçu (total de 1.575 m) e duas no município de Céu Azul (total de 1.800 m) os quais ficavam aproximadamente 90 km um do outro.

Os dois lados de cada trilha eram amostrados através de busca visual e do arraste de flanela. Espécimes adicionais de carrapatos foram obtidos no PNI casualmente durante os trabalhos de campo, os quais foram analisados em outras pesquisas. A busca visual consistiu em inspecionar visualmente a vegetação, sobretudo as folhas voltadas para as trilhas (Silva et al., 2008; Szabó et al., 2009; Ramos et al., 2014).

Imediatamente após a busca visual empregou-se o arraste de flanela, que consiste em arrastar uma flanela clara (2 m de comprimento x 1 m de largura) ao longo das trilhas. Para evitar a perda de espécimes, a flanela foi vistoriada a cada quinze metros.

Além disso, amostras foram coletadas fora dos limites do PNI em cinco fragmentos florestais urbanos do município de Foz do Iguaçu com metodologia similar. O arraste era realizado em um km de extensão, da borda de cada fragmento em direção ao o interior da mata.

Os fragmentos possuem área média de 31,3 hectares (min. 3,3 ha – máx. 99 ha) e distam em média 9,2 km do PNI (min. 8 km - max. 10 km).

Cães domésticos: Carrapatos de cães em propriedades vizinhas e com acesso tanto aos fragmentos florestais urbanos como ao PNI foram coletados. No caso do PNI as coletas se estenderam ao longo de dois terços do contorno da reserva abrangendo diversos municípios até a cidade de Lindoeste, em uma extensão aproximada de 150 km de coleta (Figura 1).



Figura 1. Imagem aérea do Parque Nacional do Iguaçu, Paraná (área verde escura), a extensão de amostragem de cães nas propriedades do entorno (linha vermelha) e fronteira com Argentina e Paraguai (linha amarela). Imagem Google Earth.

Animais selvagens: os carapatos de animais selvagens foram coletados fortuitamente de animais mortos na estrada ou capturados para outros estudos sobre ecologia de carapatos que serão detalhados em outras pesquisas.

Um carapato também foi coletado fortuitamente, em um humano.

Após a coleta, os carapatos foram acondicionados em frascos e conservados em álcool 70°. Todos os recipientes foram identificados com o local, data e origem (hospedeiro) e levados ao laboratório para identificação e pesquisa de infecção por *Rickettsia*.

2.3 Identificação dos carapatos

Os carapatos *A. ovale* foram identificados com o auxílio de lupa e esteromicroscópio, usando chaves taxonômicas (Martins et al., 2016; Onofrio et al., 2006) no Laboratório de Ixodologia da UFU.

2.4 Extração de DNA e detecção de Riquétsia

Para a detecção de *Rickettsia*, o DNA foi extraído de amostras de carapatos usando a técnica de guanidina isotiocianato fenol de acordo com (Sangioni et al., 2005).

Os carapatos adultos e ninfas foram processadas individualmente ou em *pools* de 02 a 04 carapatos. Cada *pool* foi constituído por carapatos do mesmo local, da mesma data de coleta ou de um único hospedeiro. Após essa etapa, cada amostra de DNA foi testada para presença de material genético de *Rickettsia* por uma

sequência de reações em cadeia pela polimerase (PCR). Inicialmente o sucesso da extração de DNA foi avaliada por uma PCR para gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos (Mangold et al., 1998).

Posteriormente todas as amostras positivas para o gene 16S rDNA, foram testadas usando os primers CS-78 e CS-323, que amplificam um fragmento do gene citrato sintase (*gltA*), comum ao gênero *Rickettsia* (Labruna et al., 2004).

Amostras positivas para esse gene, eram então testadas usando os iniciadores Rr190.70p e Rr190.701n que amplificam um fragmento do gene *ompA*, que codifica uma proteína de membrana externa de 190-kDa, presente apenas em riquétsias do GFM (Regnery et al., 1991). Amostras que amplificaram o gene *gltA* e não amplificaram fragmentos presentes no GFM, foram testadas, usando primers específico para um fragmento de 338 pb do gene *gltA* da *R. bellii* (Szabó et al., 2013a).

Cada reação de PCR incluiu controles negativos (água ultrapura) e positivos (*R. vini* para gene *gltA* e *ompA* e *R. bellii* para gene específico da *R. bellii*).

Amostras positivas foram purificadas com o kit PureLink® (Invitrogen Life Technologies) e enviadas para sequenciamento em laboratório credenciado para posterior comparação das sequências através do programa BLAST para inferir as semelhanças mais próximas disponíveis no GenBank (Altschul et al., 1990).

2.5 Aspectos éticos

A coleta de carrapatos de cães e animais silvestres foi aprovada pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (protocolo 033/14 e 158/16). A autorização para amostragem de carrapatos dentro do parque foi concedida pelo Ministério do Meio Ambiente do Brasil (licença SISBIO nº 48141-5).

3. Resultados

Somando todas as coletas de ambiente, cães, animais selvagens e de um humano (coleta fortuita) foram obtidos 195 carrapatos da espécie *A. ovale*. Essas amostras foram processadas em 180 pools (Tabela 01). Destes, em 62 pools (34,4%) foram identificados o DNA da bactéria *Rickettsia bellii* por PCR ou sequenciamento do gene citrato sintase (*gltA*) específico.

Neste último caso observou-se em três amostras (três fêmeas do carrapato *A. ovale*) uma homologia de 100% com sequencias do DNA de *R. bellii* de amostras do Brasil (strain Peruibe e Pontal, acessos GenBank JQ906786 e EU567181, respectivamente). As reações para o gene *ompA* de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa não resultaram em produto, assim como não houve amplificação de DNA de carrapatos originários de animais selvagens ou humano (Tabela 1).

Tabela 01. Total de carapatos coletados, de amostras (*pools*) processadas e de amostras com DNA de *Rickettsia bellii* em carapatos *Amblyomma ovale* do ambiente, cães, animais selvagens ou humano no Parque Nacional do Iguaçu e entorno, Paraná 2015-2020.

| Origem da amostra | Total de carapatos coletados | Total de <i>pools</i> para pesquisa de riquetsia | Pools com DNA de <i>R. bellii</i> (%) |
|-------------------|------------------------------|--|---------------------------------------|
| Ambiente | 129 | 114 | 45 (39,5) |
| Cães domésticos | 57 | 57 | 17 (29,8) |
| Animais selvagens | 8 | 8 | 0 |
| Humanos | 1 | 1 | 0 |
| Total | 195 | 180 | 62 (34,4) |

Carapatos do ambiente

Dos 129 carapatos coletados no ambiente 116 eram adultos e apenas 13 eram ninfas. Oito destas ninfas, e nenhum adulto, foram coletados de fragmentos florestais urbanos (Tabela 2). A taxa de infecção por *R. bellii* no interior do PNI foi semelhante nos dois municípios, Foz do Iguaçu e Céu Azul. Metade das ninfas dos fragmentos florestais também continha DNA desta riquetsia (Tabela 02).

Tabela 02. Total de amostras (*pools*) do carapato *Amblyomma ovale* coletadas do ambiente e testados para pesquisa de *Rickettsia* e de amostras com DNA de *Rickettsia bellii*, de acordo com a origem no Parque Nacional do Iguaçu e entorno - Paraná, 2015-2020.

| Número de amostras (<i>pools</i>) | Parque Nacional do Iguaçu | | | | | | Fragmnetos | |
|-------------------------------------|---------------------------|--------|--------------|--------|----------|-------------|------------|--|
| | Foz do Iguaçu | | Céu Azul | | Avulsos | | | |
| | adultos | ninfas | adultos | ninfas | adultos | ninfas | | |
| Testados | 38 | 4 | 56 | 2 | 8 | 6 | | |
| Infectados | 18 | 0 | 24 | 0 | 0 | 3 | | |
| Total infectados | 42,9% | | 41,4% | | 0 | 50 % | | |

Carapatos de animais

Amostras de cães totalizaram 57 carapatos *A. ovale* (56 adultos e uma ninfa) coletados de 24 animais. Foram ainda avaliados sete adultos e uma ninfa de carapatos provenientes de cinco animais selvagens de quatro espécies, um quati (*Nasua nasua*), dois cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*), um mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) e um pequeno roedor (*Akodon* sp.) (Tabela 3). Os carapatos dos animais foram todos processados individualmente e DNA de *R. bellii* foi detectado em 17 carapatos adultos (taxa de infecção de 29,8%) provenientes seis cães (25% dos cães). Merece menção a coleta de 14 carapatos de um único animal em Céu Azul dos quais 11 (78,6%) apresentaram DNA de *R. bellii*. Não houve amplificação de produto nos carapatos de animais selvagens (Tabela 3).

Tabela 03. Total de carapatos coletados de cães, animais selvagens e humano no Parque Nacional do Iguaçu e entorno, Paraná, 2015-2020.

| Hospedeiros (nº animais analisados) | Adultos | Ninfas | Nº Total de carapatos coletados | Taxa de infecção por <i>R. bellii</i> (%) |
|--|---------|--------|---------------------------------------|--|
| <i>Canis lupus familiaris</i> (24) | 56 | 01 | 57 | 17 (29,8%) |
| <i>Cerdcoyon thous</i> (2) | 05 | - | 05 | 0 |
| Animais selvagens | 01 | - | 01 | 0 |
| <i>Nasua nasua</i> (1) | 01 | - | 01 | 0 |
| <i>Procyon cancrivorus</i> (1) | 01 | - | 01 | 0 |
| <i>Akodon</i> sp (1) | - | 01 | 01 | 0 |

Na comparação das taxas mínimas de infecção dos carapatos *A. ovale* com a bactéria *R. bellii* (quantidade de pools de carapato com amplificação do DNA da bactéria em relação ao número total de pools avaliados) observou-se uma faixa de valores entre 20 e 50% se considerados os locais de origem das amostras ambientais, carapatos de cães, gênero e estágio dos carrapatos adultos (Figura 2). Se constituíram em exceção à regra os carapatos de animais selvagens e humanos, não infectados.

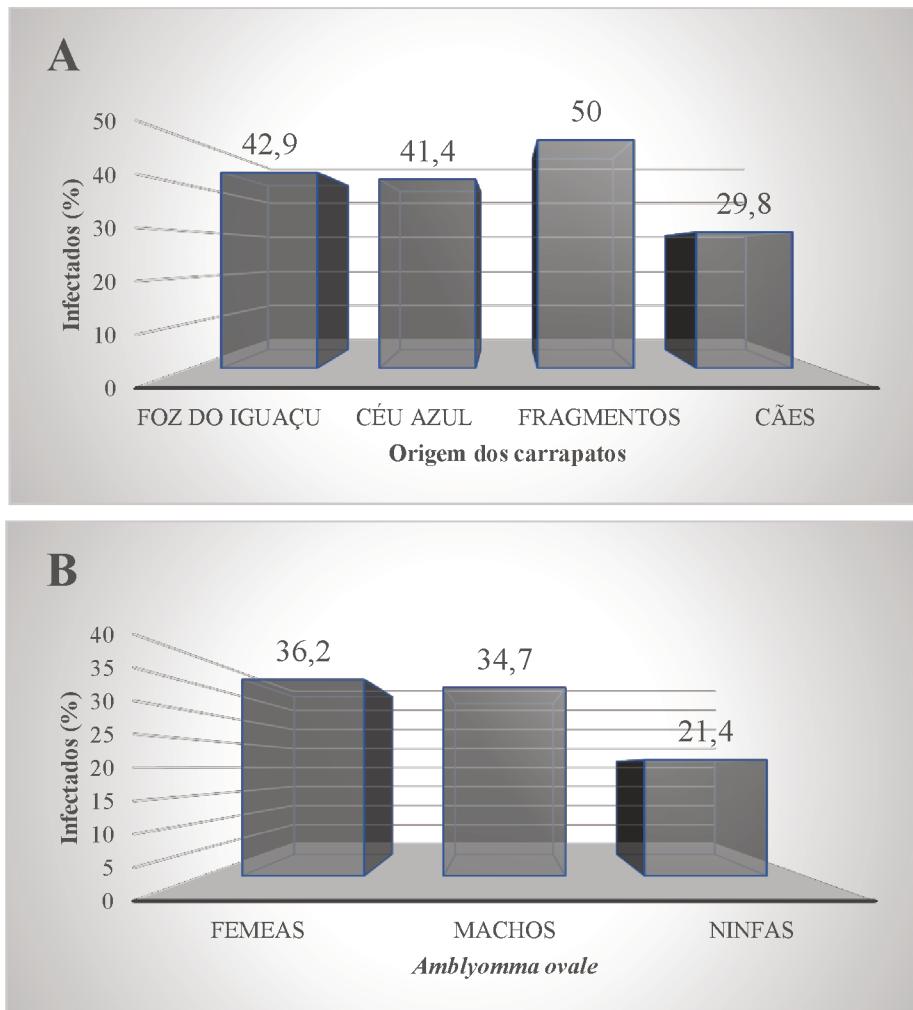


Figura 02. Taxa mínima de infecção por *R. bellii* em amostras (pools): A - do ambiente e de cães e B – de acordo com gênero dos adultos e estágios dos carrapatos no Parque Nacional do Iguaçu e entorno, Paraná 2015-2020.

Considerando a elevada taxa de infecção pela bactéria *R. bellii* em carrapatos *A. ovale* em nosso estudo acoplado à ausência do DNA da RPMA assim como a frequente relação inversa entre as taxas de infecção de carrapatos *A. ovale* por estas riquétsias na literatura, investigou-se uma possível relação entre estas infecções em estudos realizados em populações do carrapato nas Américas. Para esse fim buscou-se na literatura dados sobre taxas de infecção que tenham utilizado no mínimo 10 carrapatos e pesquisado as duas espécies de riquétsia (Tabela 4). As respectivas taxas de infecção foram extraídas ou ainda calculadas a partir dos dados disponíveis nos artigos. Aplicou-se o teste de correlação de Spearman ($P < 0.05$) e observou-se uma correlação negativa moderada entre as duas taxas de infecção ($rs=-0.5195$; $n=20$; $P=0.0188$)

Tabela 04. Origem geográfica e taxas mínimas de infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (RPMA) ou *Rickettsia bellii* de carrapatos *Amblyomma ovale* coletados do ambiente e animais.

| Fonte | Abrangência geográfica das amostras | Estado ou País | Carapatos Testados | Infectados com <i>R. bellii</i> (%) | Infectados com RPMA (%) |
|-------------------------------|-------------------------------------|----------------|--------------------|-------------------------------------|-------------------------|
| Barbieri et al., 2014 | Blumenau | SC | 77 | 0 | 6 (7,8) |
| Bitencourt et al., 2019 | Maciço de Baturité | CE | 58 | 8 (13,8) | 10 (17,2) |
| Bitencourt et al., 2019 | Sul e Sudeste | RJ, PR, RS, SC | 88 | 0 | 9 (9,1) |
| Costa et al., 2017 | Maranhão | MA | 44 | 3 (6,8) | 0 |
| Faccini-Martínez et al., 2020 | Espírito Santo | ES | 144 | 0 | 1 (0,7) |
| Krawczak et al., 2016 | Cerro Largo | RS | 38 | 0 | 4 (10,5) |
| Labruna et al., 2004 | Monte Negro | RO | 78 | 20 (25,6) | 0 |
| Labruna et al., 2004 | Governador Jorge Teixeira | RO | 43 | 14 (32,6) | 0 |
| Lamattina et al., 2018 | Misiones | Argentina | 100 | 24 (24) | 1 (1,0) |
| Londono et al., 2014 | Antioquia e Córdoba | Colômbia | 115 | 1 (0,9) | 8 (6,1) |
| Luz et al., 2016 | Ubatuba | SP | 79 | 0 | 8 (10,1) |
| Medeiros et al., 2011 | Santa Catarina | SC | 82 | 0 | 3 (3,7) |
| Melo et al., 2016 | Poconé | MT | 13 | 0 | 2 (15,4) |
| Moerbeck et al., 2016 | Maciço Baturité | CE | 114 | 1 (0,9) | 5 (4,4) |
| Oliveira et al., 2019 | Ilhéus | BA | 27 | 0 | 4 (14,8) |

| | | | | | |
|-----------------------------|---------------------------------|-----------|-----|-----------|-----------|
| Sabatini et al., 2010 | Parque Estadual da Serra do Mar | SP | 93 | 1 (1,1) | 11 (11,8) |
| Sánchez-Montes et al., 2019 | Vera Cruz | México | 22 | 0 | 6 (27,3) |
| Szabó et al., 2013 | Peruíbe | SP | 250 | 4 (1,6) | 31 (12,4) |
| Vogel et al., 2018 | Reserva Bosawás | Nicarágua | 127 | 0 | 18 (14,2) |
| Este trabalho | Parque Nacional do Iguáçu | PR | 180 | 62 (34,4) | 0 |

4. Discussão

O objetivo maior deste trabalho foi pesquisar e determinar as taxas de infecção por RPMA em carapatos da espécie *A. ovale* do PNI, fragmentos florestais urbanos em Foz do Iguaçu, e de cães com acesso a estes locais. Entretanto, em cinco anos de coleta e pesquisa em 180 pools constituídos a partir de 195 carapatos não se detectou nenhuma amostra de RPMA. Esse número indica que, se ocorrer a RPMA na região abrangida, a taxa de infecção na população de carapatos *A. ovale* é inferior a 0,5% e, portanto, um número maior de carapatos teria que ser examinado para se obter uma amostra infectada. Consoante com essa observação, Lamattina et al. (2018) observaram na Mata Atlântica da província de Misiones, Argentina e contígua ao PNI uma única amostra coletada em um *Nasua nasua* (um pool com dois adultos de *A. ovale*) com RPMA em 177 carapatos examinados (taxa de infecção mínima e máxima de 0,6% e 1,1%, respectivamente).

Em contrapartida, taxas de infecção por RPMA no *A. ovale* em outras áreas, predominantemente da Mata Atlântica costeira do Brasil, são em geral mais elevadas, variando entre 0,7% a 15,4% (média e mediana de 8,6 e 8,9%, respectivamente), levando em consideração pesquisas em que mais de 10 carapatos foram testados (Barbieri et. al., 2014; Faccini-Martínez et al., 2020; Fournier et al., 2020; Krawczak et al., 2016; Luz et al., 2016; Medeiros et al., 2011; Melo et al., 2016; Moerbeck et al., 2016; Nieri-Bastos et al., 2016; Oliveira et al., 2019; Sabatini et al., 2019; Szabó et al., 2013).

Em outros países americanos, mais especificamente Colômbia, Belize, Nicarágua e México também foram detectados taxas de infecção por RPMA em *A. ovale* de, respectivamente, 6,1, 3,0, 14,3 e 27,3% (Londono et al., 2014; Lopes et al., 2016; Vogel et al., 2018) correção da espécie de riquetsia por Krawczak et al., 2018^a; Sánchez-Montes et al., 2019).

Por outro lado, em nosso trabalho foi detectada elevada taxa de infecção dos carapatos *A. ovale* com a bactéria *Rickettsia bellii*. Esta espécie de riquetsia ocupa uma posição basal em todos os estudos filogenéticos indicando uma divergência precoce no gênero *Rickettsia* durante a evolução (Krawczak et al., 2018b). *Rickettsia bellii* é considerada a riquetsia com a mais ampla distribuição em carapatos tendo sido relatada em pelo menos 25 espécies de cinco gêneros nas Américas (Ogrzewalska e Pinter, 2016; Costa et al., 2017b; Krawczak et al., 2018b).

Essa ampla difusão e as frequentes altas taxas de infecção com *R. bellii* em populações de carapato ocorrem pela sua transmissão transovariana e perpetuação transestadal no vetor sem a necessidade de infecção

de hospedeiro vertebrado (Horta et al., 2006; Sakai et al., 2014; Krawczak et al., 2018b). De fato, considerando sua transmissão horizontal e associação de genótipos específicos dessa riquetsia com diferentes espécies de carrapatos, a bactéria *R. bellii* pode ser considerado um endosimbionte do artrópode (Krawczak et al., 2018b).

Embora possa haver soro conversão de animais parasitados por carrapatos infectados com *R. bellii* (Pacheco et al., 2007) sua patogenicidade para humanos e animais é desconhecida (Parola et al., 2013; Krawczak et al., 2018b).

Ainda que os trabalhos sobre a infecção do carrapato *A. ovale* por riquetsias sejam heterogêneos quanto ao número de amostras, localização e abrangência geográfica analisados, origem das amostras (ambiente, espécie de hospedeiro), número de amostras sequenciadas e o alvo dessas (espécies de riquetsias), uma relação inversa é frequentemente observada entre as taxas de infecção por RPMA e *R. bellii*.

De fato, agregando os nossos resultados com aqueles da literatura com um mínimo de dez carrapatos avaliados e que não restringiram a pesquisa a uma riquetsia específica, observamos uma correlação negativa na ocorrência de RPMA e *R. bellii* em carrapatos *A. ovale* nas Américas. Explicações para esta relação inversa nas taxas de infecção por RPMA e *R. bellii* em populações do carrapato *A. ovale* são ainda especulativas, mas uma provável seria a ocorrência de uma interferência riquetsial. Este fenômeno se refere ao impedimento da transmissão transovariana de uma espécie de riquetsia sobre outra espécie em um mesmo carrapato.

A interferência foi bem caracterizada em carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis* cuja infecção por *Rickettsia montana* e *Rickettsia rhipicephali* impediram a transmissão transovariana recíproca (Macaluso et al., 2002).

Neste contexto, Sakai et al. (2014) observaram em carrapatos *Amblyomma dubitatum*, previamente infectados com *R. bellii*, a perpetuação transestacial mas não transovariana de *Rickettsia rickettsii*. No conjunto, esses resultados indicam que a *R. bellii* é capaz de impedir a transmissão transovariana de outras espécies de riquetsias. Assim as elevadas taxas de infecção de *R. bellii* na população de *A. ovale* estariam impedindo a transmissão transovariana de RPMA o que explicaria a relação inversa observada no PNI e arredores incluindo o lado Argentino da Mata.

Considerando as evidências circunstanciais da interferência riquetsial da *R. bellii* sobre RPMA, surge a dúvida sobre os fatores que manteriam ou dificultariam a infecção do carrapato *A. ovale* com *R. bellii*. Vários fatores teriam que ser testados para se obter uma resposta. Um destes, seria o estudo de uma possível associação de genótipos da *R. bellii* com populações específicas de *A. ovale*, as quais já foram demonstradas anteriormente (Bitencourth et al., 2019; Fournier et al., 2019). Adicionalmente Krawczak et al (2018b) demonstraram haver genótipos de *R. bellii* espécie-específicos e trabalhos mais minuciosos poderiam indicar se esta especificidade atinge subpopulações da mesma espécie de carrapato.

Outros fatores a serem considerados na maior ou menor taxa de infecção seriam aqueles ecológicos que favoreceriam RPMA sobre *R. bellii* de acordo com características ambientais, riqueza e abundância de hospedeiros. Neste contexto há de se explorar o papel do cão como amplificador da taxa de infecção por RPMA uma vez que se trata de uma espécie muito abundante em bordas de Mata Atlântica (Torres and Prado, 2010; Fournier et al., 2020) se tornando nesse perímetro um importante, se não o principal, hospedeiro para adultos

do carrapato *A. ovale*. Esse provável papel é reforçado pela observação de que os carrapatos *A. ovale* coletados de cães possuem uma taxa de infecção por RPMA sempre superior àqueles dos coletados do mesmo ambiente, pelo menos nos trabalhos que permitiram tal comparação. Indicam isso os trabalhos de Krawczak et al. (2016), Luz et al. (2016), Sabatini et al. (2010) e Szabó et al. (2013) em que as taxas de infecção ambiental foram de, respectivamente, 12,5; 5; 6,3 e 8,8 e em cães de 15; 9,6; 13,6 e 12,9.

Tendo o possível papel do cão como amplificador em mente, merece menção o fato de que a maioria dos trabalhos com *A. ovale* e riquetsias terem sido realizados em áreas de Mata Atlântica com elevado impacto antrópico. Esse impacto ocorre tanto nas bordas como no interior da mata, infiltrada por residências e até vilarejos, todos com populações de cães. No outro extremo, o PNI é uma extensa área de Mata Atlântica compacta com seu perímetro bem delineado sem essa permeação antrópica (e de cães/residências) tão intensa.

Em conclusão, presumimos que a exposição de seres humanos a RPMA transmitida pelo carrapato *A. ovale* nas áreas de Mata Atlântica dentro do PNI e em seus fragmentos urbanos pode ser minimizada pela alta taxa de infecção encontrada por *R. bellii*. De qualquer forma todas as hipóteses aqui levantadas deverão ser reforçadas com observações de campo mais minuciosas e com delineamento mais quantitativo bem como testadas em experimentos labororiais.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por apoio financeiro.

Referências

- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Alvares, C.A., Stape, J.L., Sentelhas, P.C., Gonçalves, J.L.M., Sparovek, G., 2013. Koppen's climate classification map for Brazil. *Meteorologische Zeitschrift*. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2013/0507>.
- Angerami, R.N., da Silva, A.M.R., Nascimento, E.M.M., Colombo, S., Wada, M.Y., dos Santos, F.C.P., Mancini, D.M., de Oliveira, R.C., Katz, G., Martins, E.C., da Silva, L.J., 2009. Brazilian spotted fever: Two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 15, 207–208. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02160.x>
- Barbieri, A.R.M.; Moraes-Filho, J.; Nieri-Bastos, F.A.; Souza Jr., J.C.; Szabó, M.P.J.; Labruna, M.B., 2014. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5: 848–853. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.010>
- Bitencourt K.; Amorim M.; de Oliveira S.V.; Voloch C.M.; Gazeta G.S., 2019. Genetic diversity, population structure and rickettsias in *Amblyomma ovale* in areas of epidemiological interest for spotted fever in Brazil. *Med Vet Entomol.* 33 (2):256-268. <https://doi.org/10.1111/mve.12363>.
- Costa, F.B.; da Costa, A.P.; Moraes-Filho, J.; Martins, T.F.; Soares, H.S.; Ramirez, D.G.; Dias, R.A.; Labruna, M.B., 2017a. *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks and exposure of domestic dogs to *Rickettsia* spp. in an

Amazon- Cerrado transition region of northeastern Brazil. PLoS ONE 12 (6): e0179163.
<https://doi.org/doi.org/10.1371/journal.pone.0179163>

Costa, F.B.; Barbieri, A.R.M.; Szabó, M.P.J.; Ramos, V.N.; Piovezan, U.; Labruna, M.B., 2017b. New records of *Rickettsia bellii*-infected ticks in Brazil. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.*, São Paulo, 54 (1): 92-95 DOI: <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.bjvras.2017.114141>

Di Bitetti, M.S., Placi, G., Dietz, L.A., 2003. Uma visão de biodiversidade para a ecorregião florestas do Alto Paraná – Bioma Mata Atlântica: planejando a paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação. World Wildlife Fund, Washington.

Faccini-Martínez, Á.A., Muñoz-Leal, S., Krawczak, F.S., Acosta, I.C.L., Martins, T.F., Serpa, M.C.A., Barbieri, A.R.M., Tovar, J.R., Cerutti Junior, C., Labruna, M.B., 2020. Epidemiological aspects of *Rickettsia parkeri* in the Atlantic forest biome of Espírito Santo state, Brazil. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 11, 101319. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101319>

Fournier, G.F. da S.R., Pinter, A., Muñoz-Leal, S., Labruna, M.B., Lopes, M.G., Martins, T.F., Colácio, L., Môra, C.R.S., Moraes-Filho, J., Dias, R.A., 2020. Implications of domestic dogs in the epidemiology of *Rickettsia parkeri* strain atlantic rainforest and *Rangelia vitalii* in southeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 29, 1-17. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612020003>

Fournier, G.F.S.R., Pinter A., Santiago, R., Muñoz-Leal, S., Martins, T.F., Lopes, M.G., McCoy K.D., Toty, C., Horta, M.C., Labruna, M.B., Dias, R.A. 2019. A high gene flow in populations of *Amblyomma ovale* ticks found in distinct fragments of Brazilian Atlantic rainforest. *Exp Appl Acarol.* 77 (2): 215-228. <https://doi.org/10.1007/s10493-019-00350-y>.

Fournier, P.E., Raoult, D., 2009. Current knowledge on phylogeny and taxonomy of rickettsia spp. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1166, 1-11. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04528.x>

Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak I.G. 2014. The hard Ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae). New York: Springer. 470p.

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://dx.doi.org/10.1196/annals.1374.053>

Krawczak, F.S.; Labruna, M.B., 2018a. The rice rat *Euryoryzomys russatus*, a competent amplifying host of *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest for the tick *Amblyomma ovale*. *Ticks Tick Borne Dis.* 9 (5): 1133-1136. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.04.013>.

Krawczak, F.S.; Labruna, M.B.; Hecht, J.A.; Paddock, C.D.; Karpathy, S.E., 2018b. Genotypic Characterization of *Rickettsia bellii* Reveals Distinct Lineages in the United States and South America. BioMed Research International. BioMed Research International 2018, Article ID 8505483. <https://doi.org/10.1155/2018/8505483>

Krawczak, F.S.; Binder, L.C.; Oliveira C.S.; Costa, F.B.; Moraes-Filho, J.; Martins, T.F.; Sponchiado, J.; Melo, G.L.; Gregori, F.; Polo, G.; Oliveira, S.V.; Labruna, M.B., 2016. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* <https://doi.org/10.1007/s10493-016-0070-1>

Labruna, M.B., Ogrzewalska, M., Soares, J.F., Martins, T.F., Soares, H.S., Moraes-Filho, J., Nieri-Bastos, F., Almeida, A.P., Pinter, A., 2011. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerging Infectious Diseases*. 17(5): 829-834. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101524>

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, Brazilian Journal of Medical Entomology, 41, 1073–1081. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1073>

Lamattina, D., Luisa, E., Nava, S., 2018. Ticks and Tick-borne Diseases Molecular detection of the human

- pathogen *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest in *Amblyomma ovale* ticks in Argentina. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1261–1263. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.007>
- Londoño, A.F.; Diaz, F.J.; Valbuena, G.; Gazi, M.; Labruna, M.B.; Hidalgo, M.; Mattar, S.; Contreras, V.; Rodas, J.D., 2014. Infection of *Amblyomma ovale* by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, Colombia. *Ticks and Tick-borne Diseases* 5: 672–675. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.018>
- Lopes, M.G.; May Junior, J.; Foster, R.J.; Harmsen, B.J.; Sanchez, E.; Martins, T.F.; Quigley, H.; Marcili, A.; Labruna, M.B., 2016. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America.. *Parasites & Vectors* 9:62. <https://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1348-1>
- Luz HR, McIntosh D, Furusawa GP, Flausino W, Rozental T, Lemos ER, et al. Infection of *Amblyomma ovale* with *Rickettsia* species Atlantic rainforest in Serra do Mar, São Paulo State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7(6): 1265-1267. <https://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.07.003>.
- Maack, R., 2012. Geografia física do estado do Paraná. Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa.
- 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. *J. Med. Entomol.* 39, 808–813. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-39.6.809>
- Medeiros, A.P.; de Souza, A.P.; de Moura, A.B.; Lavina, M.S.; Belatto, V.; Sartor, A.A.; Nieri-Bastos, F.A.; Richtzenhain, L.J.; Labruna, M.B., 2011. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 106(8): 926-930. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762011000800005>
- Melo, A.L.T.; Witter, R.; Martins T.F.; Pacheco, T.A.; Alves, A.S.; Chitarra, C.S.; Dutra, V.; Nakazato, L.; Pacheco, R.C.; Labruna, M.B.; Aguiar, D.M., 2016. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. *Medical and Veterinary Entomology* 30, 112–116. <https://doi.org/10.1111/mve.12139>
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., n.d. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). <https://doi.org/10.1007/s004360050433>
- Martins, T.F., Barbieri, A.R.M., Costa, F.B., Terassini, F.A., Camargo, L.M.A., Peterka, C.R.L., De C Pacheco, R., Dias, R.A., Nunes, P.H., Marcili, A., Scofield, A., Campos, A.K., Horta, M.C., Guilloux, A.G.A., Benatti, H.R., Ramirez, D.G., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites and Vectors* 9, 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>
- Moerbeck, L.; Vizzoni, V.F.; Machado-Ferreira, E.; Cavalcante, R.C.; Oliveira, S.V.; Soares, C.A.G.; Amorim, M.; Gazeta, G.S., 2016. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 2016, 1–9. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw121>
- Nieri-Bastos, F.A., Marcili, A., de Sousa, R., Paddock, C.D., Labruna, M.B., 2018. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, 1–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.02872-17>
- 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): 1–31. <https://doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p1-31>
- Oliveira, P.B.; Harvey, T.V.; Fehlberg, H.F.; Rocha, J.M.; Martins, T.F.; da Acosta, I.C.L.; Labruna, M.B.; Faccini, J.L.H.; Albuquerque, G.R., 2019. Serologic and molecular survey of *Rickettsia* spp. in dogs, horses and ticks from the Atlantic rainforest of the state of Bahia, Brazil. *Exp Appl Acarol.* [https://doi.org/10.1007/s10493-019-00397-x.](https://doi.org/10.1007/s10493-019-00397-x)

- Oliveira, S. V., Caldas, E. P., Colombo, S., Gazeta, G. S., Labruna, M. B., Santos, F. C. P., Angerami, R. N. 2016, Fatal Case of Brazilian Spotted Fever in a Non-Endemic Area in Brazil: the importance of having health professionals understanding the disease and its areas of transmission. *A Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 49, 653–655. <http://dx.doi.org/10.1590/0037-8682-0088-2016>
- 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*. *Biomedica*, 27: 364-371.
- Paddock, C.D.; Denison, A.; Dryden, M.W.; Noden, B.H.; Ryan Lash, 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 and Tick-borne Diseases* 6: 297–302. <http://dx.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>
- Ramos, V.N, Osava, C.F., Piovezan, U., Szabó, M.P.J., 2017. Ambush behavior of the tick *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) (Acari: Ixodidae) in the Brazilian Pantanal. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 8, 506-510. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.011>.
- Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D. 1991. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two Rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 173(5), 1576-1589. <https://doi.org/10.1128/jb.173.5.1576-1589.1991>.
- Sabatini, G.S.; Pinter, A.; Nieri-Bastos, F.; Marcili, A.; Labruna, M.B., 2010. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their Rickettsia in an atlantic rainforest reserve in the State of São Paulo, Brazil. *J.Med. Entomol.*, 47(5): 913-916.
- Sánchez-Montes, S., Ballados-González, G. G., Hernández-Velasco, A., Zazueta-Islas, H. M., Solis-Cortés, M., Miranda-Ortiz, H., Canseco-Méndez J.C., Fernández-Figueroa E.A., Colunga-Salas P., López-Pérez A.M., Delgado-de la Mora J., Licona-Enriquez J.D., Delgado-de la Mora D., Karpathy S.E., Paddock C.D., Rangel-Escareño, C., 2019. Molecular Confirmation of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma ovale* Ticks, Veracruz, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 25 (12): 2315-2317. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2512.190964>.
- Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A.M., Schumaker, T.T.S., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M.B., 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 265–270. <https://doi.org/10.3201/eid1102.040656>
- Sakai, R.K.; Costa, F.B.; Ueno, T.; 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 and Tick-borne Diseases* 5: 917–923. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.003>
- Sevá, P., Martins, T.F., Leal, S.M., Rodrigues, A.C., Pinter, A., Luz, H.R., Angerami, R.N., Labruna, M.B., 2019. SHORT REPORT A human case of spotted fever caused by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest and its association to the tick *Amblyomma ovale*. *Parasit. Vectors* 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3730-2>
- Silva, N., Eremeeva, M.E., Rozental, T., Ribeiro, G.S., Paddock, C.D., Ramos, E.A.G., Dasch, G.A., Lemos, E.R.S. De, Ko, A.I., 2011. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil 17, 275–278. <https://doi.org/10.3201/eid1702.100859>
- Silva, B.S.F., Terassini, F.A., Coragem, J.T., Camargo, L.M.A., Labruna, M.B., 2008. Observação e caracterização da altura de carapatos em arbustos do Parque Natural Municipal de Porto Velho,

Amazônia Ocidental-RO. Saber Científico, 1, 118-131.

- Spolidorio, M. G., Labruna, M. B., Mantovani, E., Brandão, P. E., Richtzenhain, L. J., Yoshinari, N. H., 2010. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. Emerging Infectious Diseases, 16(3), 521-523. <https://dx.doi.org/10.3201/eid1603.091338>
- Suzin, A., Vogliotti, A., Nunes, P.H., Barbieri, A.R.M., Labruna, M.B., Szabó, M.P.J., 2020. Free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the Iguazu National Park, Brazil: Temporal dynamics and questing behavior on vegetation. Ticks Tick. Borne. Dis. 11, 101471. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101471>
- Szabó, M.P.J., Spolidorio, M.G., Martins, T.F., 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 719–728. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002065>
- Szabó, M.P.J., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013b. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. Frontiers Cellular and Infection Microbiology, 3, 30-38. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>.
- Torres, P., Prado, P., 2010. Domestic dogs in a fragmented landscape in the Brazilian Atlantic Forest: abundance, habitat use and caring by owners. Brazilian J. Biol. 70, 987–994. <https://doi.org/10.1590/s1519-69842010000500010>
- Vogel, H.; Foley, J.; Fiorello, C.V., 2018. *Rickettsia africae* and Novel Rickettsial Strain in *Amblyomma* spp. Ticks, Nicaragua, 2013. Emerg Infect Dis 24 (2) :385-387. <https://doi.org/10.3201/eid2402.161901>.

Capítulo IV

**Pesquisa de *Rickettsia* sp. em *Ornithodoros cerradoensis* em uma área
antropizada em Araguapaz, Goiás**

Pesquisa de *Rickettsia* sp. em *Ornithodoros cerradoensis* em uma área antropizada em Araguapaz, Goiás

Lais Miguel Rezende^{a,*}; Maria M. Martins^a; Sebastián Muñoz-Leal^b; Vinícius Silva Rodrigues^a; Vanessa do Nascimento Ramos^a; Adriane Suzin^a; Marcelo B. Labruna^b; Jonny Yokosawa^c; Matias J.P. Szabó^a

^aLaboratório de Ixodologia, Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Av. Pará, 1720/Campus Umuarama-Bloco 2T, CEP 38400-902, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil

^bDepartamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP 05508-270, Brazil

^c Laboratório de Microrganismos do Cerrado, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade Federal de Uberlândia Uberlândia, Brasil.

Resumo: O gênero *Ornithodoros* é o maior representante da família Argasidae no Brasil. Esses carapatos são ectoparasitas xerófilos com baixa especificidade parasitária e que se alimentam de pequenos hospedeiros vertebrados, animais domésticos e seres humanos. São vetores de agentes patogênicos importantes, dentre eles *Borrelia*, *Coxiella*, e alguns vírus. A fauna destes carapatos no Brasil é provavelmente muito mais diversa do que o conhecido e o seu papel epidemiológico como vetores de riquetsias é uma incógnita. O objetivo do trabalho foi pesquisar DNA de riquetsias em uma espécie recém descoberta de carapato o *Ornithodoros cerradoensis*, coletados na região de Araguapaz-GO. Para tal, amostras de DNA dos carapatos coletados foram testadas para presença de material genético de *Rickettsia* por uma sequência de reações em cadeia pela polimerase (PCR). A taxa de infecção por *Rickettsia* spp encontrada foi de 56,6% afetando todos os estágios do carapato. De acordo com as análises das árvores filogenéticas dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* é geneticamente distante das outras riquetsias com homologia inferior a 99% e parece se localizar entre riquetsias do Grupo da Febre Maculosa do Grupo de Transição. Estudos adicionais são necessários para melhor caracterização genética e filogenética dessa provável espécie nova de riquetsia. Sua patogenicidade, distribuição geográfica e presença em outros vetores é ainda desconhecida.

Palavras chaves: *Rickettsia* spp; *Ornithodoros cerradoensis*, Cerrado, Goiás, Brasil

Abstract: The genus *Ornithodoros* is the largest representative of the family in Brazil. Ticks from this genus are xerophilous ectoparasites, lack high parasitic specificity, and feed on small vertebrate hosts, domestic animals and humans. Ticks from this genus are vectors of important pathogens such as *Borrelia*, *Coxiella*, and viruses. The fauna of these ticks in Brazil is probably much more diverse than the known and their epidemiological role as vectors of rickettsiae is unknown. The objective of this work was to search for rickettsiae DNA in a newly discovered species of tick *Ornithodoros cerradoensis*, collected in the region of Araguapaz, Goiás state, Brazil. DNA samples from the collected ticks were tested for the presence of *Rickettsia* genetic material by a sequence of polymerase chain reactions (PCR). The rate of infection with *Rickettsia* spp was of 56,6% and the bacteria was found in all tick stages. Analysis of the nucleotide sequences of three genes (*gltA*, *ompA* and *ompB*) showed that this new *Rickettsia* is distinct from others from the same genus with less than 99% of homology to the closest ones and preliminary phylogenetical analysis placed it between Spotted Fever and Transitional *Rickettsia* groups. Further studies are necessary for a better genetic and phylogenetic characterization of this new *Rickettsia*. For the moment being, its pathogenicity for hosts, geographic distribution and its presence in other vectors is unknown.

Key words: *Rickettsia* spp; *Ornithodoros cerradoensis*, Cerrado, Goiás- Brazil.

1. Introdução

O gênero *Rickettsia*, pertencente à família Rickettsiaceae é constituído por bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias e com número crescente de espécies novas descritas (Parola et al., 2013). O gênero é caracterizado por uma diversidade antigênica, ecológica, de patogenicidade e predileção por hospedeiros artrópodes que incluem piolhos, pulgas, carapatos e ácaro (Eremeeva et al., 2006).

Os métodos moleculares e filogenéticos separaram as espécies de *Rickettsia* em quatro grupos: grupo do tifo (TG), grupo da febre maculosa (SFG) o qual foi dividido em dois clados irmãos, um dos quais agora é designado como grupo de transição (TRG), e um grupo ancestral (*Rickettsia canadensis* e grupo *Rickettsia bellii*) (Diop et al., 2019).

A maioria das espécies de riquetsias são transmitidas por carapatos ixodídeos no entanto, alguns estudos associaram esses agentes a carapatos da família Argasidae. Nesta Família o gênero *Ornithodoros* é o mais representativo com pelo menos 130 espécies (Muñoz-Leal et al., 2018 e 2020). Devido ao seu comportamento nidícola os carapatos deste gênero possuem baixa especificidade por hospedeiros, parasitando aqueles disponíveis no seu micro-habitat como pequenos vertebrados, animais domésticos e seres humanos (Felsenfeld, 1971; Kent, 2009).

O gênero *Ornithodoros* engloba espécies vetores, transmissores de agentes patogênicos a exemplo do vírus da peste suína africana (Beck et al., 1986), da bactéria *Coxiella burnetii*, agente da febre Q aguda e endocardite em seres humanos e animais (Almeida et al. 2012; Griffin et al., 2012) e diversas espécies de *Borrelia*, patógenos da febre recorrente em humanos e animais (Estrada- Peña e Jongejan, 1999).

No Brasil, algumas espécies de *Ornithodoros* estão ligadas a casos de toxicose em humanos, com manifestações clínicas que incluem prurido no local da picada, edema e eritema, lesões em bolhas e envolvimento sistêmico (febre transitória, dispneia e mal-estar) (de Oliveira, 2018). E mais recentemente foi realizado o isolamento de *Borrelia venezuelensis* a partir de *Ornithodoros rufus* coletados no Maranhão (Muñoz-Leal et al., 2018).

O papel epidemiológico desempenhado por esses argasídeos como vetores de *Rickettsia* spp. é pouco conhecido, com alguns relatos de carapatos parasitados por esse microrganismo. Constituem alguns exemplo disso, a bactéria *Rickettsia sibirica* em *Ornithodoros papillipes*, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia hoogstraalii* em *Carios capensis*, *Rickettsia helvetica* em *Argas vespertilionis*, *Rickettsia lusitaniae* isolada em *Ornithodoros erraticus* e algumas riquetsias ainda não formalmente descritas (Podboronov e Pchelkina.,1989; Duh et al., 2010; Milhano et al., 2014; Hornok et al., 2019).

O gênero *Ornithodoros* é o maior representante da família no Brasil, sendo encontrado nos cinco biomas (Muñoz-Leal et al., 2020). Recentemente foi descrita uma nova espécie deste gênero em uma área de cerrado no estado de Goiás e morfologicamente e geneticamente relacionada ao grupo *Ornithodoros talaje*. Esta nova espécie é nidícola, parasita de pequenos roedores e foi denominado de *Ornithodoros cerradoensis* (Muñoz-Leal et al., 2020). Como não existe nenhuma informação sobre microrganismos patogênicos associados a este argasídeo, este trabalho teve como objetivo pesquisar DNA de riquetsias nesta espécie de carapato coletado na região de sua descrição, Araguapaz-GO.

2. Material e Métodos

2.1 Local da coleta

O estudo foi conduzido em fazenda particular localizada no Município de Araguapaz ($15^{\circ} 04' 18''$ S, $500 25' 03''$ O) no Estado de Goiás, Brasil. A fazenda, com aproximadamente, 960 ha possui 60% de sua área preservada e está inserido no bioma cerrado. Exibe uma fitofisionomia caracterizada por uma paisagem rochosa, relevo acidentado com serras que variam de 348 a 471 m. O clima é caracterizado por verão quente e chuvoso e inverno seco, com temperatura mínima de 16°C e máxima de 34°C sendo raramente inferior a 13°C ou superior a 38°C . A principal atividade econômica da fazenda é a criação comercial de cágados e gado.

2.2 Coleta de carrapatos

As coletas de carrapato estão detalhadas em Muñoz-Leal et al. (2020). Resumidamente, coletas foram realizadas em março de 2013, setembro de 2014, 2015, 2017 e 2019. Inicialmente (2013) larvas de *Ornithodoros* spp. não identificadas foram coletadas de preás (*Cavia aperea*) e pequeno roedor silvestre (*Thrichomys* sp.). Em coletas posteriores (2014-2019) carrapatos em fase não parasitária foram também obtidas em fendas e cavidades entre pedras, refúgio e/ou tocas dos hospedeiros. Para a localização dos parasitas nestes locais foi realizada a inspeção visual e peneiramento do solo (Figura 1a). Para a captura dos hospedeiros foram utilizadas 15 armadilhas do tipo Tomahawk iscadas com pedaços de cenoura e maçã e checadas três vezes ao dia (Figura 1b). Os animais capturados foram então inspecionados por carrapatos sob anestesia e após recuperação do efeito dos fármacos, soltos no local de captura. Posteriormente, os carrapatos foram identificados e descritos como uma nova espécie denominada de *Ornithodoros cerradoensis* (Muñoz-Leal et al., 2020).



Figura 01. a) Coleta de *O. cerradoensis* com o revolvimento do solo e das cavidades com auxílio de uma pá com seu posterior peneiramento; b) armadilhas *Tomahawk* armadas nos locais prováveis de infestação em Araguapaz-GO.

Após as coletas, as larvas foram conservadas em álcool 70°, enquanto ninfas e carrapatos adultos eram acondicionados vivos em frascos de acrílico até sua identificação e mantidos em temperatura de -80° C para

posterior processamento no Laboratório de Ixodologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Uberlândia (LABIX). As identificações morfológicas do *O. cerradoensis* foram realizadas de acordo com Muñoz-Leal et al., 2020.

2.4 Extração de DNA e detecção de Riquétsia

Para a detecção de *Rickettsia*, o DNA foi extraído de amostras de carrapatos usando a técnica de guanidina isotiocianato fenol de acordo com Sangioni et al. (2005) e o sucesso da extração de DNA foi avaliada por uma reação em cadeia pela polimerase (PCR) para gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos (Mangold et al., 1998).

Confirmado o sucesso da extração, cada amostra de DNA foi testada para presença de material genético de *Rickettsia* por uma sequência PCRs usando os primers CS-78 e CS-323, visando um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*), comum ao gênero *Rickettsia* (Labruna et al., 2004). Amostras que apresentaram fragmento visível do tamanho esperado, foram então testadas usando os iniciadores Rr190.70p e Rr190.701n que amplificam um fragmento do gene que codifica uma proteína de membrana externa 190-kDa (*ompA*) presentes apenas em riquétsias do GFM (Regnery et al., 1991). Amostras que produziram fragmentos de DNA visíveis para o gene *gltA*, mas não apresentaram produtos para o gene *ompA*, foram então testadas, com os primers 120-M59 e 120-807 que amplificam um fragmento de 856 pb da proteína de membrana externa 135-kDa do gene *ompB*, também presentes em riquétsias do GFM (Regnery et al., 1991), amostras negativas nessa reação eram então submetidas a uma última amplificação usando iniciadores específico para um fragmento de 338 pb do gene *gltA* da *Rickettsia bellii* (Szabó et al., 2013).

Cada reação de PCR incluiu controles negativos (água ultrapura) e positivos (*Rickettsia vini* para gene *gltA*, *ompA* e *ompB* e *R. bellii* para gene específico da *R. bellii*). Os carrapatos foram processados individualmente ou em *pools* (amostras) contendo DNA de 02 a 06 carrapatos. Cada *pool* foi constituído por carrapatos da mesma espécie, estágio e ou sexo, data de coleta ou hospedeiro.

Amostras positivas foram purificadas com o kit PureLink® (Invitrogen Life Technologies) e enviadas para sequenciamento em laboratório credenciado para posterior comparação das sequências através do programa BLAST para inferir as semelhanças mais próximas disponíveis no GenBank (Altschul et al., 1990).

2.6 Árvore Filogenética

As relações filogenéticas foram avaliadas usando duas sequências obtidas de *O. cerradoensis* para os genes *gltA* e *ompA* e uma sequência para o gene *ompB*. Ambas árvores foram inferidas por meio de Máxima Verossimilitude. Os alinhamentos foram construídos com o programa MAFFT (Katoh et al. 2002). Os genes foram concatenados manualmente, e os modelos de substituição de nucleotídeos foram calculados com MEGA7 (Kumar et al. 2016). O modelo GTR+G+I foi escolhido para *gltA* e *ompA*, e o GTR para *ompB*. As árvores filogenéticas foram construídas com o software PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010).

2.5 Autorizações

A captura e manuseio de animais selvagens foi autorizada pelo Ministério do Meio Ambiente-MMA-Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade ICMBio, (licenças nº 36413-1 e 65137-1) e aprovada pela Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia (protocolos. 003/13 e 069/18).

3. Resultados

Um total de 99 carapatos (37 fêmeas, 33 machos, 26 ninfas e 03 larvas) *O. cerradoensis*, foram processados para pesquisa de *Rickettsia* sp., 23 individualmente e 76 em 30 pools contendo entre dois e seis carapatos, resultando em 53 amostras de DNA extraído. Destes, seis carapatos foram coletados de dois *Thrichomys* spp (03 larvas e 01 ninfa) e de dois Cavídeos (02 ninfas) e o restante do ambiente. O número de amostras processadas de acordo com o ano de coleta, estágio de vida e respectivas taxas de infecção estão detalhadas na Tabela 01.

Tabela 01. Total de amostras do carapato *Ornithodoros cerradoensis* coletadas do ambiente e de pequenos roedores e testados para pesquisa de *Rickettsia* spp. de acordo com os anos de coleta em Araguapaz-GO, 2014-2019.

| Número de amostras (pools) | <i>Ornithodoros cerradoensis</i> | | | | | | | Total |
|----------------------------|----------------------------------|--------|--------|--------------------|--------|--------------------|--------|-------------------|
| | 2014 | 2015 | 2017 | | 2019 | | | |
| | larvas | ninfas | ninfas | adultos | ninfas | adultos | ninfas | |
| Testados | 02 | 03 | 01 | 16 | 10 | 19 | 02 | 53 |
| Infectados | 01 | 01 | - | 12 | 05 | 09 | 02 | 30 |
| Total infectados | 02 (40%) | | - | 17 (65,38%) | | 11 (52,38%) | | 30(56,60%) |

Das 30 amostras positivas (56,60%) para o gene *gltA*, 18 amplificaram fragmentos do gene *ompA* e 12 amostras do gene *ompB*. Em nenhuma amostra ocorreu a amplificação do gene específico de *R. bellii*.

Tabela 02. Amostra positivas de acordo com os fragmentos de genes pesquisados.

| Local de coleta (número de hospedeiro) | Estágio (número de pools) | Genes | | |
|--|---------------------------|-------------|-------------|-------------|
| | | <i>gltA</i> | <i>ompA</i> | <i>ompB</i> |
| | | Positivo | Positivo | Positivo |
| Ambiente | Ninfas (n=13) | 7 | 3 | 4 |
| | Adultos (n=35) | 21 | 13 | 8 |
| Cavídeo (2) | Larvas (n=2) | 1 | 1 | - |
| | Ninfas (n=1) | 1 | 1 | - |
| <i>Thrichomys</i> spp (2) | Ninfas (n=2) | - | - | - |
| Total | 53 | 30 | 18 | 12 |

Sequenciamento

Para a confirmação das espécies de carrapatos o gene 16S rDNA mitocondrial foi sequenciado em três amostras de carrapatos (uma ninfa coletada em 2014 de um *Thrichomys* spp, um macho e uma fêmea coletados do ambiente em 2017 e 2019, respectivamente). Todas as sequencias geradas foram 100% idênticas entre si e ao *O. cerradoensis* (MT235764.1).

Os produtos amplificados do gene *gltA* e o gene *ompA* de duas amostras, um pool com duas fêmeas (352pb) e um pool com duas ninfas (350pb) foram sequenciadas. A homologia nucleotídica com sequências correspondentes disponíveis no GenBank do gene *gltA* variou entre 98,12- 98,86%, quando comparados com sequencias das bactérias *Rickettsia raoultii* (MT178338.1), *Rickettsia conorii* (MF002509.1), *Rickettsia heilongjiangensis* (AP019865.1) e *Rickettsia africae* (MH751467.1), todos do grupo da Febre Maculosa. As sequencias geradas para o gene *ompA* das mesmas amostras apresentaram homologia de 87,60% e 85,39% com *Rickettsia asembonensis* (MK923742.1); 80,75 e 81,80% com *Rickettsia japonica* (MK102720.1). e 79,41 e 81,25% para *R. raoultii* (MT178338.1).

Uma amostra do gene *ompB* proveniente de um pool com 02 machos de *O. cerradoensis* (773pb) gerou uma sequência 92,55% homologa a *Rickettsia massiliae* (MK066335.1), 92,15% semelhante a *Rickettsia raoultii* strain IM16 (CP019435.1), 91,80 e 91,11% idênticos a *Rickettsia rhipicephali* (KX018051.1) e *Rickettsia montanensis* (AF123716).

As similaridades máximas de sequencias dos três genes sequenciados com aquelas disponíveis no Genbank se encontram na Tabela 03.

Na análise da árvore filogenética concatenada dos genes *gltA* e *ompA* e análise feita para o gene *ompB* a riquetsia do *O. cerradoensis* ficou em um ramo separado entre o GT e o GFM (figura 02 e 03).

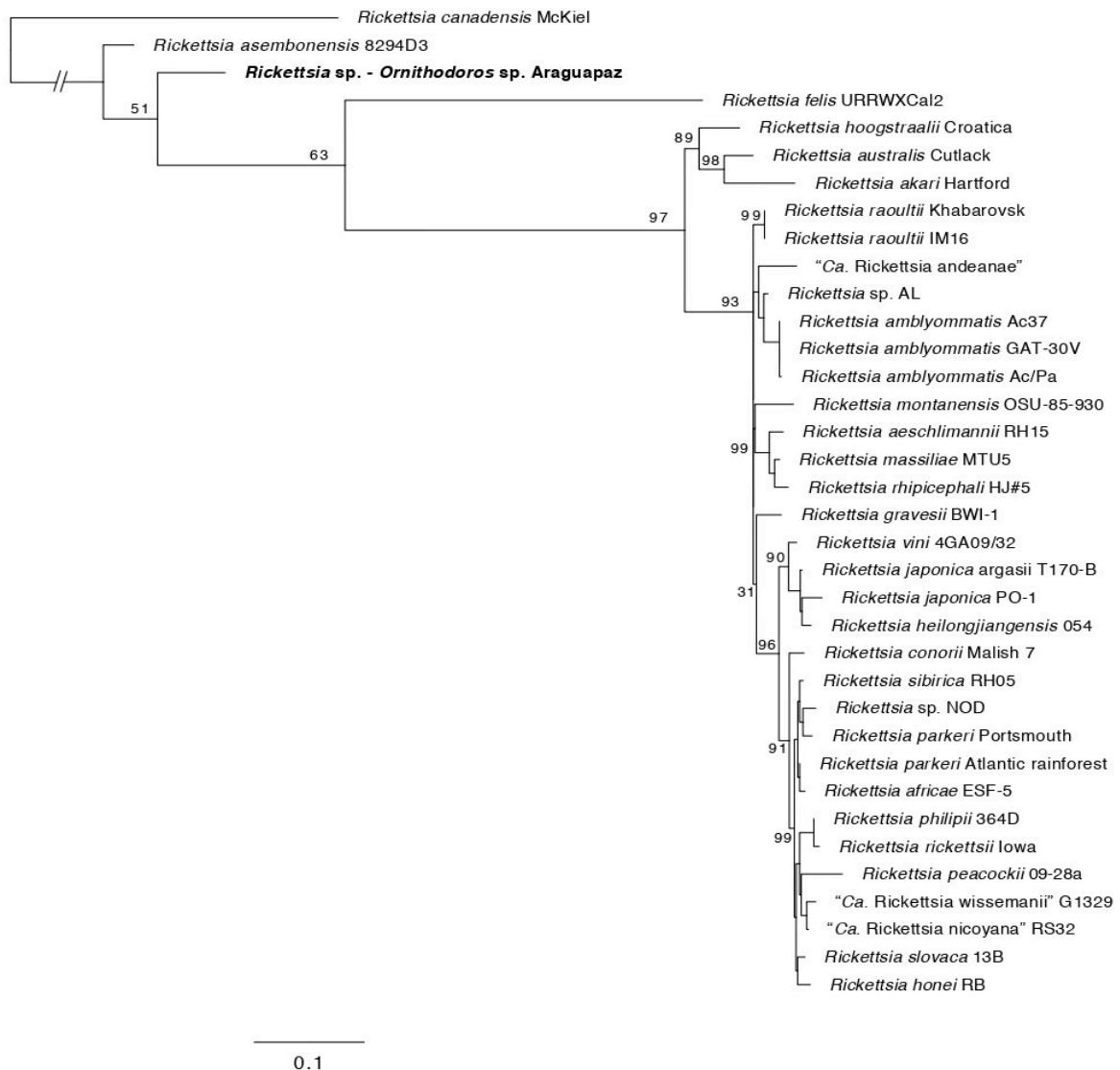


Figura 02. Árvore filogenética concatenada dos genes *gltA* e *ompA* (alinhamento de *gltA*, 262 pb; *ompA* 485 pb; concatenado: 747 pb) das sequências de DNA de *Rickettsia* spp. de *O. cerradoensis* coletados em Araguapaz- GO.

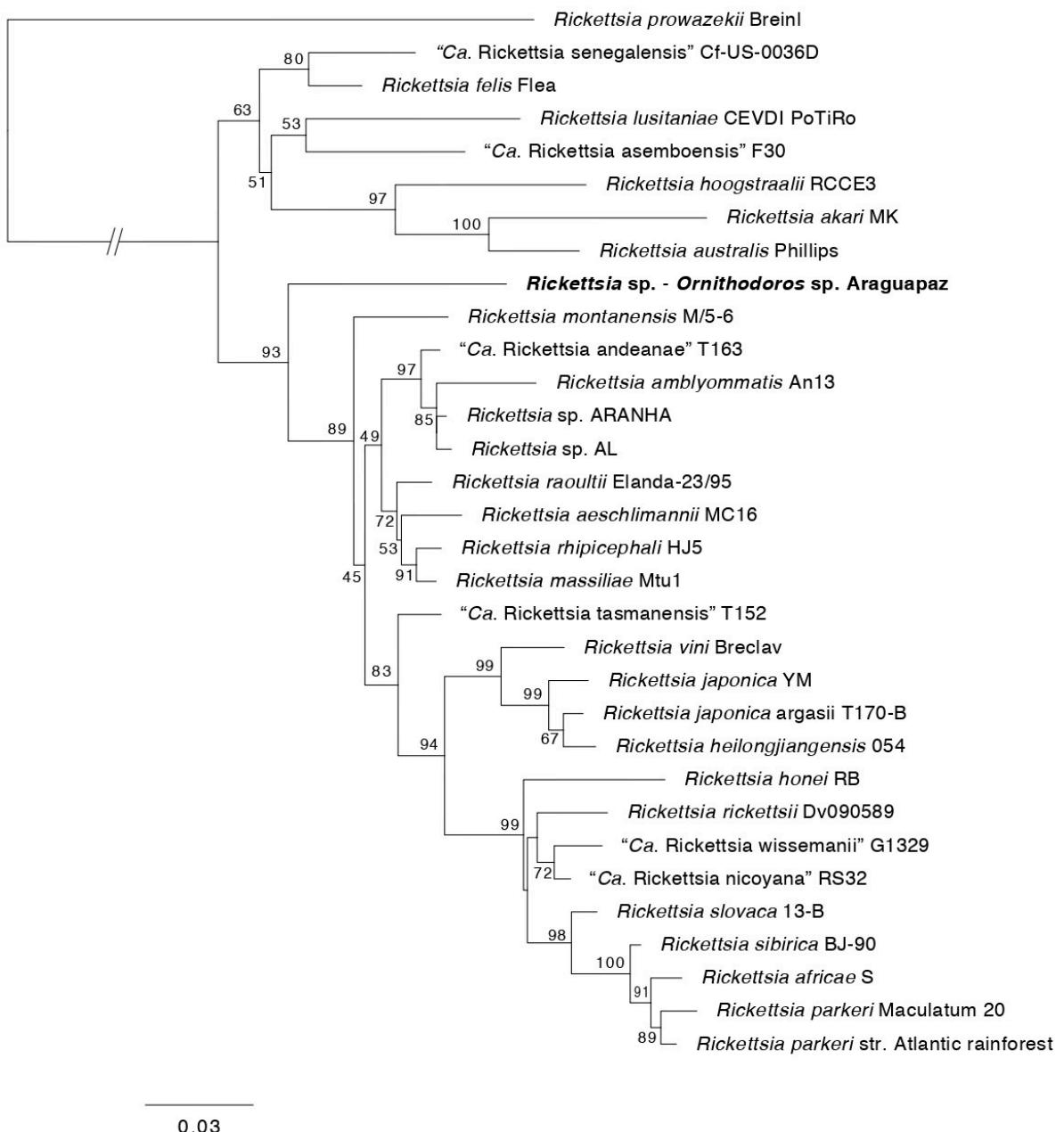


Figura 03. Árvore filogenética do gene *ompB* (alinhamento de 766 pb) das sequencias de DNA de *Rickettsia* spp. de *O. cerradoensis* coletados em Araguapaz- GO.

Tabela 03. Sequencias nucleotídicas de bactérias do gênero *Rickettsia* no Genbank e similaridades com os genes *gltA*, *ompA* e *ompB* de amostras obtidas em carapatos *Ornithodoros cerradoensis*.

| Gene | Rickettsia spp (nº de acesso Genbank) | % de Identidade | | | Fonte de Isolamento | País |
|--------------------|--|-----------------|------------|------------|---------------------------------------|----------------|
| | | Amostra 01 | Amostra 02 | Amostra 03 | | |
| <i>gltA</i> | <i>Rickettsia raoultii</i> (MT178338.1) | 98.44 | 98.86 | - | <i>Dermacentor nuttalli</i> | China |
| | <i>Rickettsia conorii</i> (MF002509.1) | 98.44 | 98.86 | - | <i>Rhipicephalus turanicus</i> | China |
| | <i>Rickettsia heilongjiangensis</i> (AP019865.1) | 98.12 | 98.58 | - | <i>Haemaphysalis concinna</i> | Japão |
| | <i>Rickettsia parkeri</i> cepa Mata Atlântica (MN027564.1) | 98.12 | 98.58 | - | <i>Homo sapiens</i> | Brasil |
| | <i>Rickettsia africae</i> (MH751467.1) | 98.58 | 98.12 | - | <i>Amblyomma hebraeum</i> | África do Sul |
| | <i>Rickettsia sibirica</i> (MF002541.1) | - | 98.58 | - | <i>Dermacentor nuttalli</i> | China |
| | <i>Rickettsia slovaca</i> (MF002529.1) | - | 98.58 | - | <i>Dermacentor marginatus</i> | China |
| | <i>Rickettsia massiliae</i> (MF002497.1) | - | 98.58 | - | <i>Rhipicephalus turanicus</i> | China |
| | <i>Rickettsia amblyommatis</i> (MG712729.1) | 98.12 | - | - | <i>Amblyomma longirostre</i> | Costa Rica |
| | <i>Rickettsia montanensis</i> (MH425446.1) | 98.12 | - | - | <i>Dermacentor variabilis</i> | Estados Unidos |
| <i>ompA</i> | <i>Rickettsia asemboensis</i> (MK923742.1) | 87.60 | 85.39 | - | <i>Ctenocephalides canis</i> | Peru |
| | <i>Rickettsia japonica</i> (MK102720.1) | 81.48 | 82.52 | - | <i>Haemaphysalis longicornis</i> | China |
| | <i>Rickettsia raoultii</i> (MT178338.1) | 79.41 | 81.25 | - | <i>Dermacentor nuttalli</i> | China |
| <i>ompB</i> | <i>Rickettsia massiliae</i> (MK066335.1) | - | - | 92.55 | <i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i> | México |
| | <i>Rickettsia rhipicephali</i> (KX018051.1) | - | - | 91,88 | <i>Amblyomma sp. haplotype Nazare</i> | Brasil |
| | <i>Rickettsia raoultii</i> (EU036984) | - | - | 91,61 | <i>Dermacentor nuttalli</i> | Rússia |
| | <i>Rickettsia aeschlimannii</i> (AF123705) | | | 91,49 | <i>Hyaloma marginatum</i> | Marrocos |
| | <i>Rickettsia montanensis</i> (AF123716) | | | 91,11 | <i>Microtus sp</i> | Estados Unidos |
| | <i>Rickettsia amblyommatis</i> (MG674592.1) | - | - | 90,95 | <i>Amblyomma pseudoconcolor</i> | Brasil |
| | <i>Rickettsia felis</i> (KX090276) | - | - | 90,24 | <i>Pulex irritans</i> | Madagascar |

5. Discussão

Neste estudo, identificamos uma provável espécie nova de *Rickettsia* em uma espécie de carrapato, *Ornithodoros cerradoensis*, recém descrita no cerrado em uma fazenda do município de Araguapaz, Goiás.

A elevada prevalência da riquetsia nas amostras do carrapato (56,6%) com DNA presente em todas as campanhas de coleta (exceção do ano de 2015, em que apenas uma ninfa foi coletada) e em todos os estágios de vida (larva, ninfa e adultos) indicam transmissão transovariana, perpetuação transestacial e relação simbiótica da bactéria com o seu hospedeiro invertebrado. Relação semelhante é descrita para a bactéria *R. bellii* em diversas espécies de carrapatos (Krawczak et al., 2018) e a bactéria *Candidatus Rickettsia andeanae* em *Amblyomma maculatum* (Paddock et al., 2015). A importância desta forma de relação é a possível interferência com a transmissão de outras espécies deste gênero de bactéria, às vezes patogênicas (Paddock et al., 2015).

Os carrapatos vetores das espécies das riquetsias com maior homologia com a espécie de nosso estudo (Tabela 03) pertencem em sua maioria à família Ixodidae (Philip et al., 1981; Gage et al., 1994; Vitale et al., 2006; Parola et al., 2009; García-García et al., 2010; Jia et al., 2014; Yan et al., 2019). Exceção a estes, a bactéria *Rickettsia felis* e *Rickettsia japonica*, sendo descritas nos argasídeos *Carios capensis*, infestando ninhos de pelicanos marrons (*Pelecanus occidentalis*) e *Carios dewae* coletado de um morcego (Reeves et al., 2006; Izzard et al., 2018). Neste contexto a presença da *Rickettsia* do carrapato *O. cerradoensis* deverá ser pesquisada em outros artrópodes vetores, em especial aqueles que compartilham os mesmos hospedeiros com o carrapato *O. cerradoensis*.

A caracterização dessa *Rickettsia* do carrapato *O. cerradoensis* como nova espécie é ainda precoce, mas muito provável. Na comparação das sequências nucleotídicas dos três genes estudados com daqueles de outras espécies do GenBank, a *Rickettsia* do *O. cerradoensis* se posiciona distante das outras riquetsias, com homologia sempre inferior a 99%. Estando de acordo com os critérios de Raoult et al. (2005) para a identificação de novas espécies de *Rickettsia*. De acordo com esses critérios, para ser classificado como uma 'nova' espécie de *Rickettsia*, o isolado não deve exibir graus de similaridade de nucleotídeos maiores ou iguais a 99,9%, 98,8%, 99,2% e ou 99,3% com os genes *gltA*, *ompA*, *ompB* e *sca4*, respectivamente, quando comparados com uma espécie homólogo válida.

Além disso, parece formar um ramo separado entre as riquetsias do GFM e do GT. Porém, para maiores inferências, análises com genes adicionais e de sequências mais longas são necessárias para o posicionamento filogenético mais correto e a caracterização do microrganismo. Para permitir essas análises, tentativas de isolamento dessa nova espécie de *Rickettsia* spp está em andamento no laboratório.

De forma mais específica, as sequências parciais dos para os três genes testados (*gltA*, *ompA* e *ompB*), mostraram se similares em sua maioria com as riquetsias do grupo da Febre Maculosa. Muitas das espécies que apresentaram alguma similaridade são de patogenicidade desconhecida como exemplo, *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia rhipicephali* e *R. asembonensis* ou possuem manifestações clínicas

semelhantes, incluindo febre, erupções cutâneas, linfadenopatia e a formação de lesão papular típica (“tache noir”) a exemplo da *Rickettsia raoultii* e *Rickettsia asembonensis*. Com exceção da *Rickettsia conorii* que geralmente resulta em quadros clínicos mais severos.

A *R. raoultii* foi a única que apresentou similaridade com os três genes utilizados nos sequenciamentos. Esta riquétsia é endêmica em muitos países europeus e algumas partes da Ásia (Speck et al., 2012; Špitálská et al., 2012; Tian et al., 2012), tendo como principais vetores carapatos da família Ixodidae, em especial os do gênero *Dermacentor* spp. (Li et al., 2018).

Na árvore concatenada dos genes *gltA* e *ompA* nossa sequência apresentou uma proximidade maior com *R. asembonensis*, a qual também apresentou maior identidade nucleotídica com as sequências comparadas no Genbank para o gene *ompA*. Esta riquétsia faz parte do grupo de transição junto com a *Rickettsia felis*, porém diferiu o suficiente para ser considerada uma espécie separada (Jiang et al., 2013; Maina et al., 2016). Embora alguns autores considerem a *R. felis* deletéria para humanos, a patogenicidade das *R. asembonensis* permanece desconhecida (Pérez-Osorio et al., 2008; Jiang et al., 2013; Loyola et al., 2018). Deve-se ressaltar que na reconstrução da árvore filogenética, a *R. asembonensis* ficou em um ramo fora do GT, o que pode ter ocorrido devido as curtas sequências dos genes *gltA* e *ompA* geradas neste trabalho.

Na árvore filogenética construída com o gene *ompB*, a riquétsia do carapato *O. cerradoensis* parece ser filogeneticamente mais próximo com o GFM. Em termos de identidade nucleotídica nossa sequência apresentou maior homologia (90.25%- 92.55) com o grupo que abriga a bactéria *R. massiliae* uma espécie descrita em vários locais do mundo como África Central, Arizona, Portugal, Argentina, Itália, Suíça, transmitida pelo carapato *Rhipicephalus sanguineus* (s.l.) e associada a doença em humanos (Dupont et al., 1994; Bernasconi et al., 2002; Eremeeva et al., 2006; Vitale et al., 2006; García-García et al., 2010; Cicuttin and Nava, 2013; Milhano et al., 2014; Scarpulla et al., 2016). Entretanto também apresentou uma similaridade (90,24%) com *Rickettsia felis* do GT. Essa riquétsia é conhecida como um simbionte da *Ctenocephalides felis*, porém já foi isolada de argasídeos a exemplo do *Carios capensis* na Georgia, EUA (Reeves et al., 2006; Duh et al., 2010). Considerada por alguns como patógeno riquétsia emergente com distribuição mundial em mamíferos, humanos e ectoparasitas (Pérez-Osorio et al., 2008).

Em conclusão, a recém descrita espécie de argasídeo, *O. cerradoensis*, parece coexistir com uma riquétsia em simbiose com características genéticas que a posicionam na filogenia entre os grupos da Febre Maculosa e grupo de transição. Estudos adicionais são necessários para melhor caracterização genética e filogenética dessa provável espécie nova de riquétsia. Também é importante a investigação de possíveis efeitos patogênicos deste microrganismo em hospedeiros infectados, sua presença em outras espécies de vetores e abrangência geográfica.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) por apoio financeiro.

Referências

- Almeida, A.P., Marcili, A., Leite, R.C., Nieri-Bastos, F.A., Domingues, L.N., Martins, J.R., Labruna, M.B. 2012. *Coxiella symbiont* in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). Ticks Tick Borne Dis 3: 203–206. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.02.003>
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Beck, A.F., Holscher, K.H., Butler, J.F., 1986. Life Cycle of *Ornithodoros Turicata Americanus* (Acari: Argasidae) in the Laboratory. J. Med. Entomol. 23, 313–319. <https://doi.org/10.1093/JMEDENT/23.3.313>
- Cicuttin, G., Nava, S., 2013. Molecular identification of *Rickettsia parkeri* infecting *Amblyomma triste* ticks in an area of Argentina where cases of rickettsiosis were diagnosed. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 108, 123–125. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762013000100022>
- de Oliveira SV, Bitencourt K, Borsoi ABP, et al. Human parasitism and toxicosis by *Ornithodoros rietcorreai* (Acari: Argasidae) in an urban area of Northeastern Brazil. Ticks and Tick-borne Diseases. 2018 Sep;9(6):1494-1498. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.011>.
- Diop, A., Raoult, D., Fournier, P.E. 2019. Paradoxical evolution of rickettsial genomes. Ticks Tick Borne Dis. 10(2):462-469. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.11.007>
- Duh, D., Punda-Polic, V., Avsic-Zupanc, T., Bouyer, D., Walker, D.H., Popov, V.L., Jelovsek, M., Gracner, M., Trilar, T., Bradaric, N., Kurtti, T.J., Strus, J., 2010. *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hardand soft-bodied ticks. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 977–984. <https://doi.org/10.1099/ijss.0.011049-0>
- Dupont, H.T., Cornet, J.P., Raoult, D., 1994. Identification of rickettsiae from ticks collected in the Central African Republic using the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50, 373–380. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1994.50.373>
- Estrada-Peña, A., Jongejan, F., 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. Exp. Appl. Acarol. 23, 685–715.
- Eremeeva, M.E., Bosselman, E.A., Demma, L.J., Zambrano, M.L., Blau, D.M., Dasch, G.A., 2006. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. Appl. Environ. Microbiol. 72, 5569–5577. <https://doi.org/10.1128/AEM.00122-06>
- Felsenfeld, O., 1971. *Borrelia*. Strains, Vectors, Human and Animal Borreliosis. Warren H. Green, Louis, Missouri.
- Gage, K.L., Schrumpf, 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>
- García-García, J.C., Portillo, A., Núñez, M.J., Santibáñez, S., Castro, B., Oteo, J.A., 2010. Case report: A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 82, 691–692. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0662>

Griffin, A.T., Espinosa, M., Nakamatsu, R., 2012. Q fever endocarditis: An unusual presentation. *Am. J. Med. Sci.* 344, 480–484. <https://doi.org/10.1097/MAJ.0b013e3182684979>

Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.

Hornok, S., Szoke, K., Meli, M.L., Sándor, A.D., Görföl, T., Estók, P., Wang, Y., Tu, V.T., Kováts, D., Boldogh, S.A., Corduneanu, A., Sulyok, K.M., Gyuranecz, M., Konthchán, J., Takács, N., Halajian, A., Epis, S., Hofmann-Lehmann, R., 2019. Molecular detection of vector-borne bacteria in bat ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from eight countries of the Old and New Worlds 06 Biological Sciences 0604 Genetics. *Parasites and Vectors* 12, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3303-4>

Izzard, L., Chung, M., Dunning Hotopp, J., Vincent, G., Paris, D., Graves, S., Stenos, J., 2018. Isolation of a divergent strain of *Rickettsia japonica* from Dew's Australian bat Argasid ticks (*Argas (Carios) dewae*) in Victoria, Australia. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 9, 1484–1488. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.007>

Jia, N., Zheng, Y.C., Ma, L., Huo, Q.B., Ni, X.B., Jiang, B.G., Chu, Y.L., Jiang, R.R., Jiang, J.F., Cao, W.C., 2014. Human infections with *Rickettsia raoultii*, China. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 866–868. <https://doi.org/10.3201/eid2005.130995>

Jiang, J., Maina, A.N., Knobel, D.L., Cleaveland, S., Laudisoit, A., Wamburu, K., Ogola, E., Parola, P., Breiman, R.F., Njenga, M.K., Richards, A.L., 2013. Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia Asemboensis* in Fleas from Human Habitats, Asembo, Kenya. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 13, 550–558. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1123>

Kent, R.J., 2009. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. *Mol. Ecol. Resour.* 9, 4–18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02469.x>

Katoh K, Misawa K, Kuma K, Miyata T (2002) MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res* 14:3059–3066

Labruna, M.B., Whitworth, T., Bouyer, D.H., Camargo, L.M.A., Camargo, E.P., Popov, V., Walker, D.H., Labruna, M.B., Whitworth, T.E.D., Bouyer, D.H., Bride, J.M.C., Camargo, L.M.A., Camargo, E.P., Popov, V., 2004. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia , Western Amazon, Brazilian Journal of Medical Entomology, 41, 1073–1081. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1073>

Li, H., Zhang, P.H., Huang, Y., Du, J., Cui, N., Yang, Z.D., Tang, F., Fu, F.X., Li, X.M., Cui, X.M., Fan, Y. Di, Xing, B., Li, X.K., Tong, Y.G., Cao, W.C., Liu, W., 2018. Isolation and Identification of *Rickettsia raoultii* in Human Cases: A Surveillance Study in 3 Medical Centers in China. *Clin. Infect. Dis.* 66, 1109–1115. <https://doi.org/10.1093/cid/cix917>

Loyola, S., Flores-Mendoza, C., Torre, A., Kocher, C., Melendrez, M., Luce-Fedrow, A., Maina, A.N., Richards, A.L., Leguia, M., 2018. *Rickettsia asemboensis* Characterization by Multilocus Sequence Typing of Complete Genes, Peru. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 931–933. <https://doi.org/10.3201/eid2405.170323>

Maina, A.N., Luce-Fedrow, A., Omulo, S., Hang, J., Chan, T.C., Ade, F., Jima, D.D., Ogola, E., Ge, H., Breiman, R.F., Njenga, M.K., Richards, A.L., 2016. Isolation and characterization of a novel *Rickettsia* species (*Rickettsia asemboensis* sp. nov.) obtained from cat fleas (*Ctenocephalides felis*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 4512–4517. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001382>

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>

Milhano, N., Palma, M., Marcili, A., Núncio, M.S., de Carvalho, I.L., De Sousa, R., 2014. *Rickettsia*

lusitaniae sp. nov. isolated from the soft tick *Ornithodoros erraticus* (Acarina: Argasidae). Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis. 37, 189–193. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.01.006>

Muñoz-Leal, S., Martins, M.M., Nava, S., Landulfo, G.A., Simons, S.M., Rodrigues, V.S., Ramos, V.N., Suzin, A., Szabó, M.P.J., Labruna, M.B., 2020. *Ornithodoros cerradoensis* n. sp. (Acar: Argasidae), a member of the *Ornithodoros talaje* (Guérin-Méneville, 1849) group, parasite of rodents in the Brazilian Savannah. Ticks Tick. Borne. Dis. 101497. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101497>

Muñoz-Leal, S., Terassini, F.A., Luz, H.R., Fontana, I., Camargo, L.M.A., Labruna, M.B., 2018. First report of *Ornithodoros peropteryx* in Brazil, and the occurrence of *Ornithodoros cavernicolous* in the western Brazilian Amazon. Syst. Appl. Acarol. 23, 2113–2121. <https://doi.org/10.11158/saa.23.11.4>

Muñoz-Leal S., Faccini-Martínez, Á.A., Costa, F.B., Marcili, A., Mesquita, E.T.K.C., Marques, E.P., Labruna, M.B. 2018. Isolation and molecular characterization of a relapsing fever *Borrelia* recovered from *Ornithodoros rufus* in Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 9(4):864-871. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.008>

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>

Parola, P., Rovery, C., Rolain, J.M., Brouqui, P., Davoust, B., Raoult, D., 2009. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in Tick-borne Rickettsioses. Emerg. Infect. Dis. 15, 1105–1108. <https://doi.org/10.3201/eid1507.081449>

Pérez-Osorio, C.E., Zavala-Velázquez, J.E., León, J.J.A., Zavala-Castro, J.E., 2008. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. Emerg. Infect. Dis. 14, 1019–1023. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071656>

Podboronov VM, Pchelkina AA (1989) Characteristics of the transphase and transovarial transmission of *Rickettsia sibirica* by ixodid and argasid ticks. (in Russian) Med Parazitol (Moscow) July–August:14–18.

Raoult, D., Fournier, P.E., Eremeeva, M., Graves, S., Kelly, P.J., Oteo, J.A., Sekeyova, Z., Tamura, A., Tarasevich, I., Zhang, L. 2005. Naming of Rickettsiae and rickettsial diseases. Ann N Y Acad Sci. 1063:1-12. <https://doi.org/10.1196/annals.1355.002>

Reeves, W.K., Loftis, A.D., Sanders, F., Spinks, M.D., Wills, W., Denison, A.M., Dasch, G.A., 2006. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acar: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. Exp. Appl. Acarol. 39, 321–329. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9012-7>

Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., Branch, R.Z., 1991. Genotypic Identification of *Rickettsiae* and Estimation of Intraspecies Sequence Divergence for Portions of Two Rickettsial Genes, Journal of bacteriology.

Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A.M., Schumaker, T.T.S., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M.B., 2005. *Rickettsial* infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. Emerg. Infect. Dis. 11, 265–270. <https://doi.org/10.3201/eid1102.040656>

Scarpulla, M., Barlozzari, G., Marcario, A., Salvato, L., Blanda, V., Liberato, C. De, Agostini, C.D., Torina, A., Macrì, G., 2016. Ticks and Tick-borne Diseases Molecular detection and characterization of spotted fever group rickettsiae in ticks from Central Italy. Ticks Tick. Borne. Dis. 7, 1052–1056. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.06.003>

Speck, S., Derschum, H., Damdindorj, T., Dashdavaa, O., Jiang, J., Kaysser, P., Jigjav, B., Nyamdorj, E., Baatar, U., Munkhbat, E., Choijilsuren, O., Gerelchuluun, O., Römer, A., Richards, A.L.,

Kiefer, D., Scholz, H., Wölfel, R., Zöller, L., Dobler, G., Essbauer, S., 2012. *Rickettsia raoultii*, the predominant Rickettsia found in Mongolian *Dermacentor nuttalli*. Ticks Tick. Borne. Dis. 3, 227–231. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.04.001>

Špitalská, E., Štefanidesová, K., Kocianová, E., Boldiš, V., 2012. Rickettsia slovaca and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor marginatus* and *Dermacentor reticulatus* ticks from Slovak Republic. Exp. Appl. Acarol. 57, 189–197. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9539-8>

Szabó, M.P.J., Spolidorio, M.G., Martins, T.F., 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 719–728. <https://doi.org/10.1017/S0031182012002065>

Tian, Z.C., Liu, G.Y., Shen, H., Xie, J.R., Luo, J., Tian, M.Y., 2012. First report on the occurrence of *Rickettsia slovaca* and *Rickettsia raoultii* in *Dermacentor silvarum* in China. Parasites and Vectors 5, 19. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-19>

Vitale, G., Mansueto, S., Rolain, J.M., Raoult, D., 2006. *Rickettsia massiliae* human isolation [5]. Emerg. Infect. Dis. 12, 174–175. <https://doi.org/10.3201/eid1201.050850>

Weinert, L.A., Werren, J.H., Aebi, A., Stone, G.N., Jiggins, F.M., 2009. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. BMC Biol. 7, 1–15. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6>

Yan, P., Qiu, Z., Zhang, T., Li, Y., Wang, W., Li, M., Yu, Z., Liu, J., 2019. Microbial diversity in the tick *Argas japonicus* (Acari: Argasidae) with a focus on *Rickettsia* pathogens. Med. Vet. Entomol. 33, 327–335. <https://doi.org/10.1111/mve.12373>

Anexo I. Números de acesso das sequências disponíveis no Genbank utilizadas na elaboração das árvores filogenéticas.

| Espécie de <i>Rickettsia</i> spp. | Gene e nº de acesso | | |
|--|---------------------|----------------|-------------|
| | <i>gltA</i> | <i>ompA</i> | <i>ompB</i> |
| <i>Rickettsia prowazekii</i> | | | CP004889 |
| <i>Candidatus Rickettsia Senegalensis</i> | | | KT304219 |
| <i>Rickettsia felis</i> | NC_007109.1 | NC_007109.1 | AF182279 |
| <i>Rickettsia lusitaniae</i> | - | - | JQ771937 |
| <i>Candidatus Rickettsia asembonensis</i> | MK923743 | MK923742 | JN315972 |
| <i>Rickettsia hoogstraalii</i> | CCXM01000001 | CCXM01000001 | EF629536 |
| <i>Rickettsia akari</i> | CP000847 | CP000847 | AF123707 |
| <i>Rickettsia australis</i> | CP003338 | CP003338 | AF123709 |
| <i>Rickettsia montanensis</i> | NC_017043 | NC_017043 | AF123716 |
| <i>Candidatus Rickettsia andeanae</i> | GU169051 | JN180850 | GU395297 |
| <i>Rickettsia amblyommatis</i> an13 | - | - | CP015012.1 |
| <i>Rickettsia amblyommatis</i> Ac37 | CP012420 | CP012420 | - |
| <i>Rickettsia amblyommatis</i> GAT-30V | CP003334 | CP003334 | - |
| <i>Rickettsia amblyommatis</i> Ac/pa | KX151486 | LANR01000001.1 | - |
| <i>Rickettsia</i> sp. ARANHA | - | - | AY360214 |
| <i>Rickettsia</i> sp. AL | EU274654 | EU274656 | EU274657 |
| <i>Rickettsia raoultii</i> Khabarovsk | CP010969 | CP010969 | EU036984 |
| <i>Rickettsia raoultii</i> IM16 | CP019435 | CP019435 | - |
| <i>Rickettsia aeschlimannii</i> | HM050289 | HM050290 | AF123705 |
| <i>Rickettsia rhipicephali</i> | CP013133 | CP013133 | DQ865209 |
| <i>Rickettsia massiliae</i> | CP000683 | CP000683 | AF123714 |
| <i>Rickettsia gravesii</i> | DQ269435 | DQ269437 | - |
| <i>Candidatus Rickettsia tasmanensis</i> | - | - | GQ223393 |
| <i>Rickettsia vini</i> | JF803266 | JF758828 | KT187395 |
| <i>Rickettsia japonica</i> | AP017580 | AP017580 | AF123713 |
| <i>Rickettsia japonica</i> argasii | JQ727682 | JQ727681 | JQ727680 |
| <i>Rickettsia heilongjansensis</i> | CP002912 | CP002912 | - |
| <i>Rickettsia conorii</i> | AE006914 | AE006914 | - |
| <i>Rickettsia honei</i> | AF022817 | AJTT01000010 | AF123711 |
| <i>Rickettsia peacockii</i> | HF912416 | HF912418 | - |
| <i>Rickettsia rickettsii</i> | CP000766 | CP000766 | GU395293 |
| <i>Candidatus Rickettsia wissemani</i> | LT558852 | LT558853 | LT558854 |
| <i>Candidatus Rickettsia nicoyana</i> | KX228143 | KY296502 | KX228145 |
| <i>Rickettsia philipii</i> | CP003308 | CP003308 | - |
| <i>Rickettsia slovaca</i> | CP002428 | CP002428 | AF123723 |
| <i>Rickettsia sibirica</i> | HM050296 | HM050272 | AY331393 |
| <i>Rickettsia</i> sp. NOD | EU567177 | EU567180 | - |
| <i>Rickettsia africae</i> | CP001612 | CP001612 | AF123720 |
| <i>Rickettsia parkeri</i> Portsmouth | CP003341 | CP003341 | - |
| <i>Rickettsia parkeri</i> Maculatum 20 | - | - | AF123717 |
| <i>Rickettsia parkeri</i> str. Atlantic rainforest | KJ855083 | KJ855085 | GQ855236 |
| <i>Rickettsia canadensis</i> | CP000409 | CP000409 | - |

