

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS**

**Investigação da presença de *Rickettsia* em diferentes espécies de carrapatos
infestando gambás (*Didelphis albiventris*) e capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*)
do Parque do Sabiá, Uberlândia, MG**

BRUNO TOLENTINO CAIXETA

UBERLÂNDIA, MG

Novembro-2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA E
PARASITOLOGIA APLICADAS

**Investigação da presença de *Rickettsia* em diferentes espécies de carrapatos
infestando gambás (*Didelphis albiventris*) e capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*)
do Parque do Sabiá, Uberlândia, MG**

**Dissertação apresentada à
Universidade de Uberlândia,
como parte das exigências
para obtenção do título de
mestre em Imunologia e
Parasitologia Aplicadas.**

Orientador: Prof. Dr. Jonny Yokosawa

Coorientador: Prof. Dr. Matias Juan Pablo Szabó

UBERLÂNDIA, MG

Novembro-2020

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

C138 2020	<p>Caixeta, Bruno Tolentino, 1984- Investigação da presença de <i>Rickettsia</i> em diferentes espécies de carrapatos infestando gambás (<i>Didelphis albiventris</i>) e capivaras (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>) do Parque do Sabiá, Uberlândia, MG [recurso eletrônico] / Bruno Tolentino Caixeta. - 2020.</p> <p>Orientador: Jonny Yokosawa. Coorientador: Matias Pablo Juan Szabó. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.di.2020.832 Inclui bibliografia. Inclui ilustrações.</p> <p>1. Imunologia. I. Yokosawa, Jonny, 1966-, (Orient.). II. Szabó, Matias Pablo Juan, -, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU: 612.017</p>
--------------	---

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado número 268 do PPIPA				
Data:	onze de dezembro de 2020	Hora de início:	14h00	Hora de encerramento:	16h30min
Matrícula do Discente:	11822IPA001				
Nome do Discente:	Bruno Tolentino Caixeta				
Título do Trabalho:	Investigação da presença de <i>Rickettsia</i> em diferentes espécies de carrapatos infestando gambás (<i>Didelphis albiventris</i>) e capivaras (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>) do Parque do Sabiá, Uberlândia, MG.				
Área de concentração:	Imunologia e Parasitologia Aplicadas				
Linha de pesquisa:	Biologia das interações entre patógenos e seus hospedeiros				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Detecção e caracterização molecular de microrganismos em artrópodes				

Reuniu-se, por vídeo conferência web, a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas, assim composta pelos Titulares: Prof. Dr. Taciano dos Reis Cardoso - Faculdade Patos de Minas - (FPM); Dra. Maria Marlene Martins - Pós-Doc - ICBIM/UFU; Prof. Dr. Jonny Yokosawa - (Presidente) - ICBIM/UFU, orientador do candidato.

Iniciando os trabalhos o presidente da mesa, Prof. Dr. Jonny Yokosawa, apresentou a Comissão Examinadora e o candidato, agradeceu a presença do público, e concedeu ao discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do discente, o tempo de arguição e de resposta foram conforme as normas do programa.

A seguir o senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos(às) 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.

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

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.



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 **Taciano dos Reis Cardoso, Usuário Externo**, em 14/12/2020, às 18:48, 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 **Maria Marlene Martins, Usuário Externo**, em 15/12/2020, às 16:44, 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 **2455596** e o código CRC **25260EA4**.

“Há uma força motriz mais poderosa que o vapor, a eletricidade e a energia atômica: a vontade.”
(Albert Einstein)

Dedico esse trabalho aos meus familiares,
pais e irmã, que sempre souberam me incentivar e
apoiar em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Esse trabalho não seria possível sem o apoio de muitas pessoas que obtive durante todo esse processo.

Agradeço a todos de forma especial:

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonny Yokosawa, pela oportunidade, pela dedicação e paciência.

A todos os profissionais ligados ao Laboratório de Ixodologia- UFU pela atenção e ajuda e em especial ao meu coorientador Prof. Dr. Matias Juan Pablo Szabó pelas amostras cedidas a mim para realização deste trabalho.

A Graziela Virginia Tolesano-Pascoli a contribuição de seus dados para enriquecimento deste trabalho.

A todos os meus colegas de curso que fiz durante todo esse tempo.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	8
1.1 Carrapatos	8
1.1.2 Doenças causadas por patógenos transmitidos por carrapatos.....	13
1.2 <i>Rickettsia</i> spp.	15
1.3 Capivaras	21
1.4 Gambás	23
1.5 Outros reservatórios	24
1.6 Febre Maculosa.....	26
2. OBJETIVOS.....	29
3. MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Local de Estudo	29
3.2 Coleta de carrapatos	31
3.3 Análise molecular	
3.3.1 Extração de DNA	32
3.3.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR).....	32
3.4. Purificação dos produtos de PCR, sequenciamento nucleotídico e análise da sequência	35
4. RESULTADOS	35
5. DISCUSSÃO.....	41
6. CONCLUSÕES.....	46
REFERÊNCIAS.....	46

RESUMO

Localizado em Uberlândia, o Parque do Sabiá é o principal parque público da cidade e habitat de várias espécies de animais, dentre eles, *Hydrochoerus hydrochaeris* e *Didelphis albiventris*, os quais tiveram coletados entre os anos de 2010 e 2013 carrapatos, que foram armazenados no Laboratório de Ixodologia – UFU. O presente estudo objetivou a investigação da presença de bactérias do gênero *Rickettsiae*, nesses carrapatos. Foram utilizados trezentos e vinte e um carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum* (adultos e ninfas), *Amblyomma dubitatum* (ninfas), *Ixodes loricatus* (adultos e ninfas) e bolos de larvas de *Amblyomma* sp., combinados em cento e noventa e oito amostras de DNA. Realizou-se PCR das extrações e eletroforese em gel de agarose para visualização de bandas moleculares. Destas extrações, trinta e uma apresentaram banda positiva para rRNA 16S. Destas, doze amostras apresentaram amplificação para um segmento da sequência do gene *gltA* de *Rickettsia* spp. e também amplificação específica para *gltA* de *R. bellii*, oito amostras de *A. dubitatum*, uma de *A. sculptum*, duas de *Amblyomma* sp. larvas e uma de *I. loricatus*. Três dessas amostras, uma de *A. dubitatum*, uma de *A. sculptum* coletados de capivara e uma de *I. loricatus* de gambá foram sequenciados e suas sequências de nucleotídeos eram idênticas uma da outra. Essas sequências também eram idênticas às sequências *gltA* de *R. bellii* da Colômbia (MT174170, de *Ixodes tropicalis*), Argentina (MH282858, de *Amblyomma ovale*), EUA (MN372317, de *Rhipicephalus sanguineus*), e vários locais do Brasil (MK962697, de *Amblyomma aureolatum*, no estado do Espírito Santo; MN064678, estado do Rio de Janeiro, de *Amblyomma longirostre*; MH236876, de *Amblyomma rotundatum*, no estado do Amapá; e outros). Apesar de não ter sido detectada a presença de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa neste estudo e *R. bellii* apresentar patogenicidade indeterminada em humanos, a presença de *A. sculptum* e *A. dubitatum* em animais que vivem no Parque do Sabiá reforça a necessidade do monitoramento da presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos e seus hospedeiros, pois o aumento da população desses animais pode favorecer o desenvolvimento de vetores e possíveis casos de doença.

Palavras-chave: *Rickettsia*, Carrapato, Febre Maculosa Brasileira;

ABSTRACT

Located in Uberlândia, the Sabiá Park is the main public park of the city and habitat of several animal species, among them, *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Didelphis albiventris*, which were collected between 2010 and 2013 ticks, which were stored in the Ixodology Laboratory - UFU. This study aimed to investigate the presence of bacteria of the genus *Rickettsia* in these ticks. Three hundred and twenty one ticks of the species *Amblyomma sculptum* (adults and nymphs), *Amblyomma dubitatum* (nymphs), *Ixodes loricatus* (adults and nymphs) and cakes of larvae of *Amblyomma* sp. were used, combined in one hundred and eighty five DNA samples. A PCR of the extractions and electrophoresis in agarose gel was performed for visualization of molecular bands. Of these extractions, thirty one presented positive band for rRNA 16S. Of these, twelve samples showed amplification for a segment of the *gltA* gene sequence of *Rickettsia* spp. and also specific amplification for *gltA* of *R. bellii*, eight samples of *A. dubitatum*, one of *A. sculptum*, two of *Amblyomma* sp. larvae and one of *I. loricatus*. Three of these samples, one from *A. dubitatum*, one from *A. sculptum* collected from capybara and one from *I. loricatus* from opossum were sequenced and their nucleotide sequences were identical to each other. These sequences were also identical to the *gltA* sequences *R. bellii* from Colombia (MT174170, by *Ixodes tropicalis*), Argentina (MH282858, by *Amblyomma ovale*), USA (MN372317, by *Rhipicephalus sanguineus*), and several locations in Brazil (MK962697, by *Amblyomma aureolatum*, in the state of Espírito Santo; MN064678, state of Rio de Janeiro, by *Amblyomma longirostre*; MH236876, by *Amblyomma rotundatum*, in the state of Amapá; and others). Although the presence of *Rickettsia* from the macular fever group was not detected in this study and *R. bellii* presents undetermined pathogenicity in humans, the presence of *A. sculptum* and *A. dubitatum* in animals that live in the Sabiá Park reinforces the need to monitor the presence of *Rickettsia* spp. in ticks and their hosts, because the increase in the population of these animals may favor the development of vectors and possible cases of disease.

Keywords: *Rickettsia*, Tick, Brazilian Spotted Fever;

1. INTRODUÇÃO

Muitos artrópodes, incluindo carrapatos, são vetores de grande variedade de patógenos que causam doenças em animais domésticos e selvagens e humanos, cujas morbidade e mortalidade vem aumentando nas últimas décadas. As alterações constantes na biodiversidade, mudanças climáticas e a interferência humana tornam esse mecanismo cada vez mais frequente (DE LA FUENTE et al., 2016; MANSFIELD et al., 2017; ARAÚJO et al., 2019; FONSECA et al., 2020). Dentre as principais doenças de importância para a saúde humana causadas por patógenos transmitidos por vetores artrópodes estão a dengue, a febre amarela, a encefalite causada por vírus, a borreliose de Lyme e as riquetsioses (CIOTTI et al., 2018; JAHFARI et al., 2017; ROSENBERG et al., 2018; PADDOCK et al., 2008; PADDOCK et al., 2015; STRAILY et al., 2016; HERRICK et al., 2016). Já para a área da veterinária, estão a babesiose, erliquiose, anaplasmose, dentre outras (TODD et al., 2015; HERWADT et al., 2011; HARRIZ et al., 2016). No entanto, novos exemplos de doenças virais e bacterianas transmitidas por carrapatos estão sendo constantemente relatadas (VOORDOUW, 2015).

1.1 Carrapatos

O estudo de algumas espécies de carrapatos é de extrema importância para saúde pública e animal em todo o mundo, pois existem aproximadamente 900 espécies de carrapatos descritas com ocorrência em diversos países, biomas e ecossistemas. Essa irregularidade está relacionada à especificidade ecológica do carrapato e à ocorrência e disponibilidade de hospedeiros (GUGLIELMONE et al., 2010; BARBIERI et al., 2019).

Os carrapatos são parasitas hematófagos pertencentes ao filo Arthropoda de grande importância médico-veterinária e sua relação com seus hospedeiros e patógenos pode ser complexa. Além disso, também estão difundidos no ambiente, pois podem passar boa parte da vida fora dos hospedeiros (DE LA FUENTE et al., 2016; RAMOS et al., 2019).

As diferentes espécies de carrapatos possuem diversidade no mecanismo de repasto sanguíneo, o que influencia diretamente na evolução dos estágios larval, de ninfa e adulto, sendo os componentes da saliva dos carrapatos essenciais para essa relação

(PAROLA et al., 2013; DALL'AGNOL et al., 2019). A saliva do carrapato é uma mistura complexa de compostos bioquímicos. Análises proteômicas dos transcriptomas de glândulas salivares sugerem que a alimentação do carrapato leva à regulação positiva de expressão de proteínas no carrapato; quando secretados, promovem a ligação deste ao hospedeiro, inibem as respostas imunológicas do mesmo, como a coagulação do sangue, e inibem a multiplicação microbiana (KARIM & RIBEIRO, 2015; RIBEIRO, SLÓVAK, FRANCISCHETTI, 2017; HOVIUS et al., 2008). Isso permite que o carrapato possa ser infectado por algum patógeno em qualquer estágio de seu ciclo de vida, que essa infecção persista em cada estágio do desenvolvimento, via transmissão transestadial e possibilite a transmissão no próximo estágio de vida do micro-organismo para outro hospedeiro (PAROLA et al. 2013; DALL'AGNOL et al., 2019).

A transmissão de micro-organismos para o carrapato ocorre no momento do repasto de sangue de um hospedeiro infectado, enquanto a co-alimentação é uma forma de transmissão entre carrapatos que ocorre quando vários carrapatos se alimentam em proximidade, permitindo que o agente seja transferido entre eles (BELLI et al., 2017).

A maioria das espécies de carrapatos Ixodídeos podem permanecer se alimentando no hospedeiro por vários dias, o que parece favorecer a transferência de patógenos ao hospedeiro através da saliva do carrapato, caso ele esteja infectado (KARBOWIAK et al., 2016). Quando o carrapato entra em contato com a bactéria, não é necessário um período mínimo de tempo para que a transmissão aconteça, esse fato ocorre assim que ele se conecta ao hospedeiro (LEVIN et al., 2020).

Um estudo mostrou que estágios de desenvolvimento de vida livre entre diferentes espécies de carrapatos sofrem essa interferência ambiental. Comparando-se espécies de *A. dubitatum* e *A. sculptum*, observou-se que a primeira apresentou maiores taxas de sobrevivência quando foram submersos em água por diferentes períodos de tempo. Por outro lado, taxas maiores de sobrevivência foram observadas para *A. sculptum* quando foram incubados em condições cuja umidade relativa do ar era mais baixa. Estes resultados sugerem que *A. dubitatum* é mais resistente a habitats e solos úmidos do que *A. sculptum*, enquanto que esta última espécie é mais resistente a habitats mais secos (LUZ et al., 2019).

Entre as espécies de carrapatos que mais afetam seres humanos no continente americano, estão o *Ixodes scapularis*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma sculptum*, *Dermacentor variabilis* e *Ornithodoros* spp., que são considerados vetores de diversos patógenos como *Rickettsia rickettsii*, *Ehrlichia muris eauclairensis*, *Babesia microti*, *Powassan virus* e diferentes espécies de *Borrelia* (MENTZ et al., 2016).

No Brasil, os carrapatos são compreendidos por 75 espécies de carrapatos, sendo a maioria deles associados a animais selvagens descritas (DANTAS-TORRES et al., 2019; MARTINS et al., 2019; MUÑOZ-LEAL et al., 2020; ONÓFRIO et al., 2020). Muitas dessas espécies são agressivas a humanos, parasitismo que geralmente acontece de forma ocasional, possivelmente quando humanos se deslocam para áreas onde ocorrem infestações de carrapatos (apud TOLESANO-PASCOLI, 2014). As espécies como *A. sculptum*, *A. aureolatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma dubitatum* e *Ornithodoros brasiliensis* foram relatadas em casos envolvendo picadas em humanos e várias dessas espécies estão envolvidas no ciclo de transmissão de doenças (OGRZEWALSKA et al., 2012; LABRUNA et al., 2014; DONALISIO et al., 2020; KRRAWCZAL et al., 2014; NAVA et al., 2014; WECK et al., 2017; MORAES-FILHO et al., 2018; BRITES-NETO et al., 2018), embora o *A. sculptum*, encontrado em muitas regiões do sudeste e centro-oeste, seja considerado o vetor mais agressivo e comum da febre maculosa brasileira (FMB) (LABRUNA et al., 2014; KRAWCZAK et al., 2014; MORAES-FILHO et al., 2018; BRITES-NETO et al., 2018).

O *A. sculptum* apresenta baixa especificidade entre hospedeiros e pode parasitar diversos animais selvagens, domésticos e seres humanos. No entanto, capivaras, antas (*Tapuris terrestris*) e cavalos (*Equus caballus*) são seus principais hospedeiros. A presença desses animais em parques públicos ou privados, associada à presença de espécies de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa GFM e infestações de carrapatos, torna esses locais áreas de risco, podendo ocasionar problema de saúde pública (PACHECO et al., 2009).

O *A. aureolatum*, encontrado em regiões de Mata Atlântica, geralmente está associado à FMB através de picadas ocasionais em humanos, muitas vezes trazido por animais domésticos, quando estes acabam sendo parasitados por carrapatos infectados provenientes de animais silvestres (LAVINA et al., 2011).

O *A. ovale* está envolvido com uma riquetsiose branda se comparada a causada pela *R. rickettsii*, com agente etiológico conhecido como *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (SPOLIDORIO et al., 2010). Essa espécie possui uma relação filogenética próxima às espécies *R. sibirica*, *R. parkeri* e *R. africae*, pertencentes ao GFM (SABATINI et al., 2010).

Os carrapatos da espécie *A. dubitatum* também são comuns em regiões do Sudeste e Centro-Oeste brasileiro, cuja presença de *Rickettsia bellii*, de patogenicidade desconhecida em humanos, parece ser comum e relatada em diversos estudos, o que faz dessa espécie de carrapato representar um papel indeterminado como vetor de patógenos causadores de riquetsiose (ALMEIDA et al., 2011; LABRUNA et al., 2004; PACHECO et al., 2009; MATIAS et al., 2015; SAKAI et al., 2014; LABRUNA et al. 2007; NAVA et al., 2010; LABRUNA, 2012; WECK et al., 2017; MONJE et al., 2015; SZABÓ et al., 2007).

A ocorrência *A. dubitatum* e *A. sculptum* parasitando animais é frequentemente relatada, principalmente em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e gambás (*Didelphis* spp.), animais comuns em regiões endêmicas para FMB (LUZ, et al., 2019; POLO et al., 2017; MONTENEGRO et al., 2017; PASCUCCI et al., 2019). O gênero *Ixodes*, composto por muitas espécies, também é conhecido por não possuir especificidade parasitária, sendo encontrado em diversos animais, incluindo gambás (BARROS-BATTESTI et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2001; HORTA et al., 2006; KRAWCZAK et al., 2016).

A espécie *Ornithodoros brasiliensis* foi descrita por causar uma síndrome não-infecciosa que leva a alterações sistêmicas e lesões graves no local da picada, além disso em condições de pesquisa se mostrou um vetor em potencial para transmissão de *Borrelia* (DALL'AGNOL et al., 2019).

Além das já citadas anteriormente, outras espécies de carrapatos são conhecidas por também causar doenças em seres humanos, como é o caso do *Dermacentor andersoni*, que induz casos de paralisia no Canadá, e o *Ornithodoros savignyi*, agente causador de uma síndrome grave e muitas vezes letal em regiões da África. Porém, são patologias que

parecem estar mais associadas a toxinas salivares do que a agentes infecciosos (MORSHED, et al., 2017; MANS et al., 2002).

O presente estudo teve como objetivo principal investigar a presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos das espécies *A. sculptum* (Figura 1), *A. dubitatum* (Figura 2), *Ixodes loricatus* (Figura 3) e larvas de *Amblyomma* sp. (Figura 4), que foram encontrados em capivaras e gambás do Parque do Sabiá, um parque público da cidade de Uberlândia, MG.

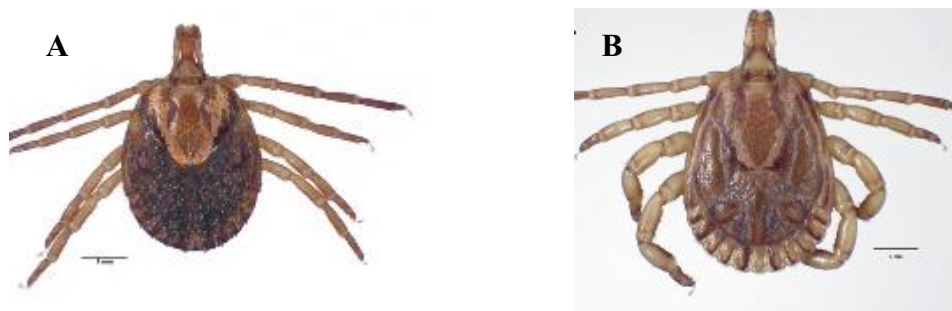


Figura 1: Espécie de carrapato *Amblyomma sculptum*, sendo: (A) fêmea e (B) macho. (Fonte: NAVA et al., 2014).

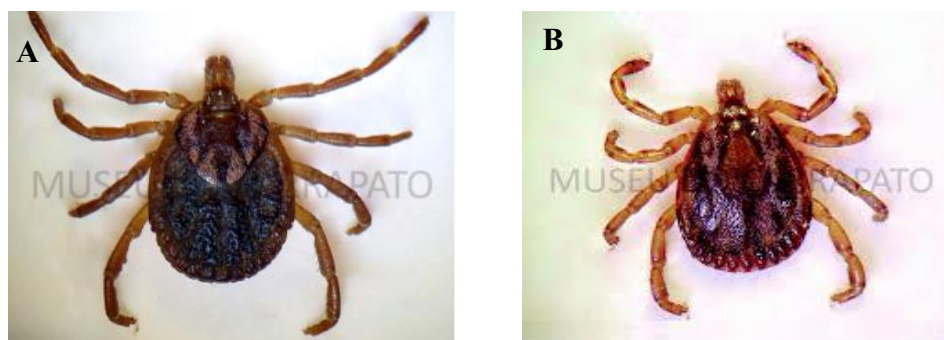


Figura 2: Espécie de carrapato *Amblyomma dubitatum*, sendo: (A) fêmea e (B) macho. (Fonte: Museu do carrapato, 2018)



Figura 3: *Ixodes loricatus*, adulto. (Fonte: Museu do carrapato, 2018)



Figura 4: Ninfas de *Amblyomma* sp. (Fonte: MARIA OGRZEWALSKA, 2012).

1.1.2 Doenças causadas por patógenos transmitidos por carrapatos

Algumas espécies patogênicas de *Borrelia* são responsáveis por muitos casos de doença em diversos países, como a Borreliose de Lyme (BL) e a febre recorrente no hemisfério norte (CIOTTI et al., 2018; JAHFARI et al., 2017). Os sintomas da BL mais comuns são, febre, dores de cabeça, dores musculares, erupção cutânea e complicações neurológicas e renais (ROSS RUSSELL et al., 2018); para a febre recorrente os mais comuns são, febre intermitente, vômitos, dores de cabeça e dores no corpo (WARRELL, 2019).

Carrapatos infectados com a bactéria estão presentes em muitas áreas de florestas e bosques, em diversos países. Nos Países Baixos, houve um forte aumento no número

de consultas médicas com picadas de carrapatos e eritema migratório: de 73 mil consultas para picadas de carrapatos em 2006 para 93 mil em 2009 e um aumento de pacientes com eritema migratório de 17 mil em 2006 para 22 mil em 2009 (RIJKSINSTITUUT, 2015). Os Países Baixos estão entre os países com maior incidência relatada de BL em todo o mundo, com uma incidência média de aproximadamente 134 casos por 100 mil habitantes por ano. Em relação à febre recorrente, mais de 500 casos confirmados foram relatados nos EUA no período entre 1990 e 2011 (CIOTTI et al., 2018; ROSENBERG et al., 2018; SYKES & MAKIELLO, 2017).

As riquetsioses são doenças transmitidas principalmente por carrapatos e estão entre as principais doenças emergentes em todo o mundo. No Brasil, a principal doença transmitida por carrapatos é a FMB, cujo agente etiológico é a *Rickettsia rickettsii*. Os sintomas mais comuns da FMB são eritema no local da picada do carrapato, febre alta, dores de cabeça, dores no corpo, vômito e diarreia (DEL FIOLE et al., 2010). A sintomatologia observada pela *R. parkeri* cepa Mata Atlântica é semelhante ao da doença causada por espécies nos EUA, ou seja, febre, escara, erupção cutânea, dores de cabeça e no corpo (SPOLIDORIO et al., 2010).

Nas últimas décadas, o interesse mundial pelas infecções humanas causadas pelo gênero *Rickettsia* é crescente. Novas espécies têm sido identificadas em diversos países, em grande parte graças ao avanço dos métodos de diagnóstico (BERMÚDEZ & TROYO, 2018). A importância e o estudo das doenças causadas por riquetsias em saúde pública vêm ganhando cada vez mais espaço, pois estão associadas a artrópodes vetores com ampla distribuição geográfica.

O estudo da infecção por bactérias transmitidas por carrapatos pode fornecer informações gerais e conhecimento dos sintomas relacionados a cada agente causador de doença. Sendo assim, o estudo da ixodofauna em uma determinada região é fundamental para a saúde pública devido ao grande número de agentes etiológicos e hospedeiros envolvidos na epidemiologia das doenças causadas por patógenos transmitidos por carrapatos e vital na preservação de espécies de animais selvagens (FONSECA et al., 2020).

Nos últimos anos, doenças parasitárias e bacterianas transmitidas por vetores surgiram em muitas regiões geográficas e a ecologia e a epidemiologia dessas doenças são afetadas pelas inter-relações entre os hospedeiros e patógenos. O estudo e a compreensão dessa relação junto com o desenvolvimento de novas técnicas de diagnóstico tem permitido aos pesquisadores diagnosticar e rastrear melhor os agentes, sua origem e rotas de infecção, e desenvolver programas preventivos de saúde pública e intervenção (HARRUS & BANETH, 2005).

Considerando as dimensões territoriais extensas do Brasil, com a grande variedade de regiões e biomas, é evidente que o conhecimento existente sobre patógenos de carrapatos, seus hospedeiros e suas associações estão longe de serem completas.

A detecção molecular de agentes infecciosos é uma ferramenta muito importante para levantamento e melhor compreensão de dados, sejam eles ecológicos, epidemiológicos e clínicos, além de identificação das espécies e sua virulência.

1.2 *Rickettsia* spp.

As espécies de *Rickettsia* são bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias que possuem a capacidade de infectar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, principalmente por meio da transmissão pela picada de vetores artrópodes hematófagos. Apesar da baixa prevalência desses micro-organismos na natureza em certos países, como Brasil e China eles são frequentemente negligenciados como uma importante causa de doença em todo o mundo (ABREU et al., 2019; QIN et al., 2019; BLANTON, 2019). Isso se deve em parte às manifestações clínicas inespecíficas, que geralmente são confundidas com outras doenças infecciosas de caráter febril agudas endêmicas em muitas regiões tropicais e subtropicais e de difícil diagnóstico, pela indisponibilidade de testes rápidos para detectar a infecção durante a fase aguda. A confirmação do diagnóstico, quando solicitada, geralmente é realizada por retrospectiva pelo uso de métodos sorológicos (BLANTON, 2019).

O gênero *Rickettsia* foi determinado de acordo com características morfológicas, metabólicas e antigênicas. Porém, com o avanço de técnicas metodológicas, diferentes abordagens têm fornecido novos aspectos sobre classificação e evolução das espécies

(NOH et al., 2017; BERMÚDEZ & TROYO, 2018). Os nove grupos que compõem o gênero são divididos de acordo com características filogenéticas diferentes. O GFM compreende os agentes causadores de doença que são transmitidos por carrapatos ixodídeos, o grupo tifo (GT), o agente causador do tifo transmitido por pulgas e piolhos, o grupo de transição (GTR), transmitido por pulgas, ácaros e carrapatos, o grupo Bellii, o grupo *Rickettsia canadenses*, o grupo Helvetica, o grupo Scapularis, o grupo Adalia e o grupo Hydra (BLANTON 2019; NOH et al., 2017; MURRAY et al., 2016).

As espécies patogênicas são as que formam GT e GFM. O GT inclui duas espécies, *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, ambas parecem cosmopolitas por causa da ampla distribuição geográfica de seus vetores. São conhecidas 27 espécies, divididas entre os 9 grupos: *Rickettsia coronii caspia*, *Rickettsia coronii israelenses*, *Rickettsia coronii indica*, *Rickettsia coronii coronii*, *R. rickettsii*, *Rickettsia peacockii*, *Rickettsia slovaca*, *Rickettsia africae*, *R. parkeri*, *Rickettsia sibirica sibirica*, *Rickettsia sibirica mongolitimonae*, *Rickettsia montanensis*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia massiliae*, *R. helvetica*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia prowazekii*, *Rickettsia typhi*, *Rickettsia canadenses*, *Rickettsia philipii*, *Rickettsia amblyomatis* e *Rickettsia bellii* (PAROLA et al., 2013). As espécies do GFM apresentam distribuições geográficas variáveis de acordo com a ocorrência de seus principais vetores de carrapatos (SOCOLOVSKI et al., 2009). Dentre as espécies do GFM, *R. rickettsii* é o agente que causa a mais importante doença causada por patógenos transmitidos por carrapatos nas Américas, conhecida como febre maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) nos EUA e FMB, pois apresenta elevadas taxas de mortalidade em casos não tratados (BERMÚDEZ & TROYO, 2018).

A *R. rickettsii* era descrita como sendo o único agente etiológico da riquetsiose do GFM em humanos presente no continente americano (LABRUNA, 2009). Aspectos ecológicos de *R. rickettsii* indicam que ela é um agente raramente encontrado em condições naturais em populações de carrapatos, ocorrendo em menos de 0,1% de carrapatos em regiões endêmicas, o que possivelmente se deve ao efeito patogênico da *Rickettsia rickettsii* nesses vetores (LUZ et al., 2019; POLO et al., 2017; MORAES-FILHO et al., 2018).

Em meados da década de 1930, nos EUA, uma outra espécie, *R. parkeri* foi identificada pela primeira vez em carrapatos *Amblyomma maculatum* no estado do Texas (PARKER et al., 1939). Vários estudos na América do Sul, anos mais tarde, demonstraram a *R. parkeri* como agente causador de doença febril associada a picadas de carrapatos *A. maculatum* (VARELA-STOKES et al., 2011; WRIGHT et al., 2011; NODEN; ROSELLI; LOSS, 2020). Em 2004, nos EUA *R. parkeri* foi relatada como sendo um novo agente etiológico do GFM (VENZAL et al., 2004; PADDOCK et al., 2004). Atualmente, a infecção por essa bactéria é reconhecida como segunda riquetsiose mais significativa nos EUA, Brasil e Argentina e a mais importante riquetsiose no Uruguai (VENZAL et al., 2004; PORTILHO et al., 2013).

Até o ano de 2000 apenas três espécies de *Rickettsia* eram conhecidas na América Latina: *R. rickettsii*, *R. prowazekii* e *R. typhi* (LABRUNA, 2009). Atualmente, outras espécies adicionais foram identificadas e isoladas a partir de carrapatos: *R. massiliae*, *R. africae*, *R. philipii*, *R. coronii*, *R. japonica*, *R. honei*, dentre outras espécies (PAROLA et al., 2013; MAGAIA et al., 2019).

Três espécies de *Rickettsia* do GFM são reconhecidas como patógenos humanos nos EUA: *Rickettsia rickettsii*, o agente da FMRR, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia philipii* cepa 364D, agente da febre do carrapato da costa do Pacífico (PADDOCK et al., 2008; PADGETT et al., 2016). No Brasil três espécies de *Rickettsia* tem sido associadas a focos de doenças, a *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (WECK et al., 2017; SPOLIDORIO et al., 2010; SILVEIRA et al., 2007).

No Brasil, estudos eco-epidemiológicos para outras espécies de *Rickettsia*, realizados em São Paulo, Bahia e Santa Catarina apontam para um ciclo enzoótico no qual a circulação e à amplificação de *R. parkeri* ocorre em pequenos roedores e carrapatos da espécie *A. ovale*. Portanto, é bastante provável que esse agente possa ser endêmico em outros estados nos quais casos humanos ainda sejam desconhecidos (SZABÓ et al., 2013; NASSER et al., 2015; MEDEIROS et al., 2011). Já a riquetsiose da Mata Atlântica, associada a *R. parkeri*, é uma doença menos grave, relatada em diversas regiões do Brasil, onde o carrapato associado é da espécie *A. ovale* (CAMPOS et al., 2020; SZABÓ et al., 2013; SABATINI et al., 2010).

A ocorrência dessas doenças e a presença dos patógenos em outras localidades do mundo (PAROLA et al., 2013; FANG et al., 2017; KLEIN et al., 2019) são descritas cada vez com maior frequência, devido à proximidade cada vez maior dos humanos com o meio ambiente, onde circulam os animais silvestres que servem como hospedeiros dos carrapatos. Além disso, o fato do mundo se tornar cada vez mais globalizado, o risco de adquirir esses patógenos durante uma viagem e trazê-los a seu país de origem pode ocorrer. De fato, as riquetsioses causadas por patógenos do GFM têm sido cada vez mais documentadas em viajantes, especialmente aqueles que visitam a África subsariana, e o tifo murino em pessoas que visitam o sudeste da Ásia e os EUA (BLANTON, 2019).

Em países asiáticos, como Coreia do Sul, Japão e Tailândia, os primeiros casos de riquetsiose, cujo agente etiológico relatado foi a *Rickettsia japonica*, foram descritos pela primeira vez em 2005 por meio de análises sorológicas de indivíduos que apresentavam mal estar, dor de cabeça, erupções cutâneas e febre (CHOI et al., 2005). Esses casos foram avaliados por métodos moleculares baseados na sequência do gene *ompB* presente em *Rickettsia* spp., demonstrando semelhança com *R. conorii*, *R. akari*, *R. japonica* e *Rickettsia sibirica* (NOH et al., 2017; QIN et al., 2019).

Na Rússia, na região do Extremo Oriente, foram identificados dois tipos de infecção por patógenos transmitidos por carrapatos, conhecidos como riquetsiose transmitida por carrapato do Extremo Oriente, tendo como agente etiológico a *Rickettsia heilongjiangensis*, considerada mais prevalente, e a do tifo do carrapato siberiano, causada pela *R. sibirica* sub. *sibirica*. Ambas, porém possuem manifestações clínicas semelhantes, incluindo dor de cabeça, dor muscular, febre alta, erupção cutânea e escara no local da picada do carrapato. Vale salientar que foram descritas em outras regiões do mesmo país, infecções causadas por outros agentes, como a *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia japonica* e “*Candidatus Rickettsia tarasevichiae*” (YGOLKINA et al., 2018).

Na região da Sardenha, a riquetsiose conhecida como febre maculosa do Mediterrâneo e os casos de doenças associadas a carrapatos têm sido relatados cada vez com mais frequência (MADEDDU et al., 2016). De acordo com o Instituto Superior de Saúde da Itália, Epidemiologia para Saúde Pública, a incidência é de 10/10.000 habitantes por ano. Os agentes etiológicos patológicos detectados em carrapatos da Sardenha foram *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia conorii israeliensis*, *Rickettsia*

slovaca, *Rickettsia helvetica* e *Rickettsia monacensis*. Além disso, duas espécies de *Rickettsia*, de patogenicidade ainda desconhecida, identificadas como *Rickettsia hoogstralii* e “*Candidatus Rickettsia barbariae*”, foram previamente descritas (CHISU et al., 2018).

No Norte da África um estudo recente evidenciou em carrapatos *Ornithodoros* sp. a presença de duas novas espécies de *Rickettsia*, pertencentes ao grupo de transição. Espécies deste gênero de carrapato comumente carregam os agentes da febre recorrente (*Borrelia crocidurae* e *Borrelia hispânica*) e os vírus da peste suína africana, mas nunca foram encontrados como transmissores de *Rickettsia* patogênica (BUYASSE & DURON 2020).

Outras espécies de *Rickettsia* de patogenicidade ainda desconhecida foram isoladas de diversas espécies de carrapatos, dentre elas *Rickettsia amblyommatis* detectadas em carrapatos *A. cajannense* l.s., *Rickettsia rhipicephali* em *Haemaphysalis juxtakochi* e *Rickettsia bellii* considerada de maior prevalência no Brasil, encontrada em *A. dubitatum*, *I. loricatus* e *Amblyomma longirostre* (ALMEIDA et al., 2011; PAROLA et al., 2013; SZABÓ et al., 2013).

No gênero *Rickettsia*, a espécie que apresenta o maior número de registros infectando carrapatos é *R. bellii* (HORTA et al., 2006), uma espécie de patogenicidade indeterminada em humanos (LABRUNA et al., 2009). Além disso, estudos relataram a infecção por *R. bellii* em inúmeras espécies de carrapatos no Brasil (*A. dubitatum*, *A. sculptum*, *Amblyomma naponense*, *Amblyomma incisum*, *A. aureolatum* e *A. ovale*) e nos EUA (*Dermacentor variabilis*, *Dermacentor occidentalis*, *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor albipictus*, *Dermacentor parumapertus*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Ornithodoros concanensis*) (PACHECO et al., 2009; SAKAI et al., 2014; HORTA et al., 2007; PINTER & LABRUNA, 2006; HORTA et al., 2007; MCINTOSH et al., 2015; BARBIERI et al., 2012).

Rickettsia bellii foi isolada pela primeira vez em 1966 de carrapatos *Dermacentor variabilis* coletados em Arkansas, EUA, e posteriormente detectada em muitas outras espécies de carrapatos, incluindo *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor albipictus*,

Dermacentor parumapertus, *Ornithodoros concanensis*, *Argas cooleyi*, entre outras espécies (MEDIANNIKOV; PAROLA; RAOULT, 2007).

Durante décadas, *R. bellii* foi caracterizada como um organismo não patogênico, entretanto, a inoculação subcutânea dessa *Rickettsia* produziu escara em coelhos e cobaias, sugerindo que seu papel como um potencial patógeno para humanos merece consideração adicional (OGATA et al., 2008). A sua classificação e, portanto, inclusão tanto no GT e GFM não foi possível devido à particularidade antigênica e genética observada em *R. bellii* (PAROLA et al., 2013).

Testes moleculares para detecção de *Rickettsia* são indispensáveis na compreensão epidemiológica, clínica e na identificação da espécie envolvida, por meio do sequenciamento dos genes detectados. No presente estudo, as reações em cadeia da polimerase (PCRs) tiveram como alvo sequências dos genes que codificam para citrato sintase (*gltA*) presente em todas as espécies de *Rickettsia*, para uma proteína importante da membrana externa (*OmpA*) presente em espécies de *Rickettsia* do GFM, para citrato sintase presente somente em *R. bellii* e para o RNA ribossômico 16S de carrapatos, que é utilizada tanto para avaliar a qualidade das amostras de DNA obtidas como para determinar a espécie do carrapato por meio do sequenciamento nucleotídico do produto amplificado em caso de dúvida (EREQAT et al., 2016; WEINERT et al., 2009; TOMASSONE et al., 2018). De maneira simplificada, a primeira PCR permite detectar o material genético (DNA) de *Rickettsia* spp. presente em uma amostra, enquanto que a análise da sequência nucleotídica do produto formado possibilita a identificação da espécie da *Rickettsia* detectada. A segunda PCR é específica para uma sequência presente em *R. bellii*, permitindo assim a identificação desta espécie, no caso de ocorrer a amplificação, sem a necessidade da análise da sequência nucleotídica do produto de PCR.

Na infecção em hospedeiros vertebrados, como as espécies de *Rickettsia* que compõem o GFM possuem proteínas com sequências de aminoácidos semelhantes, ocorre a produção de anticorpos que reagem com antígenos de outras espécies do micro-organismo, característica conhecida como reatividade cruzada. Neste contexto, o ensaio de imunofluorescência indireta, realizada com antígenos de diferentes espécies de *Rickettsia*, é o teste sorológico considerado de referência para o diagnóstico ou identificação de infecções causadas por *Rickettsia* em humanos e animais, domésticos ou

selvagens (PACHECO et al., 2007). No teste, quando uma amostra é reativa, é sugerida que a infecção tenha sido provavelmente causada por uma determinada espécie quando o título de anticorpos é pelo menos quatro vezes maior para o antígeno desta espécie em comparação ao das outras (PAERH: provável antígeno envolvido na reação homóloga) (SPOLIDORIO et al., 2013; SANGIONI et al., 2011; LABRUNA et al., 2007; HORTA et al., 2004). Porém, em muitos casos, não há a identificação da espécie da *Rickettsia* responsável pela infecção (SZABÓ et al., 2013). Isso se deve à reatividade de uma amostra com os antígenos de diferentes espécies de *Rickettsia* (reatividade cruzada). Assim, *R. amblyommatis*, que presumivelmente não é patogênica a humanos e está presente em 30 a 45% dos carrapatos da espécie *Amblyomma americanum* em várias regiões do estado da Geórgia, nos EUA, pode ter sido responsável por mais de 70% dos casos diagnosticados como FMRR, devido à reatividade cruzada dos soros com antígenos de *R. rickettsii*, mas que não atendiam aos critérios do país na definição de caso (STRAILY et al., 2020; HECHT et al., 2019).

1.3 Capivaras

A capivara, *Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766, é considerado o maior roedor herbívoro semi-aquático do mundo, amplamente distribuído na América do Sul, com organizada estrutura hierárquica e forte organização social. Habitam extensa faixa territorial brasileira associada a cursos de água, como rios e lagos artificiais ou naturais, que fornecem proteção e ambientação climática, sendo um recurso fundamental (ASSIS et al., 2019; ROCHA et al., 2017; LANGONI et al., 2016).

As florestas fornecem abrigo contra o calor diurno e um local de descanso à noite e as plantas herbáceas baixas representam o principal componente da dieta desses animais. Compreender como as capivaras selecionam seus habitats em paisagens com diferentes níveis de perturbação antrópica e a cobertura vegetal pode ter implicações importantes para as relações ecológicas entre capivaras, carrapatos e transmissão de patógenos (DIAS et al., 2020). Devido à substituição da mata nativa por culturas agrícolas e à ausência de predadores naturais em áreas antropizadas, nos últimos anos, grupos desses animais estão cada vez mais presentes em algumas regiões do Brasil. Diante disso, o contato desses animais com os seres humanos se torna cada vez mais frequente e preocupante, devido ao fato de esses roedores serem considerados reservatórios

universais de vários patógenos (ASSIS et al., 2019; ROCHA et al., 2017; LANGONI et al., 2016).

As capivaras são frequentemente infestadas por carrapatos *A. dubitatum* e *A. sculptum*, logo uma grande população de capivaras pode provocar uma grande infestação ambiental de carrapatos. Como *A. sculptum* é o principal vetor transmissor da *R. rickettsii* a humanos, a presença desses animais e carrapatos infectados pela bactéria representam um papel muito importante na epidemiologia da FMB (QUEIROGAS et al., 2012).

É importante destacar que as ninfas, larvas e adultos de *A. sculptum* são parcialmente refratários à infecção por *R. rickettsii*, e menos da metade das fêmeas infectadas transmitem a bactéria aos seus descendentes (transmissão transovariana) (LABRUNA et al., 2011; SOARES et al., 2012). Portanto, a infecção por *R. rickettsii* não pode ser sustentada no carrapato por gerações sucessivas sem a ocorrência de novas infecções por meio da transmissão do micro-organismos durante a alimentação em hospedeiros amplificadores, como é o caso das capivaras (HORTA et al., 2009; Labruna 2009). Esse fato, associado a um menor desempenho reprodutivo e uma maior mortalidade de carrapatos infectados, quando comparados a não infectados, causa uma infecção por *R. rickettsii* em *A. sculptum* em áreas endêmicas para febre maculosa baixa, geralmente menor que 1% (CAMPOS et al., 2020; HECHT et al., 2019; MATIAS et al., 2015; MORAES-FILHO et al., 2018; GERARDI et al., 2019). Todavia, é importante salientar que outras espécies de carrapatos também foram encontradas parasitando esses animais, como é o caso do *Amblyomma dubitatum*, embora não possua envolvimento direto na epidemiologia da FMB (ALMEIDA et al., 2011; LABRUNA et al. 2007; LABRUNA, 2012; MONJE et al., 2015; SZABÓ et al., 2013; SAKAI et al., 2014).

De acordo com LABRUNA (2009), os requisitos necessários para um hospedeiro amplificador ideal são: ser abundante em uma área endêmica para a doença, ser um hospedeiro importante para o carrapato vetor, ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*, ser capaz de manter o agente etiológico em seu organismo por tempo e quantidades suficientes para infectar outros carrapatos que se alimentam nele e possuir uma alta taxa de reprodução, introduzindo constantemente animais jovens na população, pois são susceptíveis à infecção por *R. rickettsii*, visto que ainda não possuem resposta imunológica específica contra o patógeno.

Esse cenário pode estar associado a diferentes suscetibilidades entre populações distintas de carrapatos, hospedeiros e os tipos variáveis de transmissão de *R. rickettsii*, seja ela por co-alimentação, convencional, transovariana e transtadial. Isso sugere que pode aumentar ainda mais as taxas de infecção por essa espécie de bactéria. Estratégias e medidas de controle devem ser de caráter amplo, e não determinadas apenas em vetores transmissores de doença, pois somente elas não são suficientes para a prevenção dessa doença infecciosa (POLO et al., 2017; GERARDI et al., 2019; MORAES-FILHO et al., 2018).

A interferência humana em ambientes ecológicos tem alterado a distribuição da vida selvagem, atividade, comportamento, movimento e seleção de habitat desses animais. Nesse contexto, estudar essa relação entre humanos, animais selvagens e relacioná-los à epidemiologia de zoonoses, é de extrema importância para saúde pública (DIAS et al., 2020).

1.4 Gambás

Os marsupiais do gênero *Didelphis Linnaeus*, 1758 são pequenos animais que compreendem um grupo de 350 espécies existentes no continente americano, encontradas principalmente na América do Sul (SANTOS et al., 2019).

As populações de marsupiais são bons indicadores de mudanças ambientais com implicações associadas à saúde pública, uma vez que essa espécie é um reservatório para agentes protozoários, como *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp., e bacterianos como as do gênero *Rickettsia* (SANTOS et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2019). Esse parasitismo apresenta diferentes níveis de interdependência ao longo do tempo, geralmente associado a uma interação desfavorável ao indivíduo, dependente dos fatores intrínsecos relacionados ao hospedeiro (raça, idade, estado nutricional e sexo), ao parasita (diferentes cepas com diferentes graus de virulência e coinfeccções), e ao ambiente (condições climáticas severas, disponibilidade de alimento e diminuição do habitat original) (NANTES et al., 2019).

Dentre as espécies de marsupiais, *Didelphis albiventris* Lund 1841 (gambá-de-orelha-branca) é considerada onívora, possui ampla capacidade de se adaptar em áreas urbanas e periurbanas, pois seleciona seu habitat através da disponibilidade alimentar. Encontrados em diversos tipos de vegetação, possui hábito noturno com registros desses animais nos habitats do Cerrado, Pantanal, Pampas e até mesmo em zonas de transição entre esses biomas (NASCIMENTO et al., 2019; SANTOS, et al., 2019).

Marsupiais também são considerados prováveis hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* em carrapatos da espécie *A. sculptum* na natureza (LABRUNA, 2012). HORTA e colaboradores (2009) demonstraram de forma experimental a transmissão de *R. rickettsii* de uma espécie de gambá (*Didelphis aurita*) para *A. sculptum*. Esses animais também podem servir como sentinelas, por meio de testes sorológicos, permitindo investigar a circulação de agentes riquetsiais em uma área específica e possíveis implicações associadas à saúde pública (SZABÓ et al., 2019; SANTOS, et al., 2019; NASCIMENTO et al., 2019; MILAGRES et al., 2013). Estudos recentes forneceram evidências de que a degradação de espaços florestais provocou o aumento da circulação de gambás em áreas antropizadas e conseqüentemente a infestação de carrapatos, favorecendo o contato de humanos e animais domésticos a agentes riquetsiais (LOPES et al., 2018; OGRZEWALSKA et al., 2012; SCINACHI et al., 2017).

1.5 Outros reservatórios

Outros animais vertebrados servem como hospedeiros para uma grande variedade de espécies de carrapatos. Diante disso, no mesmo habitat que as capivaras, muitos animais podem servir como dispersor de patógenos, podendo adquirir e transportar carrapatos que fizeram, anteriormente, o repasto sanguíneo nas capivaras, possibilitando a propagação tanto de carrapatos, como de *Rickettsia* para outros locais (MILAGRES et al., 2013; SCINACHI et al., 2017; SZABÓ et al., 2019).

Os cavalos são prováveis reservatórios para a febre maculosa devido a sua relação de hospedeiro definitivo para carrapatos *Amblyomma cajennense* (MILAGRES et al., 2010). Apesar de não ser considerada uma doença clínica nesses animais, há também a ocorrência de poucos registros de doenças nesses animais justificada pela baixa intensidade dos sintomas como febre, taquipneia e anorexia branda (FREESE &

SHEATS, 2019). No Brasil, levantamentos sorológicos realizados em equinos encontraram altas porcentagens de animais positivos para *R. rickettsii* em regiões endêmicas, com valores superiores aos observados para cães e humanos; e em regiões não endêmicas, as frequências de equinos positivos são frequentemente menores. Diante disso, esses animais podem ser considerados sentinela para a presença desse patógeno (UENO, 2014). Os cães, assim como os equinos podem ter também um importante papel na cadeia epidemiológica da FMB, pois a prevalência de reações sorológicas positivas em cães em uma área geográfica põe em evidência o risco de infecção humana, pois os cães serviriam como hospedeiros sentinelas dessa doença (BERMÚDEZ & TROYO 2018).

As aves migratórias também representam um grupo importante, apesar de *Rickettsia rickettsii* nunca ter sido detectada em carrapatos coletados desses animais, foi detectada em espécies do complexo *Amblyomma cajennense* e em *A. aureolatum*, carrapatos que foram detectados em habitats e associação com aves no Brasil (PAROLA et al., 2013; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016).

Em tecidos de morcegos da espécie *Pipistrellus pipistrellus* foram encontrados DNAs de *R. parkeri*, *Rickettsia lusitaniae*, *Rickettsia slovacica* e *Rickettsia raoultii*, enquanto que em carrapatos argasídeos da espécie *Argas vespertilionis* encontrados infestando esses animais apresentaram DNA de *R. rickettsii* e *R. raoultii* (ZHAO et al., 2020).

A presença de *Rickettsia* em carrapatos de animais domésticos e de criação também foi descrita. Assim, *R. rickettsii* e outras espécies de *Rickettsia* do GFM foram detectadas em carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus microplus*, em *Dermacentor nitens* e em pulgas *Ctenocephalides felis* e *Ctenocephalides canis* coletados de cães (*Canis familiares*), gatos (*Felis catus*), bois (*Bos taurus*) e cavalos (*Equus caballus*) (MONTENEGRO et al., 2017; PACHECO-SOLANO et al., 2019).

Em outro estudo, também foi observado a presença de *Rickettsia*, no qual relatam a presença de *R. amblyommatis*, *R. monacensis* e *Rickettsia* sp. strain Colombianensi em carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados de diversas espécies de répteis (SANCHÉZ-MONTES et al., 2019).

Dados de outros trabalhos relatam a presença de *R. helvetica*, *R. hoogstraalii*, *R. monacensis* e *R. typhi* em carrapatos pertencentes aos gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Bothriocroton* e *Ixodes* (OGRZEWALSKA et al., 2019; BITAM et al., 2009; TIJSSE-KLASSEN et al., 2010; STENOS et al., 2003; WHIWORTH et al., 2003).

A intensa urbanização está cada vez mais presente no mundo atual, considerada uma das manifestações mais complexas e difundidas das mudanças ambientais administradas pelo homem. As áreas verdes são destacadas como multifuncionais para uma diversa rede de serviços, incluindo serviços de fornecimento da água, qualidade do ar, recreação, lazer e ecossistema diretamente relacionados à biodiversidade. No entanto, a modificação desses espaços também aumenta o risco de exposição humana a parasitas e patógenos associados a animais (RIZZOLI et al., 2014; USPENSKY 2014; PERINI & SABBION, 2016). Os autores ainda sugerem que o risco de infecções transmitidas por carrapatos deve ser levado em consideração ao projetar e criar espaços em áreas urbanas. Destacam também que nas áreas urbanas e suburbanas devem ser incluídas áreas de monitoramento de doenças associadas a carrapatos e campanhas de saúde pública, pois, apesar das densidades populacionais serem baixas, a prevalência de infecção por carrapatos e o risco de contato é alto.

1.6 Febre Maculosa

A febre maculosa brasileira é uma doença endêmica na região sudeste do Brasil, podendo atingir uma taxa de mortalidade de cerca de 50% (LUZ et al., 2019).

Foi relatada pela primeira vez em 1929 no estado de São Paulo (PIZA, MEYER, & GOMES, 1932), mas foi incluída na lista de doenças de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde apenas em 2001. Desde então, a FMB vem sendo considerada uma doença endêmica em muitas partes do sudeste do brasileiro, especialmente no estado de São Paulo, fato este que pode ser observado nos dados apresentados na Figura 5 (LUZ et al., 2019; COSTA et al., 2019; SINAN, 2019).

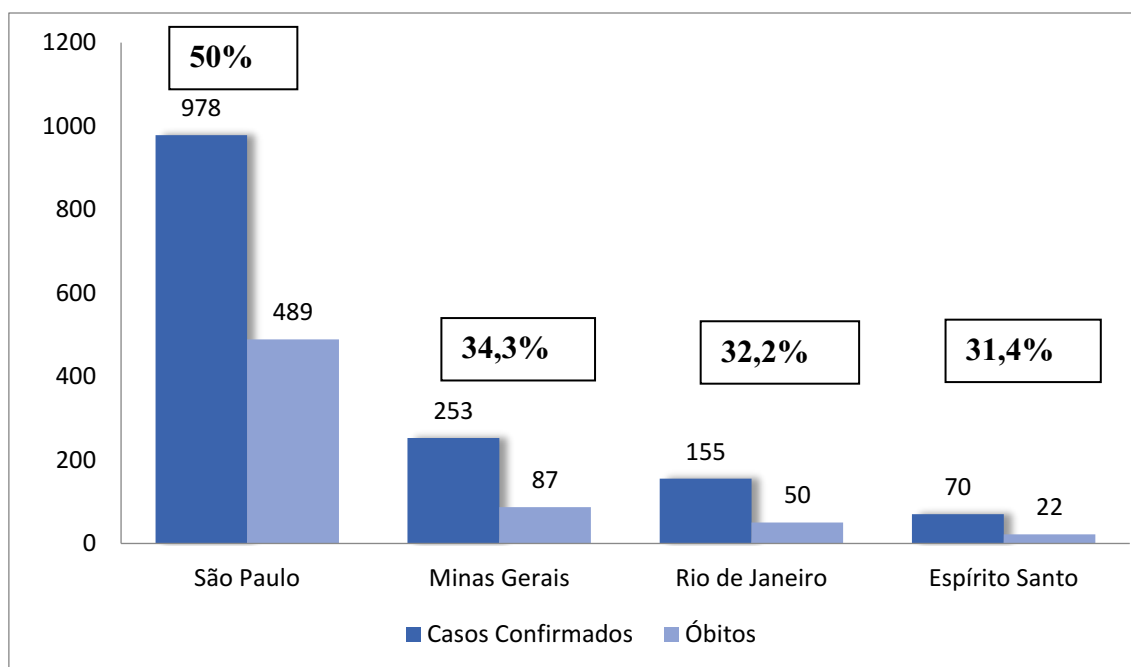


Figura 5: Números de casos confirmados e óbitos de febre maculosa na região Sudeste do Brasil, dos anos de 2001 a 2018, de acordo com dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN. BRASIL, 2019).

As taxas de letalidade atingiram valores próximos ou superiores a 30%, o que pode estar associado em muitos casos a um baixo índice de suspeita e erro no diagnóstico da doença ou até mesmo no tratamento realizado por profissionais de saúde (HERNANDÉZ et al., 2020).

Na natureza, a manutenção do ciclo de transmissão de agentes do GFM é favorecida pela capacidade dos carrapatos de atuarem como vetores, reservatórios e/ou amplificadores da bactéria (MONTENEGRO et al., 2017; PASCUCCI et al., 2019). Diversos estudos elucidaram fatores considerados determinantes na epidemiologia da FM no sudeste brasileiro.

O cenário epidemiológico em curso para a FM no sudeste brasileiro indica serem áreas de maior risco para a transmissão aquelas que se correlacionam às matas ciliares ou aos fragmentos arborizados, associadas à presença de capivaras, animais domésticos, selvagens e de carrapatos *A. sculptum*, com proximidade a córregos ou a cursos d'água, muitas vezes utilizados como áreas de lazer e para atividades ocupacionais (LABRUNA, 2013; SZABÓ et al., 2009; GUGLIELMONE et al., 2006; COUTO et al., 2015;

CAMPOS et al., 2020). Contudo, a situação acima em muitos municípios do sudeste brasileiro é comumente identificada e, apesar da comprovada endemidade, não ocorrem casos da doença entre humanos, o que poderia ser explicado pela subnotificação de casos e baixa taxa de infecção do artrópode (HORTA et al., 2004; HORTA et al., 2009).

No Brasil, as doenças são agrupadas por meio da vigilância sindrômica, de acordo com suas características mais frequentes, e isso leva em consideração as características epidemiológicas, a fim de diferenciar doenças exantemáticas da FMB. Quando não há relatos de parasitismo por meio de carrapatos ou quando o indivíduo não visitou nenhum ambiente em que exista risco de contato aos vetores, não pode ser considerado como diagnóstico de febre maculosa (FM) (BLANTON, 2019).

Em geral, a maioria dos casos de FM se concentram no período de maior ocorrência de ninfas, o que poderia ser explicado pela característica deste estágio evolutivo por sangue, menor tamanho, quando comparado aos outros estádios, além da alta competência vetorial em comparação aos demais estádios biológicos e aptas à disseminação espacial facilitada (PINTER et al., 2008; SOARES et al., 2012).

O exantema maculopapular é a principal manifestação clínica observada, mas 9% a 12% dos indivíduos infectados podem não apresentar este sinal, causando dificuldade em estabelecer o diagnóstico. Além disso, os sintomas iniciais da FMB são inespecíficos e podem ser confundidos com outras doenças, como dengue e leptospirose que apresentam altas incidências no estado de São Paulo (ANGERAMI et al., 2009; COUTO et al., 2015).

O diagnóstico laboratorial atualmente estabelecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) se dá através da sorologia pela técnica da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com amostras pareadas, e deve ser considerado confirmatório um aumento no título em uma segunda amostra a ser realizada após intervalo de quinze dias (GALVÃO et al., 2005).

2. OBJETIVOS

Com os carrapatos coletados em capivaras e gambás capturados no Parque do Sabiá:

Realizar o levantamento das informações da coleta: data, quantidade, espécie, estágio da vida no momento da coleta e em que hospedeiro foram coletados;

Realizar a pesquisa molecular de *Rickettsia* spp. nos carrapatos coletados;

Realizar a associação entre as amostras nas quais a bactéria foi detectada e as espécies dos carrapatos, estágios de vida e os hospedeiros em que foram coletados;

Identificar as espécies da *Rickettsia* detectadas por meio de sequenciamento nucleotídico dos produtos de PCR obtidos e análise de bioinformática.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Estudo

O estudo foi realizado na cidade de Uberlândia (Figura 5), em Minas Gerais, no Parque do Sabiá (Figura 6 e Figura 7), Brasil situado a 843 metros de altitude (18° 54' 41" S, 48° 15' 44" O). O Parque do Sabiá foi criado em 1982 e recebe diariamente mais de 10.000 pessoas. Possui uma área de 1.850.000 m², abrangendo um bosque de 350.000 m² de área verde, que abriga uma rica fauna de animais silvestres, um conjunto hidrográfico composto por três nascentes que abastecem sete represas e originam um grande lago e sete outros menores. Atualmente, sua administração fica a cargo da Fundação Uberlandense de Turismo, Esporte e Lazer (FUTEL). Além disso, possui um zoológico com dezenas de animais em cativeiro, uma estação de piscicultura com vários tanques, além de um pavilhão de 1.080 m² de área construída, que comporta 36 aquários e diferentes espécies de peixes, uma pista de caminhada arborizada de 5.100 metros de extensão, além de uma diversidade de quadras poliesportivas e campos de futebol, lanchonetes e vários recantos contemplativos, entre outras instalações, proporcionando à população da cidade de Uberlândia e visitantes um local para prática esportiva e diversas atividades de lazer (UBERLÂNDIA, 2020).

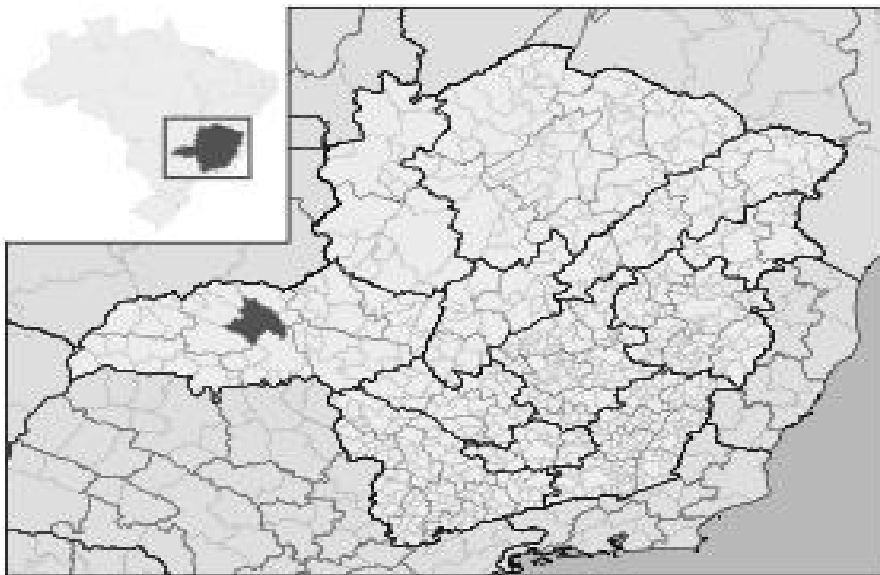


Figura 6: Mapa de Minas Gerais com destaque para a cidade de Uberlândia.

Fonte: MENDES; SORRATINI, 2014.

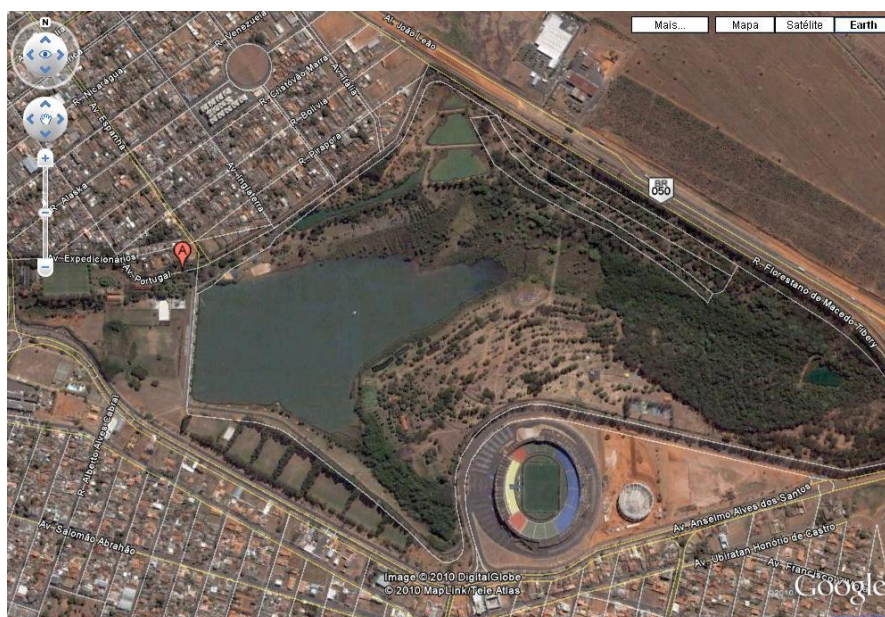


Figura 7: Vista aérea do Parque do Sabiá.

Fonte: Google Earth.



Figura 8: Lagoa do Parque do Sabiá.

Fonte: <https://www.uberlandia.mg.gov.br/parque-do-sabia/>.

3.2 Coleta de carrapatos

Os ectoparasitos foram coletados de 34 capivaras e 30 gambás do Parque do Sabiá, entre os anos de 2010 e 2013 (TOLESANO-PASCOLI, 2014). As capivaras foram cevadas, presas em bretes e depois sedadas (1 mg de xilazina e 10 mg de cetamina para cada quilograma do animal) e a coleta de carrapatos se deu por 10 min em cada capivara.

Os gambás foram capturados com auxílio de armadilhas tipo Sherman (tamanhos 43 x 12,5 x 14,5 cm e 25 x 8 x 9 cm) e armadilhas tipo Tomahawk (30 x 17,5 x 15,5). Para iscas utilizou-se mortadela. As armadilhas foram dispostas em transectos lineares a uma distância de dez metros entre os pontos previamente determinados. Os animais capturados foram anestesiados com cetamina (100mg/Kg) em associação com Acepromazina (5mg/Kg) e cada indivíduo identificado. Após a coleta dos carrapatos, os animais foram soltos no local de captura.

Posteriormente, os carrapatos foram colocados em tubos contendo álcool isopropílico e mantidos, em temperatura ambiente, no Laboratório de Ixodologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia até a utilização. Os carrapatos adultos foram identificados com o auxílio do estereomicroscópio utilizando chave dicotômica de acordo com ONÓFRIO et al. (2006). As ninfas do gênero *Amblyomma* e *Ixodes* foram identificadas de acordo com as chaves dicotômicas de acordo com MARTINS et al. (2010), BARROS-BATTESTI et al. (2006) e MARQUES et al. (2004).

A autorização para realização da pesquisa no Parque do Sabiá foi concedida pela Fundação Uberlandense de Turismo, Esporte e Lazer (FUTEL); a licença para captura e manuseio de animais e transporte de material biológico foi concedida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio) sob número 26445-2/2011-2013; e o estudo foi autorizado pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia sob protocolo CEUA/UFU 065/12.

3.3 Análise molecular

3.3.1 Extração de DNA

As extrações de DNA dos carrapatos foram feitas por meio da técnica adaptada de CHOMKZYNSKI (1993) e descrita por SANGIONI et al. (2005). Dentro de um microtubo, o primeiro passo foi cortar o carrapato com o auxílio de um bisturi e adicionou-se um volume de 150 µl de tampão TE modificado (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8,0). A mistura foi macerada com auxílio de um pistilo, seguida de agitação em um vortex por 15 s. Ao final da agitação, 450 µl do tampão GT foram adicionados e incubou-se a amostra por cerca de 10 min em temperatura ambiente, com agitação feita a cada 2 min. Após o intervalo, adicionaram-se 100 µl de clorofórmio e a mistura passou por mais uma agitação em vortex por cerca de 15 s, sendo que logo em seguida o tubo foi centrifugado a 11000 x g a 4 °C por 5 min. No fim do processo de centrifugação, 400 µl da fase superior (que contém o DNA do carrapato) foram transferidos para outro microtubo, ao qual foram adicionados 600 µl de isopropanol e, após uma breve agitação em vortex, o tubo foi centrifugado a 11000 x g a 4 °C por 15 min. No fim deste passo, descartou-se então o sobrenadante, foram adicionados 800 µl de álcool etílico 70% e o tubo foi centrifugado outra vez a 11000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e aguardou-se a secagem do *pellet* por alguns minutos. Assim, ao final deste processo, o DNA foi ressuspensão com 40 µl de TE modificado, estando pronto para uso em técnicas de PCR.

3.3.2 Reações em cadeia da polimerase (PCR)

Os *primers* utilizados em quatro PCRs no presente estudo estão descritos na tabela 1.

Inicialmente, foi realizada uma primeira PCR com o objetivo de avaliar a qualidade das amostras de DNA obtidas dos carrapatos. Esta PCR tinha como alvo um segmento do gene que codifica para o RNA ribossomal 16S de carrapatos. A ocorrência de amplificação indicava boa qualidade da amostra de DNA e, assim, seguia-se com as demais PCRs. A reação de amplificação seguinte consistia na detecção de DNA de bactérias do gênero *Rickettsia* (segmento do gene *gltA*) e, ocorrendo a detecção, seguia-se com uma PCR para detecção de uma sequência de DNA presente especificamente em *Rickettsia bellii* (segmento do gene *gltA* específico desta espécie) e outra para detecção de um segmento do gene *OmpA*, presente somente em espécies de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa.

Os reagentes e concentrações comuns em todas as reações foram os seguintes: tampão de PCR 1X (Tris-HCl 20 mM, KCl 50 mM, pH 8,4, fornecido pelo fabricante), MgCl₂ 1,5 mM, desoxirribonucleotídeos (dNTPs) 0,2 mM (cada dNTP), *Taq* DNA polimerase 1 U e 1 µl de amostra de DNA, em volume final de reação de 25 µl, com exceção da PCR para o gene rDNA 16S de carrapatos, que foi em volume de 20 µl. Além disso, as condições usadas foram de 3 a 10 min à 95 °C; 35 ciclos de 30 s à 95 °C, 30 s à temperatura específica para cada PCR (tabela 2) e 1 min à 72 °C; seguidos de 7 min à 72 °C. A água utilizada para o preparo da mistura de reação foi também utilizada em um dos tubos da reação como controle negativo.

Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,0% em tampão TBE 1X (Tris-borato 89 mM e EDTA 2,0 mM). Como padrão de peso molecular, foi colocado em um poço 0,1 µg do GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). A visualização do DNA foi realizada utilizando EasyView™ DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific) e o gel foi fotografado em transiluminador de luz UV com sistema de fotodocumentação.

Tabela 1: *Primers* utilizados nas PCRs no presente estudo:

Gene alvo e <i>Primers</i>	Concentração dos <i>Primers</i>	Temperatura de hibridização	Especificidade da PCR	Sequência dos <i>Primers</i> (5' → 3')	<i>Amplicon</i> (pb)	Referência
rDNA 16S			Carrapatos			
16S-F	1 µM	48°C		CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	460	MANGOLD
16S-R				GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT		et al., 1998
<i>gtaA</i>			<i>Rickettsia</i> spp.			
CS-78	0,8 µM	48°C		GCAAGTATCGGTGAGGATAT	401	LABRUNA
CS-323				GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		et al., 2004
<i>gtaA</i>			<i>Rickettsia</i>			
BELLI-F	0,8 µM	48°C	<i>bellii</i>	ATCCTGATTTGCTGAATTTTTT	338	SZABÓ
BELLI-R				TGCAATACCAGTACTGACG		et al., 2013
<i>OmpA</i>			Espécies de			
Rr190.70p	0,8 µM		<i>Rickettsia</i> do	ATGGCGAATAATTCTCCAAA	1° round:	REGNERY
Rr190.701		58 °C	Grupo da	GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	632	et al., 1991;
Rr190.602n	0,3 µM		Febre Maculosa	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	2° round: 532	ROUX et al., 1996

3.4 Purificação dos produtos de PCR, sequenciamento nucleotídico e análise da sequência

Os produtos de PCR com tamanhos aproximadamente o do esperado foram purificados (diretamente da reação ou, no caso da observação de amplificação inespecífica, a partir da banda formada no gel de agarose) utilizando o QIAquick® PCR Purification Kit (QIAGEN), seguindo as orientações dos fabricantes.

Cerca de 100 ng de cada produto de PCR purificado foram utilizados para sequenciamento nucleotídico com os mesmos *primers* utilizados na reação de amplificação. O sequenciamento foi realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares utilizando a plataforma AB 3.500.

Para a edição da sequência a partir dos eletroferogramas obtidos no sequenciamento, foi utilizado o programa SeqMan do pacote Lasergene versão 15.1 (DNASTAR). Para a busca por sequências similares, foi utilizada a ferramenta BLASTN (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

4. RESULTADOS

Durante o período de 2010-2013, 1.860 carrapatos foram coletados de capivaras (1272/1860, 68,4%) e gambás (588/1860, 31,6%) (Tabela 2). A maioria dos carrapatos era do gênero *Amblyomma* (1829/1860, 98,3%). Nas capivaras, a maioria dos indivíduos era de adultos de *A. dubitatum* (728/1272, 57,2%) e *A. sculptum* (474/1272, 37,3%), enquanto que nos gambás a maioria dos indivíduos era de larvas de *Amblyomma* sp. (457/588, 77,7%), além de adultos e ninfas de *I. loricatus* (15/588, 2,5%), larvas de *Ixodes* sp. e Argasidae (16/588, 2,7%).

Tabela 2: Espécies de carrapatos coletados de capivaras e gambás no Parque do Sabiá, Uberlândia, Brasil, de 2010 a 2013 (TOLESANO-PASCOLI, 2014).

Espécies hospedeiras	Carrapatos									Total
	<i>Amblyomma sculptum</i>		<i>Amblyomma dubitatum</i>		<i>Ixodes loricatus</i>		<i>Amblyomma</i> sp.	<i>Ixodes</i> sp.	Argasidae	
	adultos	ninfas	adultos	ninfas	Adultos	Ninfas	Larvas	larvas	larva	
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	474	12	728	51	0	0	7	0	0	1,272
<i>Didelphis albiventris</i>	1	20	0	79	12	3	457	15	1	588
Total	508		857		15		464	15	1	1,860

Para investigar a presença de *Rickettsia* spp. por PCR, foram testadas 185 amostras de DNA (153 amostras de carrapatos de capivaras e 32 amostras de carrapatos de gambás) de 321 carrapatos ninfas ou adultos (149 *A. sculptum*, 157 *A. dubitatum* e 15 *I. loricatus*; 239 carrapatos de capivaras e 82 de gambás), além de 13 amostras de larvas de *Amblyomma* sp. de gambás, totalizando 198 amostras. Doze delas (6,1%) apresentaram amplificação para um segmento da sequência do gene *gltA* de *Rickettsia* spp., oito amostras de carrapatos *A. dubitatum*, uma de *A. sculptum*, duas de larvas de *Amblyomma* sp. e uma de *I. loricatus* (Tabela 3).

Tabela 3. Identificação dos carrapatos de capivaras e gambás do Parque do Sabiá que apresentaram amplificação para o gene *gltA* de *Rickettsia* spp. e para o gene *gltA* de *R. bellii*.

Hospedeiros		Carrapatos		
Espécie	Identificação	Espécies	Fase evolutiva	Identificação da amostra de DNA
<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	C3	<i>A. dubitatum</i>	Adulto (macho)	D38
	C7	<i>A. dubitatum</i>	Adulto (macho)	D43
	C13	<i>A. dubitatum</i>	Adulto (macho)	D12
	C16	<i>A. dubitatum</i>	Adulto (macho)	DNA 6
	C21	<i>A. dubitatum</i>	Desconhecido	DNA 8
	C22	<i>A. dubitatum</i>	Desconhecido	DNA 2
	C33	<i>A. sculptum</i>	Adulto (macho)	D46
<i>Didelphis albiventris</i>	34	<i>I. loricatus</i>	Adulto	D20
	2612	<i>A. dubitatum</i>	Ninfa	D75
	2602	<i>A. dubitatum</i>	Ninfa	D79
	38	<i>Amblyomma</i> sp.	Larvas	D82
	2609	<i>Amblyomma</i> sp.	Larvas	D86

As taxas mínimas de infecção, considerando que em uma amostra preparada com um *pool* de carrapatos pelo menos um carrapato estava infectado com *R. bellii*, foram de 0,7% (1/149) para *A. sculptum*, 5,1% (8/157) para *A. dubitatum* e 6,7% (1/15) para *I. loricatus*. Ainda, assumindo que todas as larvas coletadas de um mesmo hospedeiro e no mesmo dia pertenciam ao mesmo bolo larval, originado de ovos postos por uma única fêmea, 15,4% (2/13) dos bolos larvais de *Amblyomma* sp. apresentaram infecção por *R. bellii*. Além disso, a infecção dessas larvas por *R. bellii* pode ter ocorrido por transmissão vertical (BURGDORFER & BRINTON, 1975; HETCH et al., 2019; SAKAI et al., 2014)

ou pela alimentação das larvas em um hospedeiro infectado. Nenhuma amplificação foi observada com a PCR direcionada ao gene *ompA*, que está presente em espécies de *Rickettsia* do GFM.

Os produtos de PCR direcionados ao gene *gltA* específico de *R. bellii* obtidos com três amostras, uma de *A. dubitatum*, uma de *A. sculptum* e uma de *I. loricatus*, foram sequenciados e suas sequências de nucleotídeos eram idênticas umas às outras (251 pares de base de comprimento). Os carrapatos *A. dubitatum* e *A. sculptum* dessas amostras foram coletados de capivara, enquanto o carrapato *I. loricatus* foi coletado de um gambá. Além disso, essas sequências também se mostraram idênticas às sequências descritas de *R. bellii* de várias regiões do Brasil e de outros países das Américas do Sul e do Norte (Figura 9).

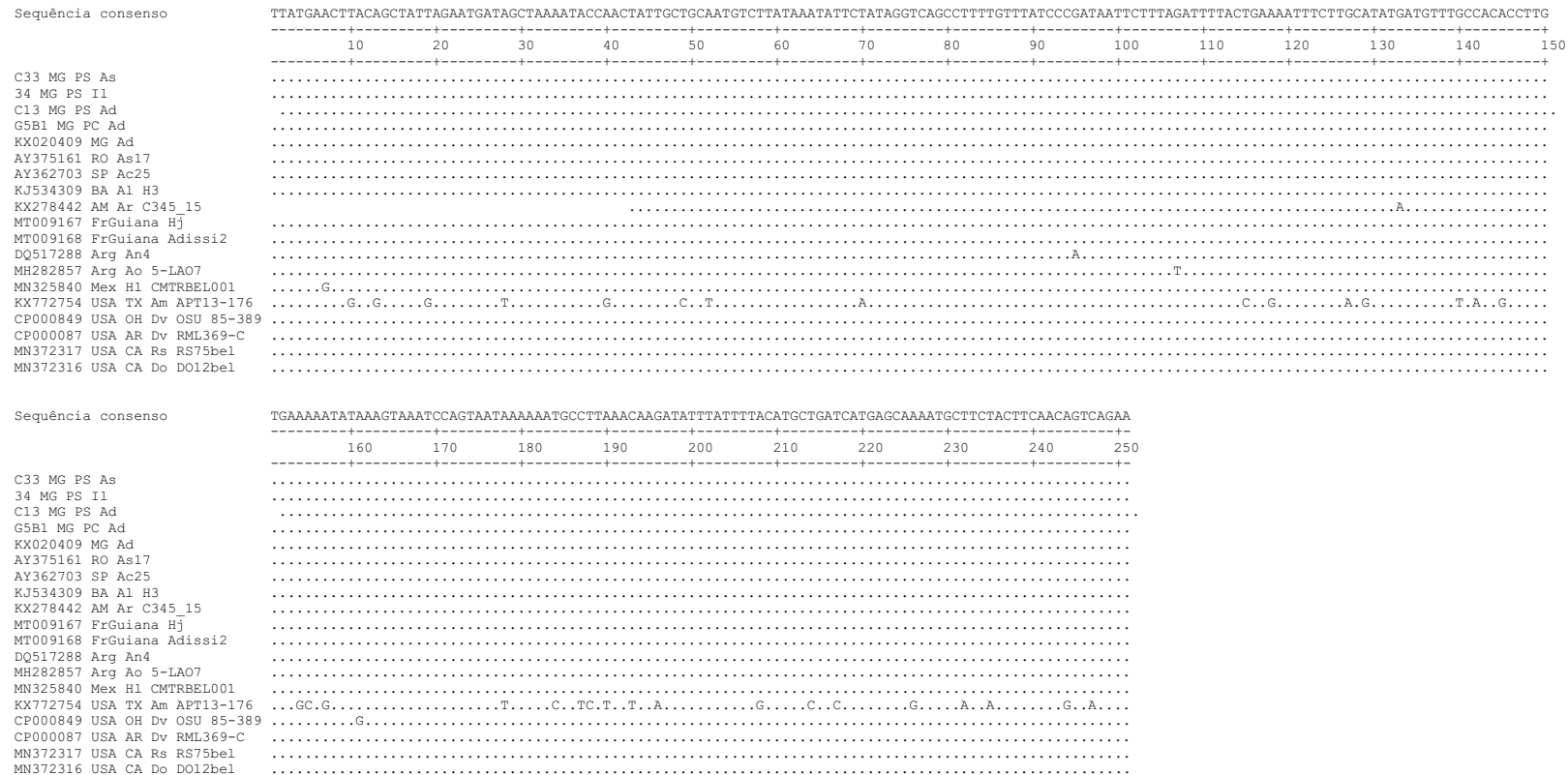


Figura 9: Alinhamento comparativo das sequências dos produtos de PCR, de parte do gene *gla*, detectados em carrapatos do Parque do Sabiá com sequências de *R. bellii* descritas de outros locais do Brasil e de outros países da América. A sequência consenso mostra a base mais frequente para cada posição dentre as sequências comparadas. Os pontos representam sequências semelhantes e as letras entre os pontos, bases divergentes. As três superiores são as sequências detectadas no presente estudo e os códigos indicam identificação do hospedeiro vertebrado, estado do Brasil onde os carrapatos foram coletados, iniciais do Parque do Sabiá e iniciais das espécies do carrapato (As: *Amblyomma sculptum*; Il: *Ixodes loricatus*; Ad: *Amblyomma dubitatum*). A quarta sequência (não publicada) foi obtida de carrapatos coletados no Praia Clube (PC),

também em Uberlândia. As demais sequências contêm o número de acesso, local e outras informações disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>).

Dentre as 34 capivaras capturadas, testes sorológicos para infecção causada por *Rickettsia* foram realizados com amostras de 31 delas, sendo que 19 capivaras (61,3%) se apresentaram reativas, por reação de imunofluorescência indireta (RIFI), com pelo menos um dos antígenos das cinco diferentes espécies de *Rickettsia* (TOLESANO-PASCOLI, 2014). Somente duas capivaras (2/31, 6,5%), C04 e C30, apresentaram reatividade para *R. bellii*, porém o provável antígeno envolvido na reação homóloga (PAERH) foi identificado apenas na primeira capivara (C04) (1/31, 3,2%). Apesar da baixa prevalência de infecção, ela está de acordo com a baixa frequência de amostras de carrapatos de capivaras nas quais este microrganismo foi detectado (2,9%, 7 amostras/239 carrapatos testados). Dos carrapatos em que o DNA de *R. bellii* foi detectado, nenhum deles foi coletado destas capivaras.

Por outro lado, dos 27 gambás, 14 (51,9%) gambás apresentaram reatividade contra *R. bellii*, sendo este o PAERH em sete deles (29,9%, 7/27) (TOLESANO-PASCOLI, 2014), e carrapatos coletados em quatro desses gambás apresentaram DNA de *R. bellii*. Esta prevalência de infecção foi maior que a taxa mínima de infecção do microrganismo nos carrapatos de gambás (5,3%, 5 amostras positivas em 95 carrapatos e bolos de larvas testados).

5. DISCUSSÃO

A presente investigação vem de estudos iniciais que visaram avaliar aspectos ecológicos relacionados a carrapatos e hospedeiros em áreas urbanas de Uberlândia (QUEIROGAS et al., 2012; TOLESANO-PASCOLI, 2014). Devido ao alto número de capivaras no Parque do Sabiá, que pode ter atingido mais de 150 indivíduos em 2008, que estava relacionado à alta infestação por carrapatos e reclamações dos visitantes pelas picadas por esses ectoparasitas, parte dessa população foi capturada e remanejada para a Reserva Particular do Patrimônio Natural Unidade de Conservação de Galheiros em Perdizes, MG.

Dos carrapatos analisados neste estudo, *A. sculptum* e *A. dubitatum* foram as espécies mais encontradas em capivaras e gambás do parque. As capivaras são frequentemente infestadas por essas espécies de carrapatos (QUEIROGAS et al., 2012). Os gambás também são hospedeiros importantes para uma grande variedade de carrapatos

dos gêneros *Amblyomma* e *Ixodes*. Fatos estes que podem ser observados em alguns estudos, nos quais a presença de adultos de *A. dubitatum* apresentou prevalência de 91,7% e ninfas 86,1% de carrapatos coletados de capivaras; em outro estudo, prevalência de *A. sculptum* e *A. dubitatum* seguidos de *Ixodes* sp. em gambás (DEBÁRBORA et al., 2014 e HORTA et al., 2007; DONALISIO et al., 2020) e os gambás do Parque do Sabiá apresentaram resultados semelhantes (TOLESANO-PASCOLI, 2014).

No Brasil, os carrapatos de *A. sculptum* são abundantes nas regiões sudeste e centro-oeste e sua ocorrência está associada a uma cobertura vegetal média e densa, composta por pastagens e vegetação secundária com gramíneas e arbustos esparsos (LABRUNA, 2009; ANGERAMI et al., 2006 ; DIAS & MARTINS, 1939; KATZ et al., 2009).

Amblyomma dubitatum possui ocorrência geográfica que abrange áreas do sul da América do Sul e partes das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil (LABRUNA et al., 2007; QUEIROGAS et al., 2012; SZABÓ et al., 2007).

É importante notar que embora *A. sculptum* e *A. dubitatum* coexistam no mesmo ambiente, o comportamento mais agressivo de *A. sculptum* observado por Pajuaba-Neto et al. (2018) na busca de hospedeiros, em comparação com *A. dubitatum*, representa maior risco de picada em humanos e, portanto, de transmissão de patógenos, como a *R. rickettsii*. (RAMOS et al., 2017; SONENSHINE & ROE, 2014).

Para que ocorra a circulação de *Rickettsia* em uma região, além do carrapato suscetível, torna-se necessária a presença de hospedeiros vertebrados amplificadores, que são animais que apresentam riquetsemia por tempo suficiente no organismo para que carrapatos se alimentem neles, sejam infectados e, nos próximos repastos sanguíneos, transmitam o microrganismo a novos indivíduos (HORTA et al., 2009). Neste contexto, capivaras e gambás são considerados hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* e seu vetor carrapatos da espécie *A. sculptum* na natureza (LABRUNA, 2012).

A presença das capivaras no sudeste do Brasil aumentou cerca de 40 vezes mais nas últimas três décadas do que as registradas em regiões de seu habitat natural, como o Pantanal e o Cerrado, que tem sido relacionada à degradação de áreas naturais e ao cultivo de cana-de-açúcar, principal fonte de alimento desses animais. Logo, uma grande

população de capivaras pode provocar uma grande infestação ambiental de carrapatos (QUEIROGAS et al., 2012; LUZ et al., 2019; POLO et al., 2017).

Os gambás podem ser encontrados em diversos tipos de ambientes, com registros desses animais nos habitats do Cerrado, Pantanal, Pampas e até mesmo em zonas de transição entre esses biomas e áreas antropizadas (NASCIMENTO et al., 2019; TOLESANO-PASCOLI, 2014; SANTOS et al., 2020). Esses animais são abundantes em áreas endêmicas da FMB, podendo servir como um importante mecanismo para a dispersão desses carrapatos e patógenos que causam doenças em humanos e animais domésticos e levar ao surgimento de surtos de doenças (HORTA et al. 2007; LOPES et al., 2018; MILAGRES et al., 2010; LUZ et al., 2018; GONZALEZ et al., 2017; ACOSTA et al., 2016; LUZ et al., 2020). HORTA e colaboradores (2009) demonstraram de forma experimental a capacidade do gambá da espécie *Didelphis aurita* de transmitir e infectar carrapatos dessa espécie por *R. rickettsii*.

HORTA e colaboradores (2006) relataram pela primeira vez transmissão transovariana e sobrevivência transestadial de *R. bellii* em *I. loricatus*, demonstrando não haver necessidade de um hospedeiro amplificador para esta espécie de microrganismo.

O DNA de *R. bellii* foi detectado em nosso estudo em amostras das três espécies de carrapatos testadas, *A. sculptum*, *A. dubitatum* e *I. loricatus*, coletadas em ambos os hospedeiros. Assim, nossos resultados sugerem que há o envolvimento de diferentes espécies de carrapatos e diferentes hospedeiros na circulação de *R. bellii* no parque. A detecção de *R. bellii* em carrapatos *A. dubitatum* e *I. loricatus* foi descrita em outros estudos (LABRUNA et al., 2004; HORTA et al., 2006; HORTA et al., 2010; BRITES-NETO et al., 2013; PAJUABA-NETO et al., 2018; KRAWCZAK et al., 2016); entretanto sua presença em *A. sculptum* parece ser menos frequente (PACHECO et al., 2009; HORTA et al., 2007).

A análise das sequências de nucleotídeos dos produtos de PCR de três amostras do presente estudo (uma de *A. sculptum* e uma de *A. dubitatum* coletadas de capivaras diferentes e um *I. loricatus* de um gambá) mostrou que elas eram idênticas entre si e com sequências relatadas em *Ixodes tropicalis* da Colômbia (número de acesso do GenBank - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/> - MT174170), em *A. dubitatum* da Argentina (KX009410), e no Brasil, em *A. aureolatum* do Espírito Santo (MK962697), em *Amblyomma longirostre* do Rio de Janeiro (MN064678) e em *Amblyomma rotundatum*

do Amapá (MH236876) (LAMANTINA et al., 2018; LUZ et al., 2018; ARROYAVE et al., 2020; SZABÓ et al., 2013; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2020; EBERHARDT et al., 2015; PACHECO-SOLANO et al., 2019; MCINTOSH et al., 2015; OGRZEWALSKA et al., 2019). Vale ressaltar que as sequências encontradas nos carrapatos do Parque do Sabiá também eram idênticas a uma sequência encontrada em *A. dubitatum* coletado no ambiente do Praia Clube, um clube de lazer e recreação localizado em Uberlândia, às margens do Rio Uberabinha, onde capivaras estão presentes (sequência não publicada – parte do estudo de PAJUABA NETO et al., 2018).

Além destas, também foram idênticas com sequências encontradas nos Estados Unidos, em carrapatos das espécies *D. variabilis*, *Dermacentor occidentalis* e *Rhipicephalus sanguineus* (respectivamente, CP000087, MN372316 e MN372317. OGATA et al., 2006; OSBORNE et al., 2020). Independentemente dos mecanismos de transmissão horizontal, a tendência de cada genótipo de *R. bellii* de estar associado a uma espécie de carrapato diferente sugere a maioria dos isolados de *R. bellii* co-evoluiu com seu hospedeiro específico de carrapato, possivelmente em direção a uma associação simbiótica (KRAWCZAK et al., 2018).

A análise filogeográfica entre isolados de *R. bellii* demonstrou uma diferenciação em duas linhagens, da América do Sul e da América do Norte, indicando isolamento geográfico e sugerindo que eles haviam sido irradiados em seus respectivos blocos (KRAWCZAK et al., 2018). Exclusivamente por meio da análise da sequência nucleotídica, ou seja, sem considerar a localização geográfica onde os carrapatos foram coletados, não foi possível identificar de qual linhagem de *R. bellii*, se da América do Norte ou da América do Sul, pertenciam as sequências de *R. bellii* detectadas no presente estudo.

A alta frequência de *R. bellii* em um estudo de HECHT e colaboradores (2019) pareceu desempenhar um papel inibitório significativo na manutenção de outras espécies patogênicas de *Rickettsia* e reduzir significativamente a ocorrência de *R. rickettsii* na população de carrapatos. No nosso estudo, com a baixa taxa de carrapatos infectados por *R. bellii* (taxa mínima de infecção total em ninfas e adultos de 3,1%, 10/321, e em bolos de larvas de 15,4%), um grande número de carrapatos não infectados está disponível para infecção por *Rickettsia* do GFM, pois uma infecção primária por *R. bellii* poderia inibir a transmissão transovariana de outra espécie de *Rickettsia* adquirida secundariamente

(SAKAI et al., 2014). Além disso, com o nascimento de hospedeiros vertebrados, que ainda não possuem imunidade contra *Rickettsia*, existe a possibilidade de infecção por esses patógenos e sua amplificação, favorecendo o surgimento de surtos de febre maculosa (PAROLA et al., 2013; WECK et al., 2016).

Considerando a baixa taxa de carrapatos infectados com *R. rickettsii* em áreas endêmicas menor que 1% uma limitação do nosso estudo é o número de carrapatos testados. Um dos motivos é o longo armazenamento dos carrapatos, uma vez que muitas amostras de DNA extraídas não apresentaram boa qualidade para PCR, conforme determinado por ensaio de amplificação de um segmento que codifica o rRNA 16S dos carrapatos (CAMPOS et al., 2020; MATIAS et al., 2015; MORAES-FILHO et al., 2018).

Outra forma de investigar a infecção por *Rickettsia* spp. em capivaras e gambás do parque foi realizada por meio do teste de suas amostras de soro por RIFI contra quatro antígenos de *Rickettsia* do GFM (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis*, *R. rhipicephali*) e o antígeno de *R. bellii* (TOLESANO-PASCOLI, 2014). Enquanto que duas amostras (6,5%), dentre as 31 amostras de soro de capivaras testadas, foram reativas contra o antígeno de *R. bellii*, 19 (61,3%) mostraram reatividade contra pelo menos um dos antígenos de *Rickettsia* do GFM e *R. rickettsii* foi o PAERH em seis amostras (19,4%). Nenhuma amostra das capivaras cujos carrapatos apresentavam DNA de *R. bellii* foi reativa contra o antígeno de *R. bellii* (amostra de soro de um dos animais não estava disponível).

Por outro lado, além das sete amostras de soros de gambás nas quais a *R. bellii* foi o PAERH, 16 amostras (59,3%) dos 27 gambás apresentaram reatividade contra pelo menos um dos antígenos de *Rickettsia* do GFM utilizados na RIFI e, dentre estas, com cinco amostras foi possível determinar o PAERH: *R. amblyommatis* (n = 3), *R. rhipicephali* (n = 1) e *R. parkeri* (n = 1). Amostras de soro de três gambás cujos carrapatos apresentavam DNA de *R. bellii* mostraram reatividade por RIFI ao antígeno de *R. bellii*. Porém, *R. bellii* não foi o PAERH em nenhum deles e, portanto, não houve associação entre a presença da *R. bellii* nos carrapatos coletados dos gambás com sorologia positiva para este patógeno.

Apesar de, no presente estudo, evidências moleculares da presença de espécies de *Rickettsia* do GFM não foram observadas, as evidências sorológicas com amostras de capivaras e gambás indicam a ocorrência dessas espécies no Parque do Sabiá, inclusive

tendo *R. parkeri* e *R. rickettsii* como PAERH. Essas evidências, aliadas à presença de *A. sculptum*, que é uma espécie agressiva a humanos, reforçam a importância de se manter um monitoramento para a presença desses patógenos e, possivelmente, o controle tanto de carrapatos como de seus hospedeiros no parque.

6. CONCLUSÕES

- O DNA de *Rickettsia bellii* foi detectado em carrapatos de três espécies diferentes, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma sculptum* e *Ixodes loricatus*, além de larvas do gênero *Amblyomma*;
- Os carrapatos nos quais o DNA de *R. bellii* foi detectado foram coletados tanto de capivaras quanto de gambás;
- As taxas mínimas de infecção por *R. bellii* nas diferentes espécies de carrapatos foram consideradas baixas, variando de 0,7% a 6,7%;
- Não houve associação entre a presença de carrapatos infectados com *R. bellii* (detectada por PCR) e evidência sorológica de infecção (por RIFI) pelo mesmo microrganismo;
- Embora evidências sorológicas de estudos anteriores tenham indicado a ocorrência de espécies *Rickettsia* do grupo da febre maculosa no Parque do Sabiá, incluindo as mais importantes para a saúde pública, a *Rickettsia parkeri* e a *Rickettsia rickettsii* como prováveis antígenos envolvidos na reação homóloga, esses patógenos não foram detectados por PCR no presente estudo.

REFERÊNCIAS

ABREU, D.P.B. et al. Two for the price of one: Co-infection with *Rickettsia bellii* and spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) ticks recovered from wild birds in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 10(6). 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101266>>.

ACOSTA, I.C.L. et al. Ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from humans, domestic and wild animals in the state of Espírito Santo, Brazil, with notes on rickettsial infection.

Veterinary **Parasitology Regional Studies and Reports**. 3, 4, p. 66–69. 2016. <<https://doi.org/10.1590/s1984-296120180017>>.

ALMEIDA, A.P. et al. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 2, p. 209–212. 2011. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.08.003>>.

ANGERAMI, R.N. et al. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 3, p. 346–348. 2012. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2012.10.010>>.

ARAÚJO, S.B.deS. et al. Integrated tick control on a farm with the presence of capybaras in a Brazilian spotted fever endemic region. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.28 (4), p. 671–676. 2019. <<https://doi.org/10.1590/s1984-29612019096>>.

ARROYAYE, E. et al. Detection of tick-borne rickettsial pathogens in naturally infected dogs and dog-associated ticks in Medellin, Colombia. Brazilian. **Journal of Veterinary Parasitology**. 29,3. 2020. <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612020060>>.

ASSIS, J.C.A. et al. A morphological, molecular and life cycle study of the capybara parasite *Hippocrepis hippocrepis* (Trematoda: Notocotylidae). **Plos One**, v. 14, (8). 2019. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0221662>>.

BARBIERI, A.R.M.; ROMERO, L.; LABRUNA, M.B. “*Rickettsia bellii* infecting *Amblyomma sabanerae* ticks in El Salvador”. **Pathogens and Global Health**. v. 106, n. 3, p. 188–189. 2012. <<https://doi.org/10.1179/2047773212Y.0000000022>>.

BARBIERI, A.R.M. et al. Species richness and seasonal dynamics of ticks with notes on rickettsial infection in a Natural Park of the Cerrado biome in Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 10, p. 442–453. 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.12.010>>.

BARROS-BATTESTI, D.N., ARZUA, M.; BECHARA, J.H. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan. 2006. 223p.

BELLI, A. et al. “Ticks infected via co-feeding transmission can transmit Lyme borreliosis to vertebrate hosts.” **Scientific reports**. v. 7,1 5006. 2017. <<https://doi.org/10.1038/s41598-01705231-1>>.

BERMÚDEZ, S; TROYO, A.A. Review of the genus *Rickettsia* in Central America. **Research and Reports in Tropical Medicine**. v. 9, p. 103–112. 2018. <<https://doi.org/10.2147/rrtm.s160951>>.

BINETRUY, F. et al. Novel *Rickettsia* genotypes in ticks in French Guiana, South America. **Scientific Reports**. v. 10(1). 2020. <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-59488-0>>.

BITAM, I. et al. First detection of *Rickettsia aeschlimannii* in *Hyalomma aegyptium* from Algeria. **Clinical Microbiology Infection**. 15, p. 253–254. 2009. <<https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02274.x>>.

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

BRITES-NETO, J. et al. Diferenciação morfométrica entre larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 70, n. 5, p. 1521-1528. 2018. <<https://doi.org/10.1590/1678-4162-9774>>.

BURGDORFER, W., BRINTON, L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**. 266, 61-72. 1975.

BUYSSE, M.; DURON, O. Two novel *Rickettsia* species of soft ticks in North Africa: ‘*Candidatus Rickettsia africaseptentrionalis*’ and ‘*Candidatus Rickettsia mauretunica*.’ **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 11(3). 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101376>>.

CAMPOS, S.D.E. et al. Spotted fever group rickettsial infection in dogs and their ticks from domestic-wildlife interface areas in southeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 29(1). 2020. <<https://doi.org/10.1590/S1984-29612020012>>.

CIOTTI, M. et al. European Centre for Disease Prevention and Control. Synergies in community and institutional public health emergency preparedness for tick-borne diseases in the Netherlands. A case study on tick-borne encephalitis and Lyme borreliosis. Stockholm: ECDC; 2018.

CHISU, V.; FOXI, C.; MASALA, G. et al. First molecular detection of the human pathogen *Rickettsia raoultii* and other spotted fever group rickettsiae in Ixodid ticks from wild and domestic mammals. **Parasitology Research**, v. 117, n. 11, p. 3421–3429. 2018. <<https://doi.org/10.1007/s00436-018-6036-y>>.

CHOI, Y.J. et al. Evaluation of PCR based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. 12, p. 759–63. 2005. <<https://doi.org/10.1128/CDLI.12.6.759-763.2005>>.

CHOMCZYNSKI, Piotr. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, n. 3, p. 532-4, 536-7, 1993.

COSTA, F.B. et al. *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infecting *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) Ticks and Capybaras in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 57(1), p. 308–311. 2019. <<https://doi.org/10.1093/jme/tjz141>>.

COUTO, D.V. et al. Brazilian spotted fever: The importance of dermatological signs for early diagnosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 90, p. 248–250. 2015. <<https://doi.org/10.1590/abd1806-4841.20153087>>.

DALL'AGNOL, B. et al. Clinical Findings Associated with *Ornithodoros brasiliensis* Tick Parasitism in Travelers, Southern Brazil. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 30, n. 4, p. 437–440. 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.wem.2019.06.012>>.

DANTAS-TORRES, F. et al. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. Munich: Elsevier GmbH, v. 10, n. 6, p. 45. 2019. <<https://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.012>>.

DEBÁRBOA, V.N. et al. Natural infestation of *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Amblyomma dubitatum* ticks. **Experimental and Applied Acarology**. 63, p. 285-294. 2014. <<https://doi.org/10.1007/s10493-014-9768-0>>.

DE LA FUENTE, J. et al. Tick-host-pathogen interactions: conflict and cooperation. **PLoS Pathogens**. 12:e1005488. 2016. <<https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005488>>.

DEL FIOLE, F.S. et al. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**. 27(6), p. 461–6. 2010. <<https://doi.org/10.1590/1414-462X201500040094>>.

DIAS, T.C. et al. Habitat selection in natural and humanmodified landscapes by capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), an important host for *Amblyomma sculptum* ticks. **Plos One**, v. 15 (8). 2020. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229277>>.

DONALISIO, M.R. et al. Mapping Brazilian spotted fever: Linking etiological agent, vectors, and hosts. **Acta Trópica**. 207. 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105496>>.

EBERHARDT, A.T et al. First report of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing the crab-eating raccoon, *Procyon cancrivorus* (Carnivora: Procyonidae). **Revista FAVE –Sección Ciencias Veterinarias**.14, p. 20-22. 2015. <<https://doi.org/10.14409/favecv.v14i1/2.5395>>.

EREQAT, S. et al. Molecular Detection and Identification of Spotted Fever Group Rickettsiae in Ticks Collected from the West Bank, Palestinian Territories. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 10. 2016.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á.A.M. et al. Epidemiological aspects of *Rickettsia parkeri* in the Atlantic forest biome of Espírito Santo state, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11(2). 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101319>>.

FANG, R.; BLANTON, L.S.; WALKER, D.H. Rickettsiae as emerging infectious agents. **Clinics in Laboratory Medicine**. 37(2), p. 383–400. 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.cll.2017.01.009>>.

FONSECA, M.S. et al. Ticks and Associated Pathogens From Rescued Wild Animals in Rainforest Fragments of Northeastern Brazil. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, n. 177. 2020. <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00177/full>>.

FOURNIER, P., RAOULT, D. Bacteriology, taxonomy, and phylogeny of *Rickettsia*. In: Raoult D, Parola P, editors. *Rickettsial Diseases*. New York: Informa Healthcare, 1–14. 2007.

FREESE, S.; SHEATS, M.A. Suspected Case of Rocky Mountain Spotted Fever in an Adult Horse in the Southeastern United States. **Journal of Equine Veterinary Science, Raleigh**. 2019. V. 78, p. 134-137. <<https://doi.org/10.1016/j.jevs.2019.05.003>>.

GALVÃO, M.A. et al. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Revista de Saúde Pública**. v. 39, p. 850-856. 2005. <<https://doi.org/10.1590/S0034-89102005000500023>>.

GERARDI, M. et al. Comparative susceptibility of different populations of *Amblyomma sculptum* to *rickettsia rickettsii*. **Frontiers in Physiology**, v. 10. 2019. <<https://doi.org/10.3389/fphys.2019.00653>>.

GONZALEZ, I.H.L. et al. Ticks infesting captive and free-roaming wild animal species at the São Paulo Zoo, São Paulo Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**. v. 26, n. 4, p. 496–499. 2017. <<https://doi.org/10.1590/s1984-29612017036>>.

GUIMARÃES, J.H. et al. Ectoparasitas de Importância Veterinária. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001. 218p.

GUGLIELMONE, A.A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & Applied Acarology**. 40(2), p. 83–100. 2006. <<https://doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0>>.

GUGLIELMONE, A.A. et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**. 1–28. 2010. <<https://doi.org/10.5281/zenodo.196488>>.

HARRIS, R.M. et. al. Expanded Geographic Distribution and Clinical Characteristics of *Ehrlichia ewingii* Infections, United States. **Emerging Infectious Diseases**. 22(5), p. 862-865. 2016. <<https://doi: 10.3201/eid2205.152009>>.

HARRUS, S.; BANETH, G. Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International Journal of Parasitology**. 35, p. 1309–18. 2005. <<https://doi: 10.1016/j.ijpara.2005.06.005>>.

HECHT, J.A. et al. Multistate Survey of American Dog Ticks (*Dermacentor variabilis*) for *Rickettsia* Species. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 19, n. 9, p. 652–657. 2019. <<https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2415>>.

HEYLEN, D. et al. Ticks and tick-borne diseases in the city: Role of landscape connectivity and green space characteristics in a metropolitan area. **Science of the Total Environment**, v. 670, p. 941–949. 2019. <<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.235>>.

HERNÁNDEZ, A.R. et al. Clinical and serological evaluation of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) successively exposed to an *Amblyomma sculptum*-derived strain of *Rickettsia rickettsii*. **Scientific Reports**, v. 10(1). 2020. <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-57607-5>>.

HERRICK, K.L. et al. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Arizona, USA. **Emerging Infectious Diseases**. 22, p. 780-785. 2016. <<https://dx.doi.org/10.3201/eid2205.151824>>.

HERWALDT, B.L. et al. Transfusion-associated babesiosis in the United States: a description of cases. **Annals of Internal Medicine**. 115, p. 509–19. 2011. <<https://doi.10.1059/0003-4819-155-8-201110180-00362>>.

HORTA, M.C. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Sao Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 71(1), p. 93–7. 2004. <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2004.71.93>>.

HORTA, M.C. et al. Natural Infection, Transovarial Transmission, and Transstadial Survival of *Rickettsia bellii* in the Tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals New York Academy of Sciences**. 1078. 285-290. 2006. <<https://doi.10.1196/annals.1374.053>>.

HORTA, M.C. et al. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Memories of Oswaldo Cruz Institute*. 102, 7, 793-801. 2007. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000700003>>.

HORTA, MC. et al. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. 9(1), p. 109–18. 2009. <<https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0114>>.

HOVIUS, J.W., LEVI, M., FIKRIG, E. Salivating for knowledge: potential pharmacological agents in tick saliva. **PLoS Medicine**. 5:e43. 2008. <<https://doi.10.1371/journal.pmed.0050043>>.

IGOLKINA, Y. et al. Genetic variability of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor* and *Haemaphysalis* ticks from the Russian Far East. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1594–1603. 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.015>>.

JAHFARI, S. et al. Tick-Borne Encephalitis Virus in Ticks and Roe Deer, the Netherlands. **Emerging Infectious Disease Journal**. 23; 6:1028.2017.

KARBOWIAK, G. et al. The transstadial persistence of tick-borne encephalitis virus in *Dermacentor reticulatus* ticks in natural conditions. **Acta Parasitology**. 61, p. 201–203. 2016. <<https://doi.10.1515/ap2016-0028>>.

KARIM, S.; RIBEIRO, J.M. An insight into the sialome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, with a glimpse on its time dependent gene expression. **PLoS ONE**. 10:e0131292. 2015. <<https://doi.10.1371/journal.pone.0131292>>.

KATZ, G. et al. Epidemiological situation and importance of spotted fever in the state of São Paulo. **Paulista Epidemiological Bulletin**. 6, 69, p. 4-13. 2009.

KLEIN, D. et al. New Spotted Fever Group *Rickettsia* Isolate, Identified by Sequence Analysis of Conserved Genomic Regions. **Pathogens** (Basel, Switzerland), v. 9, n. 1,11. 2019. <<https://doi.org/10.3390/pathogens9010011>>.

KRAWCZAK, F.S. et al. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**. 7, 1-7. 2014. <<https://doi: 10.1007/s10493-016-0070-1>>.

KRAWCZAK, F.S., et al. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. **Springer**. v. 70, p. 219–229. 2016. <<https://doi: 10.1007/s10493-016-0070-1>>.

KRAWCZAK, F.S. et al. Genotypic characterization of *Rickettsia bellii* reveals distinct lineages in the United States and South America. **BioMed Research International**. 2018. <<https://doi.org/10.1155/2018/8505483>>.

LABRUNA, M.B. et al. *Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of Sao Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 42, n. 1, p.90-98. 2004.

LABRUNA, M.B. et al. Human Parasitism by the capybara tick *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Entomology News**. 118, p. 77-80. 2007. <[https://doi.org/10.3157/0013-872X\(2007\)118\[77:HPBTCT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.3157/0013-872X(2007)118[77:HPBTCT]2.0.CO;2)>.

LABRUNA, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. In: Hechemy, K.E., Brouqui, P., Samuel, J.E., Raoult, D.A. (Eds.), Fifth International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases. **Blackwell Publishing**, Marseille, France, pp. 156–165. <<https://doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>>.

LABRUNA, M.B. et al. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**. 17, p. 829–34. 2011. <<http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101524>>.

LABRUNA, M.B. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. In: Moreira, J.R.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Herrera, E.A.; Macdonald, D.W.(Eds.) *Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species*. New York: Springer Science Business Media, chap.23, pp. 371-383. 2012.

LABRUNA, M.B. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. In: *Capybara*. **Springer**. p. 371–83. 2013. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4000-0_23>.

LABRUNA, M.B., et al. Genetic identification of rickettsial isolates from fatal cases of Brazilian spotted fever and comparison with *Rickettsia rickettsii* isolates from the American Continents. **Journal of Clinical Microbiology**. 52, 3788-3791. 2014. <<https://doi:10.1128/JCM.01914-14>>.

LAMATTINA, D.; TARRAGONA, E.L.; NAVA, S. Molecular detection of the human pathogen *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest in *Amblyomma ovale* ticks in Argentina. **Ticks and Tick-and Borne Diseases**. v. 9, n. 5, p. 1261-1263. 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.05.007>>.

LANGONI, H. et al. Anti-leptospirosis agglutinins in Brazilian capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, 4. 2016. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4728815/>>.

LAVINA, M.S. et al. Ocorrência de *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) e *A. ovale* (Kock, 1844) (Acari: Ixodidae) parasitando *Alouatta clamitans* Cabrera, 1940 (Primates: Atelidae) na região norte do estado de Santa Catarina. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** v. 63, n. 1, p. 266-269, 2011. <<https://doi.org/10.1590/S0102-09352011000100040>>.

LEVIN, M.L. et al. Minimal Duration of Tick Attachment Sufficient for Transmission of Infectious *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) by Its Primary Vector *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae): Duration of Rickettsial Reactivation in the Vector Revisited. **Journal of Medical Entomology**, v. 27, n. 57(2), p. 585-594. 2020. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7171694/>>.

LOPES, M.G., et al. Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites Wildlife**, v. 7, n. 3, p. 380-385. 2018. <<https://doi.org/10.1016/j.ijppaw.2018.10.001>>.

LUZ, H.R. et al. Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 9. 2019. <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007734>>.

LUZ, H.R. et al. Comparative survival of the engorged stages of *Amblyomma dubitatum* and *Amblyomma sculptum* in the laboratory: Implications for Brazilian spotted fever epidemiology. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 2. 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.101360>>.

MADEDDU, G. et al. Mediterranean spotted fever-like illness in Sardinia, Italy: a clinical and microbiological study. **Infection**. 44, p. 733–738. 2016. <<https://doi.org/10.1007/s15010-016-0921-z>>.

MAGAIA, V. et al. Molecular detection of *Rickettsia africae* in *Amblyomma* ticks collected in cattle from Southern and Central Mozambique. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 14, n. 6, p. 614-622. 2019. <<https://jidc.org/index.php/journal/article/view/32683352/2286>>.

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

MANSFIELD, K.L. et al. Emerging tick-borne viruses in the twenty-first century. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11; 7: 298. 2017.

MANS, B.J. et al. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick. *Ornithodoros savignyi*. **Toxicon**. 40(7):1007e16. 2002.

MARQUES, S. e tal. Redescription of larva, nymph and adults of *Ixodes (I.) loricatus* Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae) based on light and scanning electron microscopy. **Systematic Parasitology**. v. 59, p. 135–146. 2004. <<https://doi.org/10.1023/B:SYPA.0000044430.05551.44>>.

MARTINS, T.F. et al. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions and identification key. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.1, n. 2, p. 75-99. 2010.

MARTINS, T.F. et al. New ticks records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Experimental & Applied Acarology**. v. 62, p. 121-128. 2014.

MARTINS, T.F. et al. A new species of *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) associated with monkeys and passerines of the Atlantic rainforest biome, Southeastern Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**. v. 10, n. 6, 2019. <<https://doi:10.1016/j.ttbdis.2019.07.003>>.

MATIAS, J.; et al. Spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 6, p. 107-110. 2015.< <https://doi: 10.14393/BJ-v34n1a2018-39756>>.

MCINTOSH, D. et al. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**: [publication of the Brazilian Society for Microbiology], v. 46, n. 3, p. 879–883. 2015. <<https://doi.org/10.1590/S1517-838246320140623>>.

MEDEIROS, A.P. et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina. Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 106, p. 926–930. 2011. <<https://doi: 10.1590/S0074-02762011000800005>>.

MEDIANNIKOV, O., PAROLA, P., RAOULT, D. Other tick-borne rickettsioses, p 139–163. 2007. In Raoult D, Parola P. (ed), *Rickettsial diseases*. **Informa Healthcare**, New York, NY.

MENDES, E.; SORRATINI, J. Polo gerador de viagens: análise de um terminal urbano de passageiros anexo a um centro comercial. **Journal of Transport Literature**, v. 8, p. 290-307.2014.

MENTZ, M.B. et al. *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) biting a human being in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 58:35. 2016.

MILAGRES, B.S. et al. Investigation of *rickettsia* in synanthropic and domestic animals and in their host from two areas of low endemicity for brazilian spotted fever, in the east region of Minas Gerais state, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 83, p. 1305-1307. 2010. <https://doi: 10.4269/ajtmh.2010.10-0239>.

MILAGRES, B.S. et al. Spotted fever group *Rickettsia* in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais state, Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Higyene**. 88, 937–939. 2013.< <https://doi.org/10.4269/ajtmh.12-0609>>.

- Ministério da Saúde. SINAN-Sistema de Informação de Agravos de Notificação, 2020. Disponível em: < <http://portalsinan.saude.gov.br/>>. Acesso em: 17 de set. de 2020.
- MONJE, L.D. et al. Molecular Detection of the Human Pathogenic *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest in *Amblyomma dubitatum* Ticks from Argentina. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**. v. 15, p. 167-169. 2015. <<https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1741>>.
- MONTENEGRO, D.C. et al. Spotted fever: Epidemiology and vector *Rickettsia* host relationship in Rio de Janeiro state. **Frontiers in Microbiology**, v. 8. 2017. <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00505>>.
- SANCHÉZ-MONTES, S. et al. *Rickettsia* species in ticks that parasitize amphibians and reptiles: Novel report from Mexico and review of the worldwide record. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 10, n. 5, p. 987–994. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.04.013>>.
- MORAES-FILHO, J.M. et al. *Rickettsia rickettsii* co-feeding transmission among *Amblyomma aureolatum* ticks. **Emerging Infectious Diseases**. v. 24, n.11, p. 2041–2048. 2018. <<https://doi.org/10.3201/eid2411.180451>>.
- MORSEHD, M. et al. A retrospective cohort study of tick paralysis in British Columbia. **Vector Borne Zoonotic Diseases**. 17(12):821e4. 2017.
- MUÑOZ-LEAL, S. et al. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: Ornithodoros) parasite of Octodon degus (Rodentia: Octodontidae) in northern Chile. **Ticks and Tick Borne Diseases**. v. 11, n. 3. 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101385>>.
- Museu do carrapato da Embrapa Gado de Corte: espécimes de carrapatos descritos no Brasil e depositados na coleção até o presente momento / Renato Andreotti ... [et al.]. – Campo Grande, M.S.: Embrapa Gado de Corte, 2018. 50 p.; il. color. - (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1983-974X; 251).
- MURRAY, G.G. et al. The Phylogeny of *Rickettsia* Using Different Evolutionary Signatures: How Tree-Like is Bacterial Evolution? **Systematic Biology**. 65(2), p. 265-279. 2016. <<https://doi.org/10.1093/sysbio/syv084>>.
- NANTES, W.A.G. et al. The influence of parasitism by *Trypanosoma cruzi* in the hematological parameters of the white ear opossum (*Didelphis albiventris*) from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 16-20. 2019. <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213224419300276?via%3Dihub>>.
- NASCIMENTO, D.C. et al. Genetic variability of populations of the white-eared opossum, *Didelphis albiventris* Lund 1840 (*Didelphimorphia; Didelphidae*) in Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 4, p. 594-602. 2019. <<https://doi.org/10.1590/1519-6984.184842>>.
- NASSER, J.T. et al. Urbanization of Brazilian spotted fever in a municipality of the southeastern region: epidemiology and spatial distribution. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. 18, p. 299–312. 2015. <<https://doi.org/10.1590/1980-5497201500020002>>.

NAVA, S. et al. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: ixodidae). **Experimental Applied Acarology**. v. 51, p. 335–351. 2010. <[http://doi: 10.1007/s10493-009-9331-6](http://doi:10.1007/s10493-009-9331-6)>.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick Borne Diseases**, v.5, p.252-276, 2014.

NODEN, B.H.; ROSELLI, M.A.; LOSS, S.R. *Rickettsia parkeri* and *Candidatus Rickettsia andeanae* in *Amblyomma maculatum* Group Ticks. **Emerging Infectious Diseases**. v. 26, n. 2, p. 371-373. 2020. https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/26/2/19-0664_article.

NOH, Y. et al. Molecular detection of *Rickettsia* species in ticks collected from the southwestern provinces of the Republic of Korea. **Parasites & Vectors**, v. 10, (1). 2017. <<https://doi.org/10.1186/s13071-016-1955-x>>.

OGATA, H. et al. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. **PLoS Genet**. 2:e76.10.1371. 2006.

OGRZEWALSKA, M. et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**. 139, 1283-1300. 2012.<[https://doi: 10.1017/S0031182012000546](https://doi:10.1017/S0031182012000546)>.

OGRZEWALSKA, M.; PINTER, A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 53, p. 1–31. 2016.<<https://doi:10.11606/issn.1678-4456.v53ilp1-31>>.

OGRZEWALSKA, M. et al. Microorganisms in the ticks *Amblyomma dissimile* Koch 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch 1844 collected from snakes in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology** 33, p. 154–161. 2019.<<https://doi.org/10.1111/mve.12341>>.

ONÓFRIO, V.C. et al. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. In: Carrapatos de importância médico veterinária da região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies, p. 53–113. 2006.

ONÓFRIO, V.C. et al. Description of a new species of Ixodes (Acari: Ixodidae) and first report of *Ixodes lasallei* and *Ixodes bocatorensis* in Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**. v. 11, n. 4. 2020. <<https://doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101423>>.

OSBORNE, E.B. et al. A Sediment Trap Evaluation of B/Ca as a Carbonate System Proxy in Asymbiotic and Nondinoflagellate Hosting Planktonic Foraminifera. **Paleoceanography and Paleoclimatology**. 35(2), 2020. <<https://doi.org/10.1029/2019PA003682>>.

PACHECO R.C. et al. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**. v. 27, p. 364–371. 2007.

PACHECO, R.C. et al. Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 42, 351-353. 2009. <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822009000300023>>.

PACHECO-SOLANO, K. et al. Exposure of dogs to *Rickettsia* spp. in Costa Rica: Risk factors for PCR-positive ectoparasites and seropositivity. **Parasite Epidemiology and Control**. 7. 2019.< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6717101/>>.

PADDOCK, C.D. et al. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis and its clinical distinction from Rocky Mountain spotted fever. **Clinical Infectious Diseases**. 47, p. 1188-96. 2008. <<https://doi:10.1086/592254>>.

PADDOCK, C.D. et al. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**. 38 (6), p. 805–811. 2004. <<https://doi:10.1086/381894>>.

PADDOCK, C.D.; Goddard, J. The evolving medical and veterinary importance of the Gulf Coast tick (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**.52, p. 230–52. 2015. <<http://dx.doi.org/10.1093/jme/tju022>>.

PADGETT, K.A. et al. The eco-epidemiology of Pacific Coast tick fever in California. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 2016; 10:e0005020. <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005020>>.

PAROLA, P. et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 26, p. 657–702. 2013. <https://doi:10.1128/CMR.00032-13>.

PARKER, R.R. et al. Observations of an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**. 54, p. 1482–1484. 1939. <<https://doi.org/10.2307/4582985>>.

PASCUCCI, I. et al. Diversity of *rickettsia* in ticks collected in abruzzo and molise regions (Central Italy). **Microorganisms**. v. 7, n. 12, p. 696. 2019. <<https://doi.org/10.3390/microorganisms7120696>>.

PERINI, K.; SABBION, P. Ecosystem Services in Urban Areas – social, environmental, and economic benefit. In: *Urban Sustainability and River Restoration: Green and Blue Infrastructure*: John Wiley & Sons 36–43. 2016. Chapter 5. <<https://doi:10.1002/9781119245025>>.

PINTER, A. et al. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Caderno de Saúde Pública**. v. 24, (2), p. 247-252. 2008. <<http://dx.doi.org/10.1590/S0102-311X2008000200003>>.

PIZA, J.T.; MEYER, J. R.; GOMES, L.S. (1932). Tifo Exantemático de São Paulo. São Paulo: **Sociedade Imprensa Paulista**.

POLO, G. et al. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, (6). 2017. <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005613>>.

PORTILHO, A. et al. A confirmed case of *Rickettsia parkeri* infection in a traveler from Uruguay. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 89, p. 1203–1205. 2013. <<https://doi.org/10.4269/ajtmh.13-0436>>.

QIN, X-R. et al. *Rickettsia japonica* and Novel Rickettsia Species in Ticks, China. **Emerging Infectious Diseases**. v. 25, n. 5, p. 992-995. 2019. <<https://doi.org/10.32388/ky3eqd>>.

QUEIROGAS, V.L. et al. Capybaras and ticks in the urban áreas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. **Experimental and Applied Acarology**. v. 57, p. 75–82. 2012. <<https://doi.org/10.1007/s10493-012-9533-1>>.

RAMOS, V.N. et al. Ambush behavior of the tick *Amblyomma sculptum* (*Amblyomma cajennense* complex) (Acari: Ixodidae) in the Brazilian Pantanal. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 8, p. 506–510. 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.011>>.

RAMOS, V.N. et al. Microhabitat determines uneven distribution of *Amblyomma parvum* but not of *Amblyomma sculptum* ticks within forest patches in the Brazilian Pantanal. **Experimental and Applied Acarology**. v. 79, n. 3–4, p. 405–410. 2019. <<https://doi.org/10.1007/s10493-019-00445-6>>.

REGNERY, R.L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of bacteriology**. v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991. <<https://doi.org/10.1128/jb.173.5.1576-1589.1991>>.

RIBEIRO, J. M.; SLOVÁK, M.; FRANCISCHETTI, I. M. An insight into the sialome of *Hyalomma excavatum*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 8, 201–207. 2017. <<http://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.011>>.

RIJKSINSTITUUT, V. Nieuw onderzoek naar de ziekte van Lyme. 2015; Available at: http://www.rivm.nl/Documenten_en_publicaties/Algemeen_Actueel/Nieuwsberichten/2015/Nieuw_onderzoek_naar_de_ziekte_van_Lyme.

RIZZOLI, A. et al. *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: new hazards and relevance for public health. **Frontiers and Public Health**. 2, p. 251–277. 2014. <<https://doi.org/10.3389/fpubh.2014.00251>>.

ROCHA, V.J. et al. Capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e a presença do carrapato (*Amblyomma sculptum*) no Campus da UFSCAR- Araras, São Paulo. **Ciência Animal Brasileira**. v. 18, p. 1-15. 2017. <<https://www.scielo.br/pdf/cab/v18/1809-6891-cab-18-e44671.pdf>>.

ROSS RUSSELL, A.L. et al. Lyme disease: diagnosis and management. **Practical Neurology**. 18(6), p. 455-464. 2018. <<https://doi.org/10.1136/practneurol-2018-001998>>.

ROSENBERG, R. et al. Vital Signs: Trends in Reported Vectorborne Disease Cases — United States and Territories. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. 2004–2016. v. 67, n. 17, p. 496–501. 2018. <<https://doi:10.15585/mmwr.mm6717e1>>.

ROUX, V.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein *rOmpA*. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 34, n. 9, p. 2058-2065, 1996. <https://doi:10.1128/JCM.34.9.2058-2065.1996>.

SABATINI, G.S. et al. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their *Rickettsia* in an Atlantic rain forest reserve in the state of São Paulo, Brazil. **Journal Medical Entomology**. 47, 913-916. 2010. <<https://doi:10.1603/me10073>>.

SAKAI, R.K. et al., Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 5, 917-923. 2014. <<https://doi:10.1016/j.ttbdis.2014.07.003>>.

SANGIONI, L.A. et al. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. **Emerging Infectious Diseases**. [s.l.], v. 11, n. 2, p. 265-270. 2005. <<https://doi:10.3201/eid1102.040656>>.

SANTOS, I.G.D. dos et al. *Didelphis albiventris*: an overview of unprecedented transcriptome sequencing of the white-eared opossum. **BMC Genomics**, v. 20 (1).866. 2019. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6858782/>>.

SANTOS, C.A. dos et al. Molecular detection of a *Borrelia* sp. in nymphs of *Amblyomma brasiliense* ticks (Acari: Ixodidae) from Iguaçu National Park, Brazil, genetically related to *Borrelia* from Ethiopia and Côte d'Ivoire. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 11, n. 6. 2020. <<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101519>>.

SCINACHI, C.A. et al. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**. 166, p. 225–233. 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.11.025>>.

SILVEIRA, I. et al. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. 13 (7), p. 1111–1113. 2007. <<https://doi:10.3201/eid1307.061397>>.

SOARES, J.F. et al. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical Veterinary Entomology**. 26, p. 139–51. 2012. <<http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2915.2011.00982.x>>.

SOCOLOVSKI, C. et al The relationship between spotted fever group *Rickettsiae* and Ixodid ticks. **Veterinary Research**. 40, (2), 34, 2009. <<https://doi:10.1051/vetres/2009017>>.

SOLANO, K.P. et al. Exposure of dogs to *Rickettsia* spp. in Costa Rica: Risk factors for PCR-positive ectoparasites and seropositivity. **Parasite Epidemiology and Control**, v. 7. 2019. <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6717101/>>.

SONENSHINE, D.E.; ROE, R.M. Overview: ticks, people, and animals. In: second edition. In: Sonenshine, D.E., Roe, R.M. (Eds.), **Biology of Ticks** Vol. I. Oxford University Press, New York USA, pp. 3–15. 2014.

SOUSA, K.C.M. de. et al. *Rickettsia* spp. among wild mammals and their respective ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9, n. 1, p. 10–17. 2018. <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29111373/>>.

SPOLIDORIO, M.G. et al. Novel spotted fever group rickettsioses. **Brazil. Emerging Infection Diseases**. v. 16, p. 521-523. 2010. <<https://doi:10.3201/eid1603.091338>>.

STENOS, J. et al. *Aponomma hydrosauri*, the reptile-associated tick reservoir of *Rickettsia honei* on Flinders Island, Australia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 69(3):314-7. PMID: 14628950.

STRAILY, A. et al. Notes from the Field: *Rickettsia parkeri* rickettsiosis—Georgia, 2012–2014. **Morbidity and Mortality Weekly Report**. 65, p. 718-719. 2016. <<https://doi:10.15585/mmwr.mm6528a3>>.

STRAILY, A. et al. Antibody Titers Reactive With *Rickettsia rickettsii* in Blood Donors and Implications for Surveillance of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. **The Journal of Infectious Diseases**. v. 221, n. 8, p. 1371–1378. 2020. <<https://doi.org/10.1093/infdis/jiz316>>.

SYKES, R.A.; MAKIELLO, P. An estimate of Lyme borreliosis incidence in western Europe. **Journal Public Health**. (United Kingdom). v. 39, p. 74–81. 2017. <<https://doi.org/10.1093/pubmed/fdw017>>.

SUZIN, A. et al. Free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the Iguaçú National Park, Brazil: Temporal dynamics and questing behavior on vegetation. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. v. 11, (5), 2020. <<https://doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101471>>.

SZABÓ, M.P.J., OLEGÁRIO, M.M.M., SANTOS, A.L.Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**. 43, 73. 2007. <<https://doi:10.1007/s10493-007-9096-8>>.

SZABÓ, M.P.J. et al. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**. 103(1), p. 57–72. 2009. <<https://doi.org/10.1179/136485909X384956>>.

SZBÓ, M.P.J. et al. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, [s.l.], v. 140, n. 06, p.719-728, 2013. <https://doi:10.1017/S0031182012002065>>.

SZABÓ, M.P.J., et al. Ticks and *Rickettsia* on anteaters from Southeast and Central-West Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 10, n. 3, p. 540-545. 2019. <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.01.008>>.

TIJSSEKLASEN, E. et al. Role of sand lizards in the ecology of Lyme and other tick-borne diseases in the Netherlands. **Parasites & Vectors**. 14, 42. 2010. <<https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-42>>.

TODD, S.R. et al. No visible dental staining in children treated with doxycycline for suspected Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of Pediatrics**. 166(5), p. 1246-51. 2015. <<https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2015.02.015>>.

TOLESANO-PASCOLI, G. V. Carrapatos e riquetsias em parque urbano de Uberlândia, Minas Gerais: ecologia e biodiversidade associadas (Ticks and Rickettsiae in an urban park in Uberlândia, Minas Gerais: associations with ecology and biodiversity). 2014. Tese de doutorado - Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia. <<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/13279>>.

TOMASSONE, L. et al. Neglected aspects of tick-borne rickettsioses. **Parasites & Vectors**. 11, 263. 2018. <<https://doi.org/10.1186/s13071-018-2856-y>>.

UBERLÂNDIA. Parque do Sabiá. Disponível em: <<https://www.uberlandia.mg.gov.br/parque-do-sabia/>>. Acesso em: 22 maio. 2020.

UENO, T.E.H. Infecção experimental em equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense*. 2014. Tese Doutorado em Ciências. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. <<https://doi:10.11606/T.10.2014.tde-16102014-084906>>.

USPENSKY, I. Tick pests and vectors (Acari: Ixodoidea) in European towns: introduction, persistence and management. **Ticks and Tick-Borne Diseases**. 5, p. 41–47. 2014. <<https://doi:10.1016/j.ttbdis.2013.07.011>>.

VARELA-STROKES, A.S. et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma maculatum* ticks, north carolina, USA, 2009–2010. **Emerging Infectious Diseases**. 17, 12, p. 2350–2353. 2011. <<https://doi:10.3201/eid1712.110789>>.

VENZAL, J.M. et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**. 10, p. 1493–1495. 2004. <<https://doi:10.3201/eid1008.030999>>.

VOORDOUW, M.J. “Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens.” **Parasitology**. v.142,2, p. 290-302. 2015. <<https://doi:10.1017/S0031182014001486>>.

WARRELL, D.A. Louse-borne relapsing fever (*Borrelia recurrentis* infection). **Epidemiology & Infection**. 147:e106. 2019. <<https://doi:10.1017/S0950268819000116>>.

WECK, B. et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. **Acta Tropica**, v. 171, p. 182–185. 2017. <<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.028>>. 2017>.

WEINERT, L.A. et al. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**. 7, 6. 2009. <<https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6>>.

WHITWORTH, T. et al. Ultrastructural and genetic evidence of a reptilian tick, *Aponomma hydrosauri*, as a host of *Rickettsia honei* in Australia: possible transovarial

transmission. **Annals of the New York Academy of Sciences.** 990, 67–74. 2003.<[https://doi: 10.1111/j.1749-6632.2003.tb07339.x](https://doi:10.1111/j.1749-6632.2003.tb07339.x)>.

WRIGHT, C.L. et al. *Rickettsia parkeri* in gulf coast ticks, southeastern Virginia, USA. **Emerging Infectious Diseases.** 17 (5), 896–898. 2011. <[https://doi: 10.3201/eid1705.101836](https://doi:10.3201/eid1705.101836)>.

ZERINGOTÁ, V. et al. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group Rickettsia species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 8, p. 81-89. 2017. <[https://doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.10.001](https://doi:10.1016/j.ttbdis.2016.10.001) >.

ZHAO, S. et al. Rickettsiae in the common pipistrelle *Pipistrellus pipistrellus* (Chiroptera: Vespertilionidae) and the bat soft tick *Argas vespertilionis* (Ixodida: Argasidae). **Parasites & Vectors**, v. 3, n. 10. 2020. <<https://doi.org/10.1186/s13071-020-3885-x>>.