

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

TESE

**Pesquisa de carrapatos, pulgas e agentes
transmitidos por vetores em áreas florestais
da Amazônia Oriental e Mata Atlântica
Brasileiras**

Izabela Mesquita Araújo

2020



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO E M CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**Pesquisa de carrapatos, pulgas e agentes transmitidos
por vetores em áreas florestais da Amazônia Oriental e
Mata Atlântica Brasileiras**

IZABELA MESQUITA ARAÚJO

Sob a orientação do Professor
Prof. Dr. Aivaldo Henrique da Fonseca

Coorientação
Dr. Matheus Dias Cordeiro

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

**Seropédica, RJ
Fevereiro de 2020**

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

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

A658p Araújo, Izabela Mesquita, 1990-
Pesquisa de carrapatos, pulgas e agentes transmitidos por vetores em áreas florestais da Amazônia Oriental e Mata Atlântica brasileiras. / Izabela Mesquita Araújo. - Rio de Janeiro, 2020. 121 f.: il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.
Coorientador: Matheus Dias Cordeiro.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária, 2020.

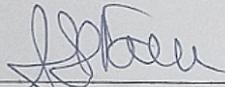
1. carrapato. 2. Pulgas. 3. Bioagentes. 4. Amazônia. 5. Mata Atlântica. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da , 1953-, orient. II. Cordeiro, Matheus Dias, 1983-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinária. IV. Título.

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

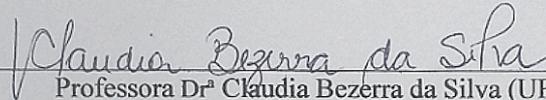
IZABELA MESQUITA ARAÚJO

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

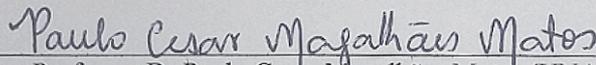
TESE APROVADA EM ___ / ___ / _____



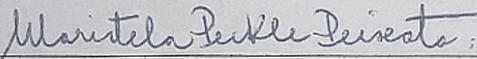
Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca. UFRRJ (Orientador)



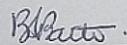
Professora Dr^a Claudia Bezerra da Silva (UFRRJ)



Professor Dr Paulo Cesar Magalhães Matos (UNAMA)



Professora Dr^a Maristela Peckle Peixoto (UFRRJ)



Professora Dr^a Bruna de Azevedo Baeta (Universidade de Vassouras)

DEDICATÓRIA

*Á minha mãe, Maria da Cruz Mesquita, e minha avó, Maria da Paixão Mesquita
Á minha bisavó, Maria Francisca de Sousa (Vó Ducarmo), in memoriam*

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus. “Mudaste o meu pranto em dança, a minha veste de lamento em veste de alegria, para que o meu coração cante louvores a ti e não se cale. Senhor, me Deus, eu te darei graças para sempre.” (Salmos 30, 11-12)

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES)- Código de Financiamento 001, agradeço o financiamento desta pesquisa.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pela oportunidade de ingressar no Curso de Doutorado e de ser um lugar tão acolhedor. Realmente a Rural é uma Mãe! Aprendi a amar esse lugar.

Ao prof. Adivaldo Henrique da Fonseca por aceitar me orientar no doutorado e por assim o fazer durante esses anos.

Ao Dr. Matheus Dias Cordeiro por ser um coorientador de excelência. Muito obrigada por todo o ensinamento que me transmitiu todos esses anos.

A equipe do Projeto Pró Amazônia, em especial a Prof. Dr. Ísis Abel, que me deu todo o suporte para as coletas de carrapatos do primeiro capítulo.

Ao Prof. Dr. Paulo Cesar Magalhães Matos, que nos forneceu o material para construirmos o terceiro capítulo.

Aos meus amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) por todos esses anos de amizade e companheirismo: Michele Bahia, Priscilla Nunes, Juliana Ferreira, Adlilton Pacheco, Márcio Cepeda, Jaqueline Valim, Taís Figueroa, José Luiz, Paula, Moraes, Rúbens, Neide Gomes.

Aos meus amigos e irmãos da Igreja Adventista do Sétimo Dia, de Seropédica, que me acolheram, em especial: Natália Farias, Wagner Farias, Miguel Farias, Franciara Silva, Daniele Louro, Laiza Fernanda, Tarcila Oliveira, Evilin Heiderick, Jhonatan. Obrigada pelas orações que me fizeram superar os momentos mais difíceis dessa caminhada. Amo vcs!

Ao meu amor, Felipe Marlon, pelo seu companheirismo, compreensão, cuidado e amor.

A minha Família Mesquita, que sempre me apoio mesmo à distância. Em especial ao meu tio Raimundo Mesquita, que me deu o “ponta pé inicial”, pagando as passagens aéreas e minha estadia para eu vir fazer a prova do Doutorado. Tio, o senhor é um pai para mim e saibas que o admiro muito.

A minha mãe e minha avó, as mulheres mais importantes da minha vida. Obrigada por todo ensinamento, por todas as broncas, por todos os conselhos, por todo o amor. Amo muito vocês!

BIOGRAFIA

Izabela Mesquita Araújo, filha de Antônio Costa Araújo e Maria da Cruz Mesquita Araújo, nasceu em 31 de janeiro de 1990, no município de Castanhal, estado do Pará. Coursou o ensino fundamental e médio, como bolsista integral, na Escola Externato Santo Antônio Maria Zacarias, em São Miguel do Guamá, concluindo no ano de 2007.

No ano de 2009 ingressou no curso de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Pará- UEPA, *campus* de Paragominas. Durante esse período acadêmico, participou de projetos de extensão, levando o ensino da Biologia para dentro das salas de aulas de escolas públicas do município. Em março de 2013 obteve o título de Licenciada em Ciências Biológicas.

Em 2014 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal na Amazônia da UFPA, área de concentração Saúde Animal, em nível de mestrado. Por não ter sido contemplada com uma bolsa da CAPES ou CNPq, atuou por um ano como bolsista Auxílio Técnico Nível Superior da FAPESPA com o projeto intitulado “Doença de Chagas e Leishmaniose Visceral e Tegumentar: análise epidemiológica e detecção molecular de *Trypanosoma cruzi* e de *Leishmania* spp. nos vetores e em reservatórios domésticos oriundos de áreas endêmica no estado do Pará”. Recebeu o título de Mestre em Saúde Animal em fevereiro de 2016.

Em dezembro de 2015 foi aprovada no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias, da UFRRJ, no qual ingressou em março de 2016. Dessa data até março de 2019 foi bolsista do CNPq. Participou de vários eventos científicos nacionais e internacionais desde a graduação até o doutorado

Nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Ciências Veterinárias.

RESUMO GERAL

ARAÚJO, Izabela Mesquita. **Hemoparasitos de carrapatos oriundos de fragmento florestal da Amazônia Oriental e de áreas antropizadas da Mata Atlântica.** 2020. 121p. de Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Embora a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica estejam entre os mais importantes biomas do Brasil, são regiões que sofrem as consequências das ações antrópicas. Isso contribui para o surgimento de doenças provocadas por patógenos, devido ao contato humano com área de circulação de patógenos e seus vetores. Este estudo objetiva a detecção de hemoparasitos em áreas antropizadas da Floresta Amazônica e de regiões de Mata Atlântica. Foram realizadas coletas de carrapatos em um fragmento florestal no estado do Pará e no Parque Nacional do Iguazu, no Paraná, bem como carrapatos e pulgas em animais selvagens no Rio de Janeiro. Para a obtenção desses ectoparasitos foram empregadas as técnicas como arraste, perneiras de flanela e armadilha de CO₂, e também pela inspeção em animais silvestres. Os ectoparasitos foram identificados usando chaves taxonômicas ou identificação molecular. Foi feita a extração de DNA para avaliar a detecção de DNA de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. e Piroplasmida, através da PCR. Foram obtidos 1.511 carrapatos, identificados em 17 espécies: *Amblyomma* spp., *A. cajennense* s.s., *A. calcaratum*, *A. geayi*, *A. goeldii*, *A. humerale*, *A. naponense*, *A. pacae*, *A. varium*, *A. sculptum*, *A. dubitatum*, *A. longirostre*, *A. brasiliense*, *A. ovale*, *A. incisum*, *A. parkeri*, *H. juxtakochi* e *A. coelebs*. Foi obtido um total de 54 pulgas, todas identificadas como *Ctenocephalides felis felis*. Através da PCR, *Rickettsia bellii* foi detectado em *A. varium*, *A. goeldii*, *A. dubitatum* e *A. pacae*; *Rickettsia* sp. cepa AL em *A. longirostre*; *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica em *A. ovale*; *Rickettsia felis* e “*Candidatus R. senegalensis*” em *C. f. felis*; *Wolbachia* sp. em *C. f. felis*; *Anaplasma* spp. em *A. brasiliense* e *A. coelebs*; *Borrelia* sp. em *A. calcaratum*, *A. coelebs* e *A. ovale* e *Amblyomma* sp.; e *Theileria* sp. em *A. coelebs*. Todas as amostras testadas foram negativas para *Ehrlichia* spp. Esse trabalho trás o primeiro registro de *R. bellii* em *A. varium* e em *A. goeldii*, o primeiro registro de “*Candidatus Rickettsia senegalensis*” no Brasil e aumenta o número de espécie de carrapatos do gênero *Amblyomma* infectados com *Borrelia* sp.

Palavras-Chave: Carrapatos, Pulgas, Bioagentes, Amazônia, Mata Atlântica

ABSTRACT

ARAÚJO, Izabela Mesquita. **Hemoparasites of ticks from forest fragments in the Eastern Amazon and anthropized areas of the Atlantic Forest, Brazil.** 2018. 121p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Sciences, Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2020.

Although the Amazon Forest and the Atlantic Forest are among the most important biomes in Brazil, they are regions that suffer the consequences of human actions. This contributes to the emergence of diseases caused by pathogens, due to human contact with the area of circulation of pathogens and their vectors. This study aimed to detect hemoparasites in anthropized areas of the Amazon Forest and regions of the Atlantic Forest. Ticks were collected in a forest fragment in Pará and in the Iguaçu National Park in Paraná, as well as ticks and fleas in wild animals in the state of Rio de Janeiro. In order to obtain these ectoparasites, techniques such as dragging, flannel leggings and CO₂ traps were used, as well as for inspection on wild animals. Ectoparasites were identified using taxonomic keys or molecular identification. DNA extraction was performed to assess the presence of *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. and Piroplasmida through PCR. A total of 1.511 ticks were obtained, identified in 17 species: *Amblyomma* spp., *A. cajennense* s.s., *A. calcaratum*, *A. geayi*, *A. goeldii*, *A. humerale*, *A. naponense*, *A. pacaе*, *A. varium*, *A. sculptum*, *A. dubitatum*, *A. longirostre*, *A. brasiliense*, *A. ovale*, *A. incisum*, *A. parkeri*, *H. juxtakochi* and *A. coelebs*. A total of 54 fleas were obtained, all identified as *Ctenocephalides felis felis*. *Rickettsia bellii* was detected in *A. varium*, *A. goeldii*, *A. dubitatum* and *A. pacaе*; *Rickettsia* sp. cepa AL in *A. longirostre*; *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in *A. ovale*; *Rickettsia felis* and “*Candidatus R. senegalensis*” in *C. f. felis*; *Anaplasma* sp. em *A. brasiliense* e *A. coelebs*; *Wolbachia* sp. em *C. f. felis*; *Borrelia* sp. in *A. calcaratum*, *A. coelebs*, *A. ovale* and *Amblyomma* sp.; e *Theileria* sp. in *A. coelebs*. All samples tested were negative for *Ehrlichia* spp. This work brings the first record of *R. bellii* in *A. varium* and in *A. goeldii*; the first record of “*C. R. senegalensis*” in Brazil; and increases the number of tick species of the genus *Amblyomma* infected with *Borrelia* sp.

Keywords: Ticks, Fleas, Bioagents, Amazon, Atlantic Forest

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	11
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1	Biomias brasileiros: Amazônia e Mata Atlântica.....	13
2.2	Carrapatos.....	13
2.3	Bioagentes transmitidos por Carrapatos.....	13
2.3.1	<i>Rickettsia</i> spp.....	13
2.3.2	<i>Ehrlichia</i> spp.....	15
2.3.3	<i>Anaplasma</i> spp.....	17
2.3.4	<i>Borrelia</i> spp.....	18
2.3.5	Ordem Piroplasmida.....	19
2.4	Pulgas	21
2.4.1	Bioagentes transmitidos por Pulgas.....	21
	CAPÍTULO I- Pesquisa de hemoparasitos em carrapatos de vida livre de um fragmento florestal no estado do Pará, Amazônia Oriental, Brasil.....	24
	RESUMO.....	25
	ABSTRACT.....	26
1	INTRODUÇÃO.....	27
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
2.1	Aspectos éticos e legais da pesquisa científica.....	28
2.2	Captura dos carrapatos em fase de vida livre.....	28
2.3	Identificação Morfológica e Molecular dos Carrapatos.....	31
2.4	Análises Moleculares.....	31
2.4.1	Extração de DNA.....	31
2.4.2	Reação em Cadeia da Polimerase.....	31
2.4.3	Eletroforese e análise dos resultados.....	33
2.4.4	Sequenciamento.....	34
2.5	Análises Ecológicas dos dados.....	34
3	RESULTADOS.....	36
4	DISCUSSÃO.....	42
5	CONCLUSÃO.....	46
6	REFERÊNCIAS.....	47
	CAPÍTULO II- Detecção Molecular de hemoparasitos em carrapatos e pulgas de animais selvagens no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.....	56
	RESUMO.....	57
	ABSTRACT.....	58
1	INTRODUÇÃO.....	59
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	61
2.1	Delineamento do estudo.....	61
2.1.1	Obtenção das Amostras.....	61
2.2	Análises Moleculares.....	63
2.2.1	Extração de DNA.....	63
2.2.2	Reação em Cadeia da Polimerase.....	63
2.2.3	Eletroforese e análise dos resultados.....	63
2.2.4	Sequenciamento.....	65
	Análise Filogenética.....	65

3	RESULTADOS.....	66
4	DISCUSSÃO.....	75
5	CONCLUSÃO.....	80
6	REFERÊNCIAS.....	81
	CAPÍTULO III- Pesquisa de hemoparasitos em carrapatos coletados de quatis (<i>Nasua nasua</i> Linnaeus, 1766) do Parque Nacional do Iguaçu, estado do Paraná, Sul do Brasil.....	93
	RESUMO.....	94
	ABSTRACT.....	95
1	INTRODUÇÃO.....	96
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	97
2.1	Aspectos éticos e legais da pesquisa científica.....	97
2.2	Área de estudo.....	97
2.3	Carrapatos.....	98
2.4	Análises moleculares.....	99
2.4.1	Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase.....	99
2.4.2	Eletroforese e análise dos resultados.....	101
2.4.3	Sequenciamento.....	101
	Análise Filogenética.....	101
3	RESULTADOS.....	102
4	DISCUSSÃO.....	109
5	CONCLUSÃO.....	112
6	REFERÊNCIAS.....	113
4	CONCLUSÃO GERAL.....	119
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	120

1 INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é considerado o berço da biodiversidade do planeta, por possuir seis diferentes biomas, dentre eles, a Floresta Amazônica e a Mata Atlântica. A Amazônia é considerada a maior floresta tropical úmida do mundo, abrangendo cerca de 4 milhões de km², e a mais rica em espécies animais e vegetais. No entanto, na contramão de toda essa riqueza, a região apresenta baixo índice socioeconômico e crescente urbanização (MMA, 2020). A Mata Atlântica é um bioma que, *a priori*, ocupava mais de 1,3 milhões de km² em 17 estados brasileiros. Atualmente, existe apenas 29% de cobertura vegetal preservada em áreas de remanescentes florestais, muitas das quais protegidas como Unidades de Conservação (MMA, 2020).

Geralmente, a degradação ambiental em uma determinada região ocorre devido a ações antrópicas, tais como a expansão agropecuária, mineração, exploração madeireira, abertura de estradas e extensa urbanização que, por sua vez, reduz áreas contínuas de florestas para pequenas áreas fragmentadas e isoladas (REYDON, 2011; MONICA et al., 2013) Nesse sentido, o processo de fragmentação florestal tende a gerar grande impacto sobre a fauna, uma vez que a sobrevivência da biodiversidade local depende diretamente de grandes áreas contínuas em função de garantir a variabilidade genética, dispersão e reprodução desses animais (LAURANCE et al., 2009). Como consequência, tais processos levam à uma diminuição da riqueza e abundância das espécies animais por perda do *habitat* natural (LAURANCE et al., 2009).

Outra consequência desse processo de fragmentação florestal é o aumento no número de animais silvestres em cativeiros, como em parques e zoológicos, (NASCIMENTO et al., 2017, GONZALEZ et al., 2017), muitas vezes devido a dificuldade de reabilitação desses animais na natureza. E nos casos de parques abertos, pode ocorrer a aproximação humana a animais silvestres com hábitos sinantrópicos (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017). Estudos mostram que quanto mais adaptada for uma espécie às áreas antropizadas (urbanas, suburbanas e rurais), maior será sua densidade nestes locais quando comparado a áreas menos perturbadas (DITCHKOFF et al., 2006).

As mudanças climáticas aliadas à fragmentação florestal, seja para a expansão agrícola ou para urbanização, também têm se constituído em fator decisivo para a emergência e reemergência de doenças provocadas por patógenos zoonóticos, muitas vezes devido ao maior contato humano com áreas de risco ou de circulação de algum agente patogênico e seus respectivos vetores (ESTRADA-PEÑA et al., 2014), como os carrapatos e pulgas.

Mediante a estes aspectos, o presente estudo foi constituído por três capítulos com o objetivo em comum de detecção de agentes transmitidos por carrapatos em áreas antropizadas de regiões de Mata Atlântica e Amazônia.

No capítulo I foi avaliado a detecção molecular de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Borrelia* spp. em carrapatos de vida livre coletados em um fragmento florestal da Amazônia, no estado do Pará, Brasil.

No capítulo II foi avaliado a detecção de grupos de hemoparasitos da ordem Piroplasmida e bactérias dos gêneros *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia* em carrapatos e pulgas que parasitam animais selvagens no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

No capítulo III foi avaliado a detecção molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. e protozoários da ordem Piroplasmida em carrapatos coletados em quatis silvestres e de hábitos sinantrópicos do Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Biomas brasileiros: Amazônia e Mata Atlântica

A Amazônia tem aproximadamente 4,1 milhões de km² e abriga mais de um terço das espécies existentes no planeta. Ela abriga mais de 2 mil espécies de árvores, bem como 30 mil das 100 mil espécies de plantas que existem na América Latina. A floresta vive do seu próprio material orgânico, em meio a um ambiente úmido, com chuvas abundantes (WWF, 2020).

Além disso, também é rica em recursos naturais, possuindo grande estoque de madeira, borracha e minérios. A riqueza cultural também está presente no conhecimento tradicional de explorar todos os recursos existentes na região de uma forma sustentável, sem esgotá-lo. No entanto, a Amazônia sofre com os baixos índices socioeconômicos, falta de infraestrutura e altos índices de desmatamento, que coloca toda essa riqueza em constante ameaça. Mais de 10 milhões de hectares de florestas são destruídas todos os anos, para dar lugar a atividades como pastagens, plantações de óleo de palma, plantações de soja, abertura de estradas e exploração madeireira ilegal (WWF, 2020).

A Mata Atlântica é uma das florestas tropicais mais ameaçadas do mundo e de fato é o bioma brasileiro que mais sofreu os impactos ambientais dos ciclos econômicos da história do país. Na época do “descobrimento do Brasil”, a natureza rica e diversa da Mata Atlântica se estendia por cerca de 1,3 milhões de quilômetros (WWF, 2020).

A maioria das espécies de animais brasileiros ameaçados de extinção são oriundos da Mata Atlântica. Porém, apesar de toda a devastação ocorrida nesse bioma, a riqueza das espécies animais e vegetais ainda é exuberante. Ainda existem remanescentes de florestas com altos níveis de biodiversidade considerados os maiores do planeta (WWF, 2020).

2.2 Carrapatos

Os carrapatos são organismos da classe Arachnida, ordem Acari, subordem Ixodida. São ectoparasitos hematófagos amplamente difundidos no mundo (BARROS-BATTESTI et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2019). Até o presente, a subordem Ixodida possui 956 espécies no mundo, sendo distribuídas em três famílias: Ixodidae (736 espécies), Argasidae (218) e Nuttalliellidae (monoespecífica) (DANTAS-TORRES et al., 2019). A família Nuttalliellidae é a menos estudada, tendo apenas uma espécie

conhecida, *Nuttalliella namaqua*, restrita ao Continente Africano (GUIMARÃES et al., 2001).

No Brasil, atualmente a fauna de carrapatos é constituída por 73 espécies, sendo 25 espécies da família Argasidae distribuídas entre os gêneros *Carios*, *Antricola*, *Ornithodoros*, *Nothoaspis* e *Argas*; e 48 espécies da família Ixodidae distribuídas entre os gêneros *Amblyomma*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus* e *Dermacentor* (DANTAS-TORRES et al., 2019).

A maioria das espécies de carrapatos encontradas no Brasil pertencem a família Ixodidae, mais precisamente ao gênero *Amblyomma* (DANTAS-TORRES et al., 2019). Na natureza, os carrapatos do gênero *Amblyomma* possuem uma grande diversidade de hospedeiros, podendo parasitar quase todas as ordens de mamíferos, aves, répteis e anfíbios. Geralmente, os carrapatos em estágios imaturos apresentam uma baixa especificidade hospedeira, podendo parasitar por exemplo uma variedade espécies de aves e pequenos mamíferos. Em contrapartida, a especificidade hospedeira dos carrapatos em fase adulta pode variar conforme a espécie (FACCINI et al., 2006).

2.3 Bioagentes transmitidos por carrapatos

2.3.1 *Rickettsia* spp.

O gênero *Rickettsia*, pertencente a ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae, é composto por bactérias intracelulares obrigatórias, em formatos cocobacilares ou pequenos bacilos (TAYLOR et al., 2010). Atualmente, as espécies de *Rickettsia* estão distribuídas em diferentes grupos: o grupo do tifo (GT) composto por *Rickettsia prowazekii* (transmitida por piolhos) e *Rickettsia typhi* (transmitidas por pulgas); o grupo da febre maculosa (GFM) tendo mais de 20 espécies associadas a carrapatos; o grupo Canadensis representado por *Rickettsia canadensis* e *Rickettsia monteiroi*; o grupo Bellii representado por *Rickettsia bellii*; o grupo de transição, composto por espécies como *Rickettsia akari*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia australis*; e mais oito grupos diferentes, associados a outras ordens de artrópodes (WEINERT et al., 2009).

O GFM é associado a carrapatos e possui o maior número de espécies e/ou cepas consideradas patogênicas. Dentre essas espécies, *R. rickettsii* é a mais conhecida e patogênica no mundo, sendo bem distribuída por todo o continente americano (LABRUNA et al., 2011), tendo como diversas espécies de carrapatos dos gêneros

Dermacentor e *Amblyomma*. Outro membro importante dentro do GFM é a espécie *Rickettsia parkeri*. Trata-se de um patógeno emergente nas Américas do Norte e Sul (PADOCK et al., 2004; KRAWCZAK et al., 2016). Na América do Norte, o principal vetor para *Rickettsia parkeri sensu stricto* (s.s.) é o carrapato *Amblyomma maculatum* (PADOCK et al., 2010), enquanto que na América do Sul pode ser vetorizada pelos carrapatos *Amblyomma ovale* e *Amblyomma aureolatum* (SZABÓ et al., 2013a; SZABÓ et al., 2013b).

Estudos recentes vêm mostrando a relações filogenéticas entre cepas e/ou espécies associadas ao complexo *Rickettsia parkeri*, separando-as em diferentes grupos, distribuídos entre o Velho e o Novo Mundo. Os isolados de *Rickettsia parkeri* do Velho Mundo formam três grupos diferentes (*R. africae*, *R. sibirica* e *R. conorii*). Já o isolados do Novo Mundo é constituído de quatro grupos: (1) grupo *Rickettsia parkeri* s.s. associadas a carrapatos do complexo *A. maculatum* na América do Norte e *A. triste* na América do Sul; (2) grupo cepa NOD tendo *Rickettsia* sp. cepa NOD associada ao carrapato *A. nodosum*; (3) grupo cepa Parvitasum, compreendendo dois isolados sul americanos de carrapatos de *A. parvitarsum*; (4) grupo cepa Mata Atlântica, associados ao carrapatos *A. ovale* e *A. aureolatum* (NIERE et al., 2018).

Rickettsia bellii é a espécie representante do grupo Belli. Nos últimos anos, essa bactéria foi detectada em carrapatos de diferentes partes da América Latina (LABRUNA et al., 2011), incluindo 17 espécies do gênero *Amblyomma* (ACOSTA et al., 2018). De fato, por esse agente rickettsial ser tão comumente encontrado em *Amblyomma* spp., alguns autores sugerem a existência de uma co-evolução simbiótica entre o carrapato e a riquetsia (LABRUNA et al., 2004; MCINTOSH et al., 2015). Trata-se de um agente riquetsial de patogenicidade ainda desconhecida (LABRUNA et al., 2011), porém La Scola et al. (2009) observaram formação de escara de inoculação em cobaias após uma infecção experimental. Além disso, existem estudos no Brasil base em dados sorológicos mostrando que essa bactéria pode causar infecções naturais em capivaras, cães e cavalos (SPOLIDORIO et al., 2013; TOLEDO et al., 2018; BUDWEG et al., 2019).

No Brasil, a cada ano surgem novos achados de espécies e cepas de *Rickettsia* associadas a carrapatos, como por exemplo *R. rickettsii*, *R. parkeri sensu stricto*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommatis*, “*Candidatus R. andeanae*”, *R. monteiroi*, *R. bellii*, *Rickettsia* sp. cepa Pampulha, *Rickettsia* sp. cepa AL, *Rickettsia* sp. cepa ARANHA,

Rickettsia sp. Aragoi, *Rickettsia* sp. cepa Pampulha, “*Ca. R. colombianensis*”, *Rickettsia* sp. cepa Tapirape, “*Candidatus Rickettsia paranaensis*” (ALMEIDA et al., 2011, PAROLA et al., 2013; BLANCO et al., 2017; BARBIERI et al., 2014; LUZ et al., 2018; GRUHN et al., 2019; COSTA et al., 2019; PELECO et al., 2019). Até o presente, *R. rickettsii* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica são conhecidas como patogênicas causando quadros clínicos humanos de rickettsioses no Brasil, principalmente na região sudeste (SPOLIDORIO et al., 2010; SZABÓ et al., 2013b; KRAWCZAK et al., 2016).

2.3.2 *Ehrlichia* spp.

O gênero *Ehrlichia*, pertencente a ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae, é constituído por bactérias pleomórficas obrigatoriamente intracelulares que parasitam leucócitos de hospedeiros vertebrados (MCDADE, 1990; SAITO et al., 2008; SAITO et al., 2016). Anteriormente, esse gênero abrangia dez espécies que eram identificadas de acordo com a infecção na célula hospedeira, tais como: *Ehrlichia canis*, *Ehrlichia risticii* e *Ehrlichia sennetsu* em monócitos; *Ehrlichia ewingii*, *Ehrlichia equi* e *Ehrlichia phagocytophila* em granulócitos; e *Ehrlichia platys* em trombócitos. Agora, através de estudos moleculares e filogenéticos, o gênero foi rearranjado, passando a incluir apenas cinco espécies: *E. canis*, *E. chaffeensis*, *E. ewingii*, *E. muris* e *E. ruminantium* (anteriormente *Cowdria ruminantium*). Isso ocorreu devido a mudança das espécies *E. equi*, *E. phagocytophila* e *E. platys* para o gênero *Anaplasma*, e *E. risticii* para o gênero *Neorickettsia* (DUMLER et al., 2001; VIEIRA et al., 2011).

Na natureza, algumas espécies de *Ehrlichia* são mantidas em um ciclo silvestre envolvendo carrapatos e diversas espécies de animais como hospedeiros reservatórios, tais como cervídeos, ruminantes, carnívoros e roedores (SAITO et al., 2008; SAITO et al., 2016). Por exemplo, o veado-de-cauda-branca (*Odocoileus virginianus*), um cervídeo comumente encontrado no Canadá, serve como reservatório natural para *E. chaffeensis* e, também, como um importante hospedeiro para todos os estágios de vida de *Amblyomma americanum*, o principal carrapato vetor dessa espécie de *Ehrlichia* (LOCKHART et al., 1996; LOCKHART et al., 1997). No entanto, hospedeiros acidentais como o bovinos, animais de companhia e os seres humanos também podem ser infectados por *Ehrlichia* spp., o que pode causar doenças conhecidas como Ehrliquioses (SAITO et al., 2016).

As espécies *E. canis* e *E. ewingii* são transmitidas aos cães através da picada dos carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *A. americanum*, respectivamente, provocando a ehrliquiose canina. Em humanos, quadros clínicos de ehrliquioses também podem ocorrer, porém os agentes causadores são *E. chaffeensis* e *E. ewingii*, transmitidos pelo carrapato *A. americanum* (DANTAS-TORRES, 2015; OSTFELD et al., 2015). Nos Estados Unidos, a ehrliquiose humana é bastante difundida, principalmente devido a gradativa expansão da distribuição geográfica e alta densidade de *A. americanum* (MERTEN et al., 2000; CHILDS et al., 2003).

No Brasil, há registro das espécies *E. canis*, *E. chaffeensis* e *E. ewingii* (VIEIRA et al., 2011). *Ehrlichia canis* é a de maior prevalência entre a população canina na América do Sul (FIGUEREDO et al., 2017; BRANDÃO et al., 2019; PÉREZ-MACCHI et al., 2019). Estudos recentes também detectaram *E. canis* em felídeos silvestres cativos (MAZZOTTI et al., 2018) e em gatos domésticos no Brasil (GUIMARÃES et al., 2019). Recentemente, uma nova espécie denominada *Ehrlichia minasensis* foi isolada a partir da hemolinfa de fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* em Minas Gerais (CABEZAS-CRUZ et al., 2016) e a partir do sangue de um bezerro naturalmente infectado, no estado do Mato Grosso (AGUIAR et al., 2019). Acredita-se que essa nova espécie possa ter evoluído a partir de uma linhagem genética altamente variável de *E. canis* (AGUIAR et al., 2019).

2.3.3 *Anaplasma* spp.

O gênero *Anaplasma*, pertencente a ordem Rickettsiales e família Anaplasmataceae, abrange as espécies *Anaplasma bovis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma platys*, e *Anaplasma phagocytophilum* (DUMLER et al., 2001). Recentemente, uma nova espécie foi descrita, *Anaplasma odocoilei*, isolada a partir de cervos silvestres cativos (*Odocoileus virginianus*) nos Estado Unidos (TATE et al., 2013).

Dentre essas espécies, *A. phagocytophilum* é a mais importante levando em consideração o caráter zoonótico. Por isso a preocupação de se estudar ainda mais ecologia dessa espécie. Essa bactéria é mantida em um ciclo de transmissão com carrapatos do gênero *Ixodes*, incluindo *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus*, nos Estados Unidos, *Ixodes ricinus* na Europa; e *Ixodes persulcatus* na Ásia. Nos Estados Unidos, os principais reservatórios vertebrados para *A. phagocytophilum* inclui pequenos mamíferos como o rato-de-patas-brancas (*Peromyscus leucopus*), até cervos (*O.*

virginianus) (DUMLER et al., 2005). No Brasil, *A. phagocytophilum* já foi detectado em cães e em carrapatos das espécies *R. sanguineus* e *A. sculptum* (SANTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2013).

Há suspeitas também que *A. platys* pode ser um agente zoonótico devido dois casos recentes de infecção humana ocorrido na Venezuela. Esses pacientes relataram ter sido expostos ao *R. sanguineus*, o suposto carrapato vetor dessa bactéria. Porém, é necessário a confirmação desses casos (ARRAGA-ALVARADO et al., 2003). Desde então, há outros relatos em humanos (ABARCA et al., 2008; MAGGI et al., 2013). *Anaplasma platys* tem sido relatado infectando felídeos (LIMA et al., 2010; GUIMARÃES et al., 2019).

No Brasil, estudos visando inquéritos sorológicos e detecção molecular de *Anaplasma* spp. em animais domésticos e silvestres surgem a cada ano, tendo relatos em em carnívoros (WIDMER et al., 2011; ANDRÉ et al., 2012), cervídeos (SACCHI et al., 2012; SILVEIRA et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016), roedor (WOLF et al., 2016) e até em aves silvestres e carnívoras (MACHADO et al., 2012; MONGRUEL et al., 2017). Recentemente, foram detectados *A. platys* e *A. phagocytophilum* em felídeos silvestres cativos, em Goiás (MAZZOTTI et al., 2018), e *A. platys* em gatos domésticos no Rio de Janeiro (GUIMARÃES et al., 2019).

Ao contrário dos países do hemisfério norte, o conhecimento sobre as espécies de carrapatos que estão envolvidas na manutenção do ciclo de transmissão de *Anaplasma* spp. que circulam na América do Sul são restritos (BRANDÃO et al., 2019; PÉREZ-MACCHI et al., 2019). Casos de infecção por *A. platys* é bem comum em cães no território brasileiro, porém o vetor desse agente bacteriano ainda não está definido, tendo suspeitas do envolvimento de *R. sanguineus* (CARVALHO et al., 2017; FIGUEREDO et al., 2017; BRANDÃO et al., 2019; DANTAS-TORRES et al., 2019). Recentemente, uma cepa de *Anaplasma* sp. relacionado a *A. phagocytophilum* foi detectada em uma ave silvestre (*Penelope obscura*) no Estado do Paraná (MONGRUEL et al., 2017). Por existir relatos de *Amblyomma longirostre* parasitando essa espécie de ave e outras no Brasil, além da detecção de agentes rickettsiais nessa espécie de carrapato, acredita-se que *A. longirostre* pode exercer um importante papel de vetor para essa bactéria entre as aves silvestres (MONGRUEL et al., 2017).

2.3.4 *Borrelia* spp.

O gênero *Borrelia*, pertencente a ordem Spirochaetales e família Spirochaetaceae, compreende espiroquetas bacterianas de grande importância por causarem doenças, conhecidas como borrelioses, tanto em animais como no homem em diversas partes do mundo. Essas doenças são distribuídas em cinco grupos: (1) Borreliose aviária, causada pela *Borrelia anserina*; (2) Borreliose bovina, causada pela *Borrelia theileri*; (3) Aborto enzoótico bovino, associada à *Borrelia coriaceae*; (4) Febre recorrente, causada pela *Borrelia recurrentis* e (5) Borreliose de Lyme ou doença de Lyme, causada por diversas espécies do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (SOCOLOVSKI et al., 2009).

Especificamente, o complexo *B. burgdorferi* s.l. até o momento abrange mais de 20 genoespécies no mundo. Entre essas, cinco são consideradas patogênicas ao ser humano (*Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia bavariensis* e *Borrelia spielmanii*); e três são suspeitas como patogênicas (*Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valaisiana* e *Borrelia finlandensis*) (CLARK et al., 2014).

Essas espécies do complexo *B. burgdorferi* s.l. tem em comum o fato de terem registros somente em países de clima temperado do hemisfério Norte, onde estão associadas com carrapatos do gênero *Ixodes*, tais como: *I. ricinus* e *I. persulcatus* na Europa e Ásia; e *I. scapularis* e *I. pacificus* na América do Norte (STEERE et al., 2004). Os principais reservatórios naturais para essas espiroquetas no ambiente silvestre são os cervídeos, como o veado-de-cauda-branca (*O. virginianus*) e o cervo sika yezo (*Cervus nippon yesoensis*), e também pequenos roedores, como ratos-de-patas-brancas (*P. leucopus*), podendo ser considerados sentinelas para a Doença de Lyme (ANDERSON, 1989; RAIZMAN et al., 2013).

No Brasil, a partir de 1980, diversos estudos foram realizados na busca de elucidar a possibilidade de existência da Doença de Lyme (ABEL et al., 2000; BARROS-BATTESTI et al., 2006; YOSHINARI, 2009). Isso porque muitos casos humanos de uma doença, semelhante a borreliose de Lyme descrita nos Estados Unidos, foram diagnosticados naquela época em São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso e no Amazonas (SOARES et al., 1999; SALLES et al., 2002; O'DWYER et al., 2004; MANTOVANI et al., 2007; YPARRAGUIRRE et al., 2007; MANTOVANI et al., 2012). No entanto, apesar das tentativas, não foi possível o isolamento do agente etiológico *B. burgdorferi*, impossibilitando comprovação da ocorrência do mesmo no país (FONSECA et al., 2005).

Porém, é importante salientar que outras espécies de *Borrelia* já foram isoladas e/ou detectadas no Brasil (REZENDE et al., 2016; BLANCO et al., 2017; LOPES et al., 2017). Recentemente, *Borrelia theileri* obtida a partir de *Rhipicephalus microplus* naturalmente infectados em bovinos, no estado do Rio de Janeiro, foi caracterizada conforme dados morfológicos, moleculares e filogenéticos, sendo este o trabalho mais completo e detalhado nas Américas até o momento a respeito dessa espiroqueta (CORDEIRO et al., 2018). Outro trabalho recente detectou *Borrelia* sp., com alta similaridade a *B. turcica*, em carrapatos da espécie *A. longirostre* oriundos de aves no Rio de Janeiro, representando a primeira descrição de *Borrelia* sp. em carrapatos do gênero *Amblyomma* na América do Sul (PACHECO et al., 2019).

2.3.5 Ordem Piroplasmida

Piroplasmida é uma ordem de protozoários do Filo Apicomplexa que possuem dois gêneros de parasitos transmitidos por carrapatos vetores, que são *Babesia* e *Theileria*. Esses piroplasmas são cosmopolitas, sendo encontrados principalmente em regiões tropicais e subtropicais (KIVARIA et al., 2007; SCHNITTGER et al., 2012). São agentes etiológicos da Babesiose e Theileirose, e infectam eritrócitos de uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, sejam domésticos e silvestres. Algumas espécies de *Babesia* também podem infectar seres humanos homem (UILENBERG, 2006; BENIGNO et al., 2012; HILDEBRANDT et al., 2013; LEMPEREUR et al., 2017).

Até agora, já foi identificada mais de 100 espécies de *Babesia* infectando uma grande diversidade mamíferos (SCHNITTGER et al., 2012), principalmente carnívoros e ungulados (QUROLLO et al., 2017). São parasitos de grande importância principalmente nos países do hemisfério norte, pois algumas espécies podem causar doenças zoonóticas. *Babesia microti*, por exemplo, é a responsável pela babesiose humana mais comum e notificada nos Estados Unidos (ORD et al., 2015), onde os casos são associados à expansão da população dos cervos de cauda branca (*O. virginianus*), um de seus hospedeiros vertebrados, à invasão de comunidades locais em habitats de vida selvagem e à maior conscientização da doença por parte dos médicos (VANNIER et al., 2012). Além dessa, há outras espécies consideradas patogênicas ao homem, como *Babesia divergens*, *Babesia duncani* e *Babesia venatorum* (ORD et al., 2015). Na América do Sul, existem relatos de babesiose humana no Brasil (HUNFELD et al., 2008), Colômbia (RIOS et al., 2003) e México (KJEMTRUP et al., 2000).

Com relação ao gênero *Theileria*, este compreende espécies que causam diversas doenças em ruminantes domésticos e silvestres. Em escala mundial, as espécies mais importantes são *Theileria parva*, originária do búfalo-africano (*Syncerus caffer*), que causa uma doença fatal para os ruminantes domésticos, conhecida como febre da Costa Leste (ECF); e *Theileria annulata*, oriunda do búfalo asiático (*Bulbulus bubulis*), que causa a teileriose tropical na Europa e China (BISHOP et al., 2004). Ademais, existem espécies que infectam cervídeos, como por exemplo, *Theileria cervi*, relatado em cervos de cauda branca (*O. virginianus*), alces (*Cervus canadensis*) e cervo-mula (*O. hemionus*) em países da América do Norte (CAUVIN et al., 2019), outras também infectam caninos, como *Theileria annae*, recentemente descoberta e responsável por diversos casos de piroplasmose canina em alguns países da Europa (MIRO et al., 2015).

No Brasil, espécies de *Babesia* e *Theileria* já foram relatadas em animais silvestres. São exemplos, *Babesia bovis* em veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*), *Babesia bigemina* em cervo-do-pantanal (*B. dichotomus*), em Goiás e no Paraná (SILVEIRA et al., 2013a; RODRIGUES et al., 2007) e *Theileria cervi* em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) e em veado-dos-pampas (*Ozotoceros bezoarticus*) nos estados de Minas Gerais e Pantanal (SILVEIRA et al., 2013b; SOUSA et al., 2018).

No geral, esses piroplasmas podem ser transmitidos por uma ampla gama de carrapatos. Nos Estados Unidos, por exemplo, o vetor primário de *B. microti* é o carrapato *I. scapularis*, porém existem outras espécies de *Ixodes* associadas a roedores que são conhecidas ou suspeitas de serem vetores que mantêm o ciclo silvestres do parasita (YABSLEY et al., 2013). Na Europa, *I. ricinus* tem sido identificado como vetor de *B. divergens*, *B. microti*, *B. ovis* e *B. venatorum* (RIZZOLI et al., 2014). Algumas espécies de *Rhipicephalus*, *Hyalomma*, *Amblyomma* e *Haemaphysalis* também são vetores de *Theileria* spp. (BISHOP et al., 2004).

2.4 Pulgas

As pulgas são insetos pertencentes a ordem Siphonaptera. Até o momento, sabe-se da existência de aproximadamente 3.000 espécies no mundo, distribuídas 240 gêneros e 16 famílias (LEWIS, 1998; LINARDI et al., 2000). No Brasil existem 60 espécies e/ou subespécies registradas, distribuídas em 20 gêneros e oito famílias. Dessas espécies, 29 infestam principalmente marsupiais (LINARDI et al., 2000).

O gênero *Ctenocephalides*, pertencente à família Pulicidae, atualmente constitui 13 espécies e subespécies, porém somente duas, *Ctenocephalides canis* (pulga do cão) e *Ctenocephalides felis felis* (pulga do gato), tem ocorrência em todo o mundo, inclusive na América do Sul (LINARDI et al., 2012). A espécie *C. felis felis* tem uma grande importância, pois sua alimentação não se limita apenas a gatos domésticos e selvagens, mas a uma ampla diversidade de hospedeiros animais como carnívoros e roedores sinantrópicos, incluindo também o ser humano (DURDEN et al., 2019).

No Brasil, *Ctenocephalides felis felis* já foi encontrada em 41 espécies de mamíferos, distribuídos em sete ordens, além de uma espécie de ave. Além disso, essa espécie é comumente encontrada parasitando gambás (*Didelphis* spp.) devido aos variados habitats que eles circulam (LINARDI et al., 2012).

2.5 Bioagentes Transmitidos por Pulgas

Em geral, os sifonápteros possuem baixa especificidade hospedeira. Dessa forma, os hospedeiros próximos taxonomicamente ou com ecologia similar podem compartilhar espécies de pulgas e, portanto, têm o potencial de hospedar patógenos semelhantes (IANNINO et al., 2017).

O conhecimento a respeito da função vetorial de muitas espécies pulgas ainda é escasso, porém sabe-se que algumas podem funcionar como reservatório de uma grande diversidade de bactérias, tais como *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Bartonella* spp. e *Rickettsia* spp. (BITAM et al., 2010).

Assim como os carrapatos, algumas espécies de pulgas são vetores de agentes rickettsiais de grande importância para a saúde mundial, pois foram responsáveis por zoonoses que no passado provocaram a morte humana. É o caso da bactéria *Rickettsia typhi*, causadora da doença Tifo Murino, que é transmitida ao homem através da picada da pulga *Xenopsylla cheopis* (BITAM et al., 2010).

Estudos mostram que nos últimos anos, a Febre Maculosa transmitida por pulgas se tornou uma doença emergente em várias partes do mundo, como México (ZAVALA-VELAZQUEZ et al., 2000), França e Brasil (RAOULT et al., 2001), Alemanha (RICHTER et al., 2002), Tailândia (PAROLA et al., 2003) e Espanha (BERNABEU-WITTEL et al., 2006), tendo como agente causador a espécie *Rickettsia felis* (PÉREZ-OSORIO et al., 2008). Os reservatórios naturais de *R. felis* ainda não são conhecidos, porém desde os primeiros casos clínicos da rickettsiose causada por essa bactéria, as

espécies de pulgas *C. felis* e *C. canis* foram implicados como prováveis vetores (ANGELAKIS et al., 2016)

No Brasil, *Rickettsia felis* é comumente encontrada em *Ctenocephalides spp.* em várias regiões (HORTA et al., 2014). Inclusive, a pulga *C. felis* é a mais encontrada em cães no Brasil (COSTA et al., 2013). Recentemente, um estudo trouxe o primeiro relato de *Rickettsia asembonensis* infectando pulga *C. felis* (SILVA et al., 2017).

Na Europa, agentes rickettsiais da família Anaplasmataceae já foram detectados em pulgas da espécie *Xenopsylla cheopis*, tais como *Anaplasma ovis*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Ehrlichia canis* (TORINA et al., 2013). Recentemente, *Anaplasma phagocytophilum* também foi detectado em pulgas da espécie *C. felis* na Polônia (PAWEŁCZYK et al., 2019). Um estudo recente no Brasil detectou *Ehrlichia sp.* intimamente relacionada com *E. canis* em pulgas da espécie *Polygenis (P.) bohlsi bohlsi* (SOUSA. et al., 2017).

Bactérias do gênero *Wolbachia* também é muito comum em pulgas. Elas foram incluídas na família Anaplasmataceae, juntamente com os gêneros *Ehrlichia*, *Neorickettsiae* e *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001), e são considerados endossimbionte nos simfonápteros. Estudos mostram que *Wolbachia spp.* causa partenogênese, morte dos machos e feminização nos artrópodes, o que interfere na biologia, ecologia e evolução de seus hospedeiros (WERREN et al., 2008; DOUDOUMIS et al., 2012). No Brasil, um estudo recente avaliou a presença de patógenos e endossimbiontes em pulgas coletadas de *D. aurita*. Nos espécimes encontrados, *C. felis* e *X. cheopis*, foi detectado DNA de *Wolbachia pipientis* (BEZERRA-SANTOS et al., 2020).

CAPITULO I

**PESQUISA DE AGENTES TRANSMITIDOS POR CARRAPATOS DE VIDA
LIVRE EM UM FRAGMENTO FLORESTAL NO ESTADO DO PARÁ,
AMAZÔNIA ORIENTAL, BRASIL**

RESUMO

A Floresta Amazônica é considerada como a floresta tropical com a maior biodiversidade do mundo. Estudos sobre a fauna de carrapatos da região Norte brasileira tem se concentrado principalmente na Amazônia Ocidental. Este estudo teve como objetivos detectar a presença de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Borrelia* spp. em carrapatos de vida livre coletados em um fragmento florestal da Amazônia Oriental, no estado do Pará, Brasil, bem como a distribuição espacial e abundância das espécies encontradas. O fragmento foi dividido em três tratamentos (interior, borda e área rural-urbana adjacente ao fragmento). Em todos os fragmentos, os carrapatos foram coletados de acordo com a técnica de arraste, perneiras de flanela e armadilha atrativa de CO₂. As ninfas e os adultos foram morfológicamente identificados usando chaves específicas, enquanto as larvas foram submetidas à identificação molecular. Foi realizada a extração de DNA dos carrapatos e o DNA extraído foi testado para a presença de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Borrelia* spp. por meio da reação em cadeia da polimerase. Foram calculados os índices de riqueza, abundância e diversidade das espécies, bem como aplicado o Método de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) para avaliar os padrões de similaridade biológica das espécies entre os diferentes tratamentos. No total, 561 carrapatos em fase de vida livre (525 larvas, 29 ninfas e 7 adultos) foram capturados, distribuídas em oito espécies: *Amblyomma cajennense sensu stricto*, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma geayi*, *Amblyomma goeldii*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma naponense*, *Amblyomma paca* e *Amblyomma varium*. *Rickettsia bellii* foi detectada em uma larva de *A. varium* e em uma larva de *A. goeldii*. Todas as amostras de DNA dos carrapatos testados foram negativas para *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Borrelia* spp. A abundância e a riqueza de espécies estiveram associadas ao interior da floresta, e a diversidade esteve associada à borda do fragmento. No entanto, a análise NMDS mostrou que estatisticamente não há variação entre os tratamentos (p=0.517). Esse é o primeiro de *R. bellii* em *A. varium* e *A. goeldii* no Brasil.

Palavras-Chave: Agentes patogênicos, *Amblyomma*, Amazônia, Brasil

ABSTRACT

The Amazon Forest is considered to be the tropical forest with the greatest biodiversity in the world. Studies on the tick fauna of the northern Brazilian region have been concentrated in the Western Amazon. This study aimed to detect the presence of *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. and *Borrelia* spp. in free-living ticks collected in a forest fragment in the Eastern Amazon, in the state of Pará, Brazil, as well as the spatial distribution and abundance of the species found. The fragment was divided into three treatments (interior, border and rural-urban area adjacent to the fragment). In all fragments, ticks were collected according to the technique of drag, leggings and attractive flannel trap CO₂. Nymphs and adults were morphologically identified using specific keys, while the larvae were subjected to molecular identification. DNA extraction from ticks was performed and the extracted DNA was tested for the presence of *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Borrelia* spp. por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). In total, 561 free-living ticks (525 larvae, 29 nymphs and 7 adults) were captured, distributed in eight species: *Amblyomma cajennense sensu stricto*, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma geayi*, *Amblyomma goeldii*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma naponense*, *Amblyomma pacaе* and *Amblyomma varium*. As a result, *Rickettsia bellii* was detected in an *A. varium* larva and in an *A. goeldii* larva. All DNA samples from the tested ticks were negative for *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. and *Borrelia* spp. This is the first record of *R. bellii* in *A. varium* and *A. goeldii* in Brazil.

Keywords: Pathogens, *Amblyomma*, Amazonia, Brazil

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes cosmopolitas e considerados uma ameaça à saúde animal e humana, por serem vetores de inúmeros agentes patogênicos (JONGEJAN et al., 2004; DANTAS-TORRES et al., 2012). No Brasil, atualmente a fauna de carrapatos é contabilizada por 73 espécies, sendo a maioria pertencente ao gênero *Amblyomma* (DANTAS-TORRES et al., 2019).

Estudos visando conhecer a fauna de carrapatos da região Norte brasileira tem se concentrado na Amazônia Ocidental, especificamente em Rondônia, o estado brasileiro que mais tem sido explorado nesse quesito nos últimos anos e, por isso, é considerado como o mais rico em espécies de carrapatos até então (LABRUNA et al., 2002a; LABRUNA et al., 2005; LABRUNA et al., 2010; MARTINS et al., 2010; KEMPER et al., 2013; MARTINS et al., 2016). No entanto, na Amazônia Oriental, estudos sobre a fauna de carrapatos e os agentes patogênicos que eles transmitem ainda são escassos, especialmente no estado do Pará (OGRZEWALSKA et al., 2010; SERRA-FREIRE, 2010a; SCOFIELD et al., 2011; MARTINS et al., 2014a; SOARES et al., 2015, NASCIMENTO et al., 2017).

A Floresta Amazônica é considerada como a floresta tropical com a maior biodiversidade do mundo (SILVA et al., 2005), no entanto o desmatamento para expansão agropecuária e urbanização, tem fragmentado grandes áreas de florestas contínuas. O processo de fragmentação florestal e a urbanização de áreas florestais tem modificado o ecossistema de várias espécies silvestres e conseqüentemente a ecologia da transmissão de patógenos. Como conseqüência, artrópodes vetores passam a parasitar outros hospedeiros adaptados, inclusive o homem, facilitando a dispersão de patógenos para áreas rurais, periurbanas e urbanas (BRADLEY et al., 2007). Neste contexto, o presente estudo teve como objetivos detectar a presença de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp. e *Borrelia* spp. em carrapatos de vida livre coletados em um fragmento florestal da Amazônia Oriental, no estado do Pará, Brasil, bem como a distribuição espacial e abundância das espécies encontradas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos e legais da pesquisa científica

Esta pesquisa foi realizada após aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto Evandro Chagas (nº 021/2014 CEUA/ IEC). A coleta a campo e o transporte de amostras biológicas foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob o nº 58710-4.

2.2 Área de estudo e Captura dos carrapatos em fase de vida livre

A captura dos carrapatos em vida livre ocorreu em um fragmento florestal do estado do Pará, situado na Vila Ananim (01°06'29.1"S e 047°19'52.9"W), no município de Peixe-Boi, pertencem a mesorregião Nordeste Paraense (Figura 1). Foram realizadas duas expedições de coleta de 10 dias consecutivos cada, uma no mês de maio e outra no mês de setembro de 2015.

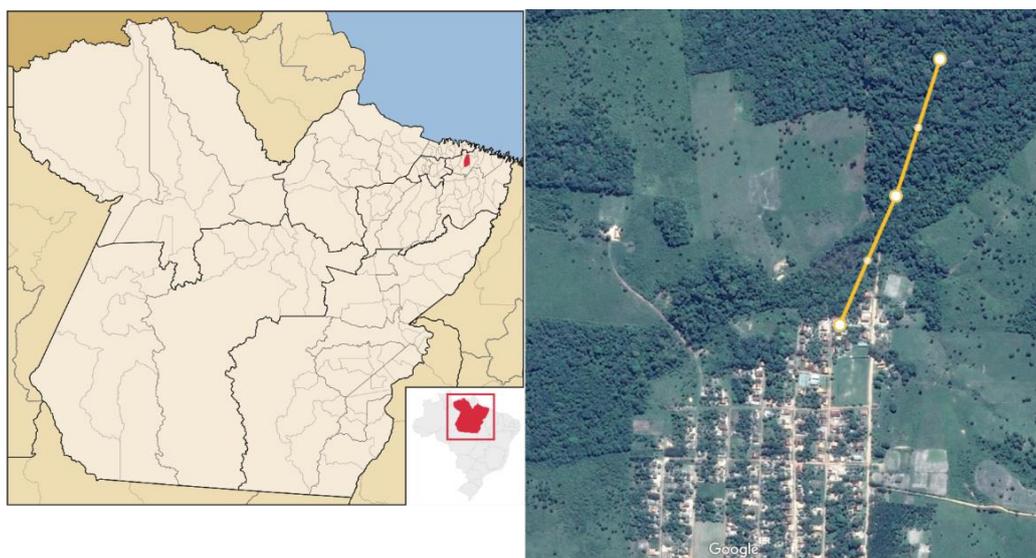


Figura 1. Local de captura dos carrapatos. **A)** Mapa do estado do Pará, com destaque ao município de Peixe-Boi (vermelho); **B)** Pontos de coleta dos carrapatos (linha amarela, trilha principal), no fragmento florestal situado na Vila Ananim, Peixe-Boi, Pará.

Para a amostragem dos carrapatos em fase de vida livre, o fragmento florestal foi considerado como uma estação de amostragem (EA), que foi dividida em três áreas:

área A, considerado o interior do fragmento florestal; área B, a borda do fragmento florestal; e área C, a área urbano-rural adjacente ao fragmento florestal (Figura 2).

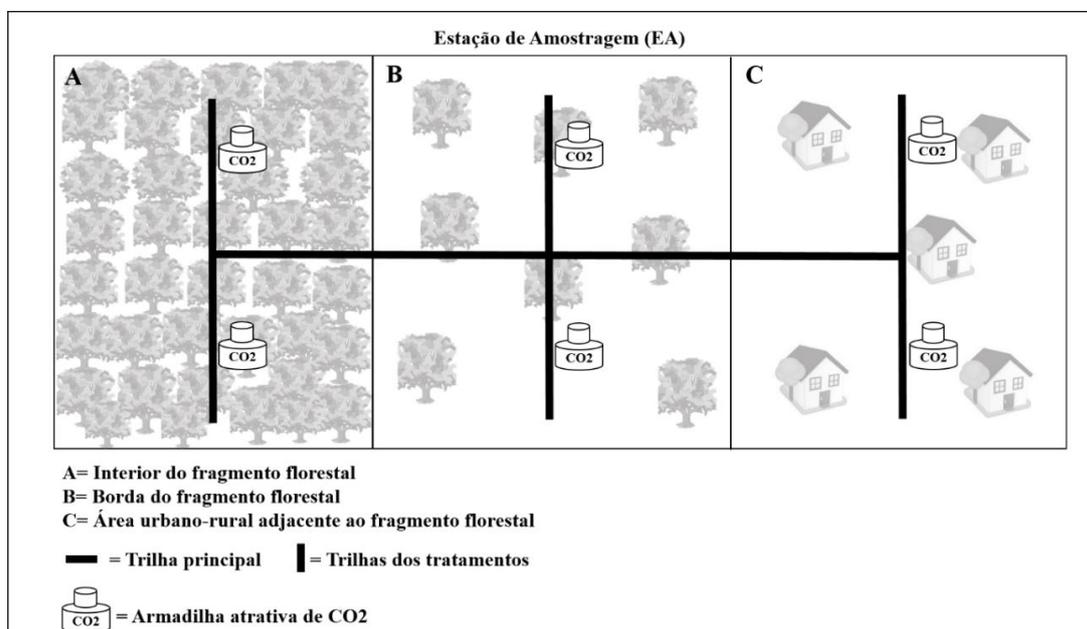


Figura 2. Desenho amostral do fragmento florestal de Peixe-Boi, considerado uma Estação de Amostragem (EA).

Foram empregadas três técnicas para captura dos carrapatos: arrasto com flanela (OLIVEIRA et al., 2000); “*walking trap*” ou perneiras de flanela (GINSBERG et al., 1989) e armadilha atrativa de CO₂ (CANÇADO et al., 2008) (Figura 3). A captura dos carrapatos de vida livre ocorreu sempre nas primeiras horas da manhã (entre 06:30 h e 09:30h).

Na técnica de arrasto, uma flanela branca (1,50m X 0,80m) fixada a uma vara de madeira (0,85m) amarrada a um barbante na extremidade anterior é arrastada sobre a vegetação das trilhas (Figura 3A). A técnica “*walking trap*” consiste em caminhar pela vegetação usando perneiras de flanela branca (Figura 3B). Essas técnicas têm como objetivo capturar os carrapatos em fase de vida livre que possivelmente estivessem sobre a vegetação a espera de um hospedeiro, e eram executadas na trilha de cada área (Figura 1), e eventualmente em algumas trilhas naturalmente abertas por animais silvestres. Periodicamente, tanto os arrastes como as perneiras eram vistoriados a olho nu para a verificação da presença de algum carrapato. No geral, foi obtido um esforço

amostral de 60 peneiras por expedição (6 peneiras por dia x total de 10 dias) e 30 arrastes por expedição (3 arrastes por dia x total de 10 dias).

Para a armadilha atrativa de CO₂, utilizou-se 300 ml de ácido láctico 20% e 125 g de carbonato de cálcio. Devido ao desenvolvimento do trabalho se dar em ambiente de floresta, com o intuito de evitar que as folhas e gravetos das árvores impedissem o fluxo de ácido láctico para o recipiente inferior, o recipiente superior foi coberto com tecido (tipo organza) (Figura 3C). A armadilha atrativa de CO₂ foi montada em dias alternados por duas horas durante a manhã, em dois pontos fixos em cada área, distanciados entre si por 300 metros (Figura 1). O esforço amostral foi de 30 armadilhas atrativa de CO₂ por expedição (6 armadilhas atrativa de CO₂ por dia x 5 dias).



Figura 3. Técnicas de captura de carrapatos em vida livre empregadas no fragmento florestal de Peixe-Boi, PA: **A)** arraste com flanela; **B)** “walking trap” ou perneiras de flanela; **C)** armadilha atrativa de CO₂ com destaque ao tecido (tipo organza) fixado com auxílio de elástico no recipiente superior.

2.6 Identificação dos Carrapatos

Uma vez coletados, os exemplares de carrapatos foram acondicionados em microtubos (2ml) contendo álcool isopropílico. Larvas, ninfas e adultos foram contabilizados e analisados individualmente. Adultos e ninfas foram identificados morfológicamente de acordo com Barros-Battesti et al. (2006) e Martins et al. (2010) respectivamente. Quando as larvas foram encontradas isoladamente, elas foram identificadas usando análise molecular (procedimento descrito posteriormente); quando coletadas do ambiente em *clusters*, cada *cluster* foi considerado uma unidade única e um *pool* contendo cinco larvas representou o *cluster* para identificação molecular (OGRZEWALSKA et al., 2009).

2.7 Análises Moleculares

2.7.5 Extração de DNA

A extração de DNA dos carrapatos em estágio larval foi realizada empregando-se a técnica de fervura, como realizado por Horta et al. (2005). Resumidamente, cada larva ou um *pool* de larvas representando um único *cluster* do ambiente foram maceradas na presença de tampão (TE, Tris EDTA), o material resultante foi centrifugado a 16000 xg e aquecido a 100°C, por 30 minutos.

Já a extração de DNA das ninfas e adultos foi realizada individualmente de cada carrapato pelo método Fenol/Fenol-Clorofórmio, de acordo com o protocolo estabelecido por (SANTOLIN, 2014).

2.7.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR foi realizada tanto para a identificação molecular a nível de espécie das larvas, quanto para a pesquisa de microrganismos dos gêneros *Rickettsia*, *Ehrlichia*, *Anaplasma* e *Borrelia*. Para isso, a tabela 1 mostra os *primers* específicos que foram utilizados.

Para a detecção de DNA da Família Ixodidae e de *Rickettsia* spp. foram realizadas PCR convencional em microtubos de 200µl adicionando 2,0µl de DNA extraído acrescido de 23 µl de *Master mix* [tampão 1X (5X Colorless GoTaq[®], Promega[®]), 2,5mM de MgCl₂ (Promega[®] MgCl₂ Solution), 200µM de dNTP's, 0,8

pmoles de cada *primer*, 0,75U de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e água proporcional] para se obter um volume final de 25µL.

O teste para detecção de DNA de *Ehrlichia* spp. foi realizado com reações de *semi-Nested* PCR e para *Anaplasma* e *Borrelia* *Nested*-PCR, onde a primeira reação foi feita em microtubos de 200µl adicionando 3,0µl de DNA extraído acrescido de 22 µl de *Master mix* [tampão 1X (5X Colorless GoTaq®, Promega®), 2,5mM de MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), 200µM de DNTP's, 0,4 pmoles de cada *primer*, 1U de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e água proporcional] para se obter um volume final de 25µL; e a segunda reação foi feita com 1µl do produto de PCR amplificado da primeira reação acrescido de 24µl de *Master mix* [tampão 1X (5X Colorless GoTaq®, Promega®), 2,5mM de MgCl₂ (Promega® MgCl₂ Solution), 200µM de DNTP's, 0,4 pmoles de cada *primer*, 1 U de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega®), e água proporcional] para se obter um volume final de 25µL.

Gene/ Primers	Especificidade	Sequência dos primers (5'-3')	Fragmento amplificado	Referência
16SrRNA 16S+ 16S- <i>gltA</i>	Família Ixodidae	CCGGTCTGAAGTCAGATCAAGT GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT	460 pb	MANGOLD et al., 1998
CS239 F CS1069 R <i>dsb</i>	<i>Rickettsia</i> spp.	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	834 bp	LABRUNA et al., 2004
DSB-330 DSB-380 DSB-720 <i>flaB</i>	<i>Ehrlichia</i> spp.	GATGATGCTTGAAGATATSAAACAA AT ATTTTTAGRGATTTTCCAATACTTGG CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAW ATC	349 bp	ALMEIDA et al., 2013
BorFlaF1 BorFlaR1 BorFlaF2 BorFlaR2	<i>Borrelia</i> spp.	TACATCAGCTATTAATGCTTCAAGA A GCAATCATWGCCATTGCRGATTG CTGATGATGCTGCTGGWATGG TCATCTGTCAATRTWGCATCTT	740 pb	BLANCO et al., 2017
16S rRNA ge3A ge10R ge9F ge2	<i>Anaplasma</i> spp.	CACATGCAAGTCGAACGGAT TATTC TTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC AACGGATTATTCTTTATAGCTTGCT GGCAGTATTAAGCAGCTCCAGG	546 bp	MASSUNG et al., 1998

Quadro 1. Sequências dos primers utilizados, juntamente com os respectivos genes alvo e o tamanho do fragmento amplificado.

As condições dos ciclos da PCR para Família Ixodidae foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 6 ciclos de 94°C por 20

segundos, 47 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos; depois mais 32 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50 °C por 30 segundos e 72 °C por 45 segundos, com extensão

final a 72°C por 5 minutos. Como controle positivo das reações foi utilizado DNA de carrapato *Rhipicephalus microplus* previamente testado.

Para as reações de PCR visando *Rickettsia* spp., as condições de temperatura foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 94°C por 20 segundos, 52 °C por 20 segundos e 72 °C por 25 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Foi usado DNA de *Rickettsia parkeri* cepa at24 como controle positivo.

As reações de semi-Nested PCR para *Ehrlichia* foram realizadas nas seguintes temperaturas: primeira reação tendo desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos; e segunda reação com mudança apenas na temperatura de extensão, 52°C. Foi usado DNA de sangue de um cão doméstico infectado naturalmente por *Ehrlichia canis* como controle positivo.

Para as reações de Nested-PCR visando *Borrelia* spp., tanto na primeira quanto na segunda reação, as condições de temperatura foram as seguintes: desnaturação inicial a 95°C por 4 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Foi usado DNA de *Borrelia anserina* em cultivo como controle positivo.

E por fim, as condições de temperatura referentes as duas reações de nested PCR para *Anaplasma* spp. foram: desnaturação inicial a 95°C por 3 minutos, seguidos por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 50°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Foi usado DNA de sangue de um cão doméstico infectado naturalmente por *Anaplasma platys* como controle positivo. Como controles negativos para todas essas reações, foi utilizado água ultrapura aplicada dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *master mix*. Todas as reações de PCR foram realizadas em termociclador modelo T100 (Bio-rad®).

2.7.7 Eletroforese e análise dos resultados

Um volume de 10 µL dos produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100bases DNA Ladder, product #SM024, Thermo Scientific).

2.7.8 Sequenciamento

O material para sequenciamento foi purificado a partir de 5µL do produto de PCR das amostras positivas, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções em um analisador genético automatizado (ABI 3730 DNA Analyser, Thermo Fisher Scientific®) na Rede de Plataformas Tecnológicas – PDTIS/FIOCRUZ Plataforma de Sequenciamento de DNA – RPT01A. As sequências obtidas foram alinhadas através do programa DNA Baser® e submetidas a pesquisa de homologia com outras sequências depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTn.

2.5 Análises Ecológicas dos dados

A determinação da riqueza foi feita pela contagem do número total de espécies incluindo todos os métodos de captura, sendo calculada para cada área amostrada. A abundância foi calculada para determinar o tamanho da população de cada espécie nas áreas amostradas, considerando a quantidade total de indivíduos de uma determinada espécie. A diversidade, composta pela variedade de espécies e o número de indivíduos dentro de cada espécie, foi avaliada usando a riqueza e o Índice de Shannon (SHANNON, 1948). O Índice de Shannon é dado por:

$$H' = \frac{\left[N \ln(N) - \sum_{i=1}^S n_i \ln(n_i) \right]}{N}$$

Em que:

N = número total de indivíduos amostrados

n_i = número de indivíduos amostrados da i -ésima espécie

S = número de espécies amostradas

\ln = logaritmo de base neperiana (e)

Para avaliar os padrões de similaridade biológica das espécies de carrapatos entre as diferentes áreas amostradas, foi realizado uma análise de ordenação pelo Método de Escalonamento Multidimensional Não-Métrico (NMDS) em duas dimensões (área X espécies). Essa técnica representa as amostras como pontos em um espaço de ordenação, onde as distâncias relativas entre os pontos refletem as similaridades relativas das amostras em relação à abundância e à composição. Essa abordagem é apropriada para dados contáveis (abundância), juntamente com o uso do coeficiente de similaridade Bray-Curtis, devido ao potencial de alta ocorrência de zeros. A distância de Bray-Curtis foi calculada entre as amostras usando os grupos das espécies de carrapatos. A qualidade do ajuste NMDS foi estimada com uma função de estresse (que varia de 0 a 1) com valores próximos a zero indicando um bom ajuste.

Todos os dados foram organizados no Microsoft Excel e analisados no software estatístico R, ao nível de significância de 5%.

3 RESULTADOS

Um total de 561 carrapatos em fase de vida livre (525 larvas, 29 ninfas e 7 adultos) foram capturados, sendo a maioria ($430/561 = 76,6\%$) oriundos da área A, isto é, do interior do fragmento florestal (Tabela 2).

No total foram identificadas oito espécies de carrapatos nesse fragmento florestal, todas pertencentes ao gênero *Amblyomma*, descritas a seguir: *Amblyomma cajennense sensu stricto*, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma geayi*, *Amblyomma goeldii*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma naponense*, *Amblyomma pacaе* e *Amblyomma varium* (Tabela 2).

A tabela 3 mostra a identificação a nível de espécie dos carrapatos em estágio larval através de análises moleculares. Não foi possível a identificação molecular de larvas oriundas de 3 *clusters* e de 27 larvas individuais, ficando apenas a nível de gênero, *Amblyomma* spp. (tabela 2), pois essas amostras não amplificaram para o gene 16S rRNA, específico para carrapatos da família Ixodidae, possivelmente por conta da baixa sensibilidade do *primer* associado ao método de conservação e extração. A figura 4 mostra a identificação morfológica das ninfas e adultos: ninfa de *Amblyomma cajennense sensu stricto* (Figura 4.A), ninfa de *Amblyomma calcaratum* (Figura 4.B), ninfa de *Amblyomma humerale* (Figura 4.C), ninfa de *Amblyomma naponense* (Figura 4.D), adulto de *Amblyomma pacaе* (Figura 4.E) e ninfa de *Amblyomma varium* (Figura 4.F).

Tabela 2. Distribuição das espécies de carrapatos no fragmento florestal de acordo com as áreas.

Espécie de carrapato	Áreas			Total
	A	B	C	
<i>A. cajennense</i> (s. s.)	1 (L)	2 (M) 1 (F) 1 (L)	1 (M) 3 (N)	9
<i>A. naponense</i>	2 (M) 1 (L) 6 (N) 45 (CL)	11 (N) 1 (L)	-	66
<i>A. humerale</i>	4 (N) 4 (L)	6 (L)	-	14
<i>A. calcaratum</i>	2 (N) 3 (L) 103 (CL)	1N	-	109
<i>A. pacaе</i>	1 (M)	-	-	1
<i>A. varium</i>	1 (N) 3 (L)	2 (N) 1 (L) 63 (CL)	3 (L)	73
<i>A. goeldii</i>	1 (L) 36 (CL)	1 (L)	-	38
<i>A. geayi</i>	1 (L)	-	-	1
<i>Amblyomma</i> spp.	85 (CL) 116 (CL) 15 (L)	11 (L)	22 (CL) 1 (L)	250
Total	430	101	30	561

A= interior do fragmento florestal; **B**= borda do fragmento florestal; **C**= área urbano-rural adjacente ao fragmento florestal

M= macho; **F**= fêmea; **N**= ninfa; **L**= larva; **CL**= número equivalente a um *cluster* de larvas

Tabela 3. Número de larvas de carrapatos de acordo com as áreas do fragmento florestal e identificação molecular a nível de espécie.

Área	Número de Larvas	Espécies
A	45*	<i>Amblyomma naponense</i>
	1	<i>Amblyomma naponense</i>
	4	<i>Amblyomma humerale</i>
	1	<i>Amblyomma geayi</i>
	103*	<i>Amblyomma calcaratum</i>
	3	<i>Amblyomma calcaratum</i>
	1	<i>Amblyomma cajennense s.s.</i>
	3	<i>Amblyomma varium</i>
	1	<i>Amblyomma goeldii</i>
	36*	<i>Amblyomma goeldii</i>
	85*/ <i>Amblyomma</i> spp.	-
	116*/ <i>Amblyomma</i> spp.	-
	15/ <i>Amblyomma</i> spp.	-
B	6	<i>Amblyomma humerale</i>
	1	<i>Amblyomma naponense</i>
	2	<i>Amblyomma varium</i>
	63*	<i>Amblyomma varium</i>
	1	<i>Amblyomma goeldii</i>
	1	<i>Amblyomma cajennense s.s.</i>
	11/ <i>Amblyomma</i> spp.	-
C	3	<i>Amblyomma varium</i>
	22*/ <i>Amblyomma</i> spp.	-
	1/ <i>Amblyomma</i> spp.	-
Total	525	

*Contagem individual de um *cluster* de larvas capturadas no ambiente.

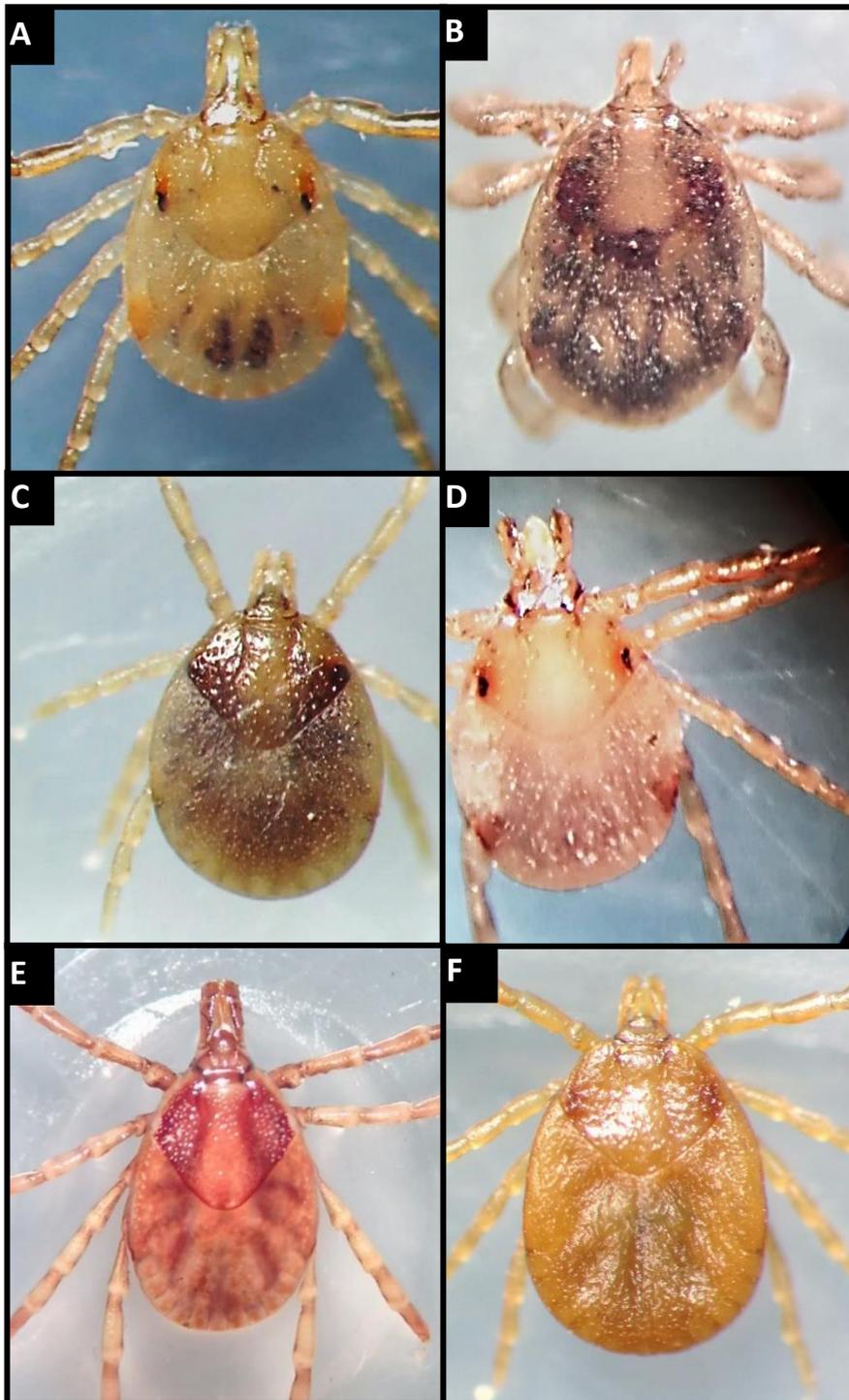


Figura 4. Identificação morfológica das ninfas e adultos dos carrapatos: A) Ninfa de *Amblyomma cajennense s.s.*; B) Ninfa de *Amblyomma calcaratum*; C) Ninfa de *Amblyomma humerale*; D) Ninfa de *Amblyomma naponense*; E) Adulto de *Amblyomma paciae*; F) Ninfa de *Amblyomma varium*.

Em relação a distribuição das espécies de carrapato no fragmento florestal, exemplares todas as espécies identificadas foram encontrados no interior da floresta (área A), seguido por seis espécies na borda do fragmento florestal (área B) tais como *A. humerale*, *A. naponense*, *A. varium*, *A. goeldii*, *A. cajennense s.s.* e *A. calcaratum*; e duas espécies na área urbano rural adjacente ao fragmento florestal (área C), sendo *A. cajennense s.s.* e *A. varium* (tabela 2). Ao avaliar a abundância, a riqueza e a diversidade (índice de Shannon), observa-se que abundância e a riqueza de espécies estiveram associadas ao interior do fragmento florestal (área A), e a diversidade esteve associada à área de transição, isto é, a borda do fragmento (área B) (Figura 5). No entanto, o resultado da análise NMDS mostrou que, estatisticamente, não há variação entre as áreas (interior, borda e urbano-rural) ($p=0.517$) (Figura 5).

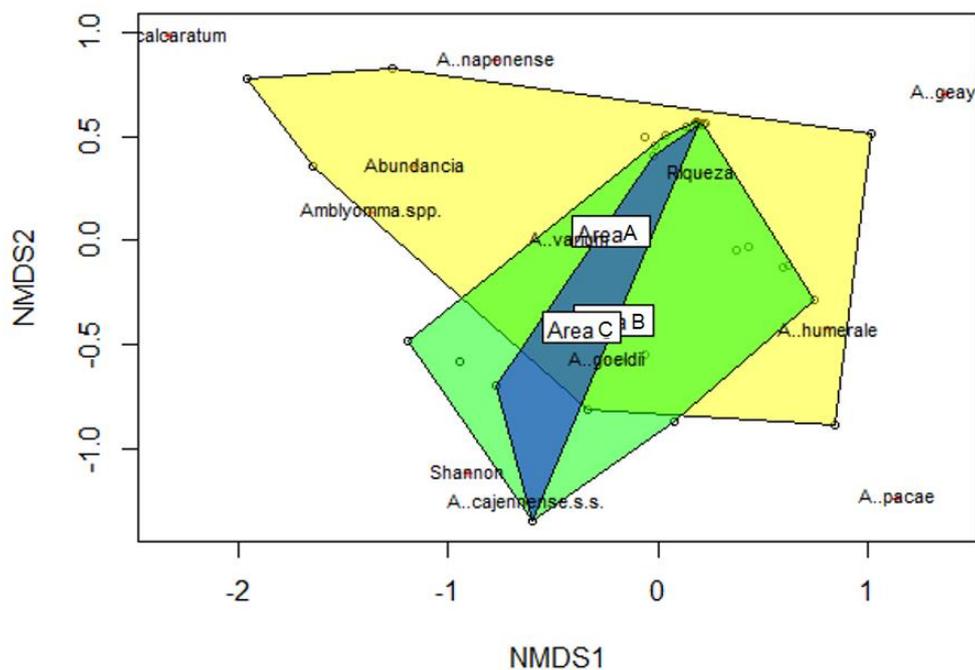


Figura 5. Análise de escala multidimensional não-métrica (NMDS) relacionando as espécies de carrapatos distribuídas nas três áreas, riqueza, índice de Shannon e abundância. **Área A** (interior da floresta) em amarelo; **Área B** (borda da floresta) em verde; e **Área C** (urbano-rural) em azul. ($p=0.517$; stress= 0.10).

A análise molecular visando a amplificação do gene *gltA*, presente em *Rickettsia* spp., mostrou que duas amostras continham DNA riquetsial, correspondendo a uma larva de *A. varium* capturada na área urbano-rural adjacente ao fragmento florestal e uma larva de *A. goeldii* oriunda da borda da floresta. Os fragmentos foram sequenciados

e analisados para determinar sua similaridade com sequências de outras espécies depositadas no GenBank. O sequenciamento dos *amplicons* gerados para ambas as espécies *A. varium* e *A. goeldii* mostrou 100% de similaridade com *Rickettsia bellii* (DQ865204 e MK9626971 respectivamente). Os números de acesso à sequência de nucleotídeos GenBank para as sequências parciais geradas no presente estudo são: MT012706 e MT012707.

Todas as amostras testadas foram negativas para *Ehrlichia*, *Borrelia* e *Anaplasma*.

4 DISCUSSÃO

De modo geral, a abundância e a riqueza dos carrapatos foram mais expressivas no interior do fragmento florestal. Estudos comprovam que o processo de fragmentação provoca mudanças microclimáticas no ambiente (GEHLHAUSEN et al., 2000; BRUNA, 2002). O microclima no interior da floresta geralmente é mais favorável para proliferação para algumas espécies, em comparação com o microclima da borda (alta temperatura e baixa umidade) (DAVIES-COLLEY et al., 2000). Isso pode ser um dos fatores determinantes para presença e/ou ausência de carrapatos numa área florestal, já que esses ectoparasitas são totalmente influenciados pelos fatores climáticos, como temperatura e umidade, que necessitam estar em equilíbrio para garantir a sobrevivência e perpetuação desses artrópodes (ESTRADA-PEÑA et al., 2013). De fato, as condições ambientais são particularmente mais importantes para carrapatos heteroxeno, tais como *Amblyomma* spp., pois cerca de 97% de sua vida é fora do hospedeiro (NEEDHAM, TEEL, 1991).

O índice de diversidade dos carrapatos foi mais expressivo na borda da floresta e não houve diferença estatística entre as áreas amostradas em relação a distribuição das espécies de carrapatos identificadas. Isso significa que o tipo de área não influencia como *habitat* para as espécies de carrapatos, que podem ser encontrados em qualquer uma delas. Como se trata de ambiente perturbado, onde há um intenso avanço das ações antrópicas sob o ambiente natural local, a dinâmica de comportamento de algumas espécies hospedeiras pode variar (BRADLEY et al., 2007). A facilidade de acesso à comida devido a quintais com plantação, por exemplo, pode favorecer a dispersão de animais silvestres com hábitos sinantrópicos, e conseqüentemente, a distribuição dos carrapatos em diferentes áreas.

Amblyomma cajennense s.s. foi encontrado principalmente na borda e área urbano-rural. Trata-se de uma espécie com ocorrência restrita à região Norte do Brasil, inclusive no estado do Pará (NAVA et al., 2014). Possui uma baixa especificidade alimentar, parasitando uma grande diversidade de hospedeiros, inclusive o homem (SERRA-FREIRE, 2010). Além disso, é um carrapato bem adaptado a ambientes naturais modificados pela ação antrópica (MARTINS et al., 2016).

As outras espécies de carrapatos identificadas ficaram mais restritas ao interior e borda da floresta. Isso pode estar relacionado a preferência de hospedeiros, que

geralmente são silvestres. As espécies de carrapatos *A. varium*, *A. geayi* e *A. calcaratum* tem como hospedeiros principais mamíferos da Ordem Xenarthra. As preguiças são os hospedeiros principais para a fase adulta de *A. varium* e *A. geayi* (MARQUES et al., 2002; LABRUNA, 2009). Porém, no estado do Pará, *A. varium* também já foi encontrada alimentando-se em humanos (SERRA-FREIRE, 2010), e os estágios imaturos de *A. geayi* parasitando passeriformes (OGRZEWALSKA et al., 2010). A fase adulta de *A. calcaratum* demonstra bastante especificidade a tamanduás (*Myrmecophaga* e *Tamandua* spp.) (GUGLIELMONE et al., 2003), enquanto que as fases imaturas são frequentemente encontradas em passeriformes (LABRUNA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2010).

Amblyomma naponense é comumente encontrado em suídeos selvagens *Tayassu pecari* e *Pecari tajacu* (GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA et al., 2010), mas o estágio ninfal já foi registrado em aves silvestres (OGRZEWALSKA et al., 2009).

As espécies *A. humerale* e *A. goeldii* são consideradas carrapatos de animais de sangue frio. *Amblyomma humerale* é endêmica da floresta amazônica, onde os adultos parasitam principalmente quelônios terrestres (*Geochelone* spp.) (LABRUNA et al., 2002a). Fases imaturas dessa espécie de carrapato também já foram registradas em aves selvagens (OGRZEWALSKA et al., 2010; MARTINS et al., 2014a). *Amblyomma goeldii* também é restrita a região amazônica (MARTINS et al., 2014b; MARTINS et al., 2015). Os répteis, sobretudo as cobras, são considerados os hospedeiros principais para a fase adulta desse carrapato (MARTINS et al., 2015), no entanto, adultos já foram registrados em anfíbios, como sapos (THOMPSON, 1950) e em mamíferos como tamanduás (SOARES et al., 2015).

Amblyomma paca tem como hospedeiro principal a paca (Rodentia: Cuniculidae) (ARAGÃO, 1936), mas já foi relatado em outras espécies silvestres, como queixada (*Tayassu pecari*), tamanduá (*Tamandua tetradactyla*) e anta (*Tapirus bairdii*) (GUGLIELMONE et al., 2014; GUZMÁN-CORNEJO et al., 2006); em animais domésticos como o cão; e também em seres humanos (GUIMARÃES et al., 2001; GUGLIELMONE et al., 2006).

No presente estudo, DNA de *R. bellii* foi detectado em duas espécies de carrapatos. Nos últimos anos, essa bactéria foi detectada em carrapatos de diferentes partes da América Latina (LABRUNA et al., 2011), incluindo 17 espécies do gênero *Amblyomma* (ACOSTA et al., 2018). De fato, por esse agente riquetsial ser tão comumente encontrado em *Amblyomma* spp., alguns autores sugerem a existência de

uma co-evolução simbiótica entre o carrapato e a riquetsia (LABRUNA et al., 2004; MCINTOSH et al., 2015). Trata-se de um agente rickettsial de patogenicidade ainda desconhecida (LABRUNA et al., 2011), porém, La Scola et al. (2009) observaram formação de escara de inoculação em cobaias após uma infecção experimental. Além disso, existem estudos no Brasil com base em dados sorológicos mostrando que essa bactéria pode causar infecções naturais em capivaras, cães e cavalos (PACHECO et al., 2007; SPOLIDORIO et al., 2013; TOLEDO et al., 2018; BUDWEG et al., 2019).

No Brasil, *Rickettsia bellii* já foi detectada em diversas espécies pertencente ao gênero *Amblyomma*, tais como *A. auricularium*, *A. aureolatum*, *A. cajennense s.s.*, *A. dubitatum*, *A. humerale*, *A. incisum*, *A. longirostre*, *A. naponense*, *A. nodosum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. rotundatum* e *A. sculpturatum* (LABRUNA et al., 2004; SABATINI et al., 2010; OGRZEWALSKA et al., 2011; LUGARINI et al., 2015; BRITES-NETO et al., 2015; SOARES et al., 2015; MCINTOSH et al., 2015; MOERBECK et al., 2016; ARAUJO et al., 2015; LUZ et al., 2018). O presente trabalho traz o primeiro relato de *R. bellii* em carrapatos das espécies *A. varium* e em *A. goeldii*. Até o presente momento, havia apenas um registro de *R. bellii* em *A. varium*, publicado por no Peru, onde larvas dessa espécie de carrapato foram coletadas em passeriformes. O carrapato *A. goeldii* ainda é pouco estudado, devido à escassez de espécimes encontrada em seus hospedeiros, principalmente os estágios imaturos (MARTINS et al., 2015), portanto pouco se sabe sobre os hemoparasitos que essa espécie pode albergar.

Não foram detectados DNA de *Ehrlichia*, *Anaplasma* ou *Borrelia* nos carrapatos do presente estudo. Outros estudos também não detectaram *Ehrlichia* (GRUHN et al., 2019), sugerindo que ainda não há evidências de infecção por esse patógeno em *Amblyomma* no Brasil (GRUHN et al., 2019). Alguns trabalhos anteriores detectaram *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* em carrapatos *A. sculptum*, *A. parvum*, *A. triste* e larvas e ninfas de *Amblyomma*, porém estavam parasitando animais selvagens (WIDMER et al., 2011; MELO et al., 2016; SOUSA et al., 2018). Portanto, há de se considerar que essa positividade para DNA de *Ehrlichia* ou *Anaplasma* pode estar relacionada aos restos da refeição sanguínea do artrópode vetor no hospedeiro infectado (SOUSA et al., 2017).

Da mesma forma, Ogrzewalska et al. (2019) não detectaram piroplasmídeos em carrapatos *Amblyomma*, mas ressaltam a importância de se realizar mais pesquisas relacionadas, uma vez que não descartam a possível circulação desses patógenos entre as espécies de carrapatos no Brasil.

De forma semelhante, é importante continuar pesquisar *Borrelia* spp. em carrapatos, pois recentemente DNA desse agente foi detectado em carrapatos do gênero *Amblyomma* no Brasil (PACHECO et al., 2019) e na Argentina (CICUTTIN et al., 2019).

5 CONCLUSÃO

Todas as oito espécies de carrapatos identificadas nesse estudo continham exemplares dentro da floresta, seguido por seis espécies na borda e duas espécies na área urbano-rural.

Ao avaliar a abundância, riqueza e diversidade, observou-se que a abundância e a riqueza de espécie de carrapato estiveram associadas ao interior do fragmento florestal, enquanto que a diversidade esteve associado a borda. Porém, de acordo com a análise NMDS, não houve variação estatística entre as áreas (interior, borda e área urbano-rural), o que mostra que a distribuição das espécies nesse fragmento florestal é homogêneo, ou seja, qualquer espécie pode ser encontrado desde o interior da floresta até a área urbano-rural.

Esse estudo traz o primeiro registro de *Rickettsia bellii* em carrapatos das espécies *Amblyomma varium* e em *Amblyomma goeldii* no Brasil.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, A.P., SOUZA, T.D., MARCILI, A., LABRUNA, M.B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, 50(3): 640-646, 2013.
- ACOSTA, I.C.L., LUZ, H.R., FACCINI-MARTÍNEZ, A.A., MUÑOZ-LEAL, S., CERUTTI JUNIOR, C., LABRUNA, M.B. First molecular detection of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in *Amblyomma ovale* ticks from Espírito Santo state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, p. 420-422, 2018.
- ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759-843, 1936.
- BLANCO, C.M., TEIXEIRA, B.R., SILVA A.G., OLIVEIRA, R.C., STRECHT, L., OGRZEWALSKA, M., LEMOS, E.R.S. Microorganisms in ticks (Acari: Ixodidae) collected on marsupials and rodents from Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 8: 90–98, 2017.
- BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases (ICTTD-3)/Butantan; 2006.
- BRITES-NETO, J., DUARTE, K.M.R., MARTINS, T.F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. **Veterinary world**, v. 8, n. 3, p. 301, 2015.
- BUDWEG, C.I., SOUSA, A.O., CARVALHO, T.R.V., SOUZA, Z.E.S., AZEVEDO S.E.R.P.A., M.C., MARTINS, T.F., NIERI-BASTOS, F., MARCILI, A., LABRUNA, M.B., MORAES-FILHO, J. Serological survey of *Rickettsia* in equids from Vale do Paraíba, São Paulo, Brazil, and their tick identification and molecular investigation of *Rickettsia*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 4, p. e158159-e158159, 2019.
- BRUNA, E.M., NARDY, O., STRAUSS, S.Y., HARRISON, S. Experimental assessment of *Heliconia acuminata* growth in a fragmented Amazonian landscape. **Journal of Ecology**, 90:639–649, 2002.

- BRADLEY, C.A., ALTIZER, S. Urbanization and the ecology of wildlife diseases. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 2, p. 95-102, 2007.
- CANÇADO, P.H.D., PIRANDA, E.M., MOURÃO, G.M., FACCINI, J.L.H. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO₂ tick trap. **Parasitology Research**. 103, 371–377, 2008.
- CICUTTIN, G.L., SALVO, M.N., VENZAL, J.M., NAVA, S. *Borrelia* spp. in ticks and birds from a protected urban area in Buenos Aires city, Argentina. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10 (6), 2019.
- DAVIES-COLLEY, R.J., PAYNE, G.W., VAN ELSWIJK, M. Microclimate gradients across a forest edge. **N Z J Ecol**, 24:111–121, 2000.
- DANTAS-TORRES F CHOMEL, BB OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.
- DANTAS-TORRES, F., MARTINS, T.F., MUÑOZ-LEAL, S., ONOFRIO, V.C., BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2019.
- TOLEDO, V.F., ACOSTA, I.C.L., MARTINS, T.F., MORAES, J.F., SILVA KRAWCZAK, F., BARBIERI, A.R.M., EGERT, L., FERNANDES, D.R., BRAGA, F.R., LABRUNA, MB. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 249, p. 43-48, 2018.
- ESTRADA-PEÑA, A.; GRAY, J. S.; KAHL, O.; LANE, R. S.; NIJHOF, A.M. Research on the ecology of ticks and tick-borne pathogens-methodological principles and caveats. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v.3, 2013.
- ESTRADA-PEÑA A OSTFELD, RS PETERSON, AT POULIN, R DE LA FUENTE, J. Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 205-214, 2014.
- GINSBERG, H.S., EWING, C.P. Comparison of Flagging, Walking, Trapping, and Collecting from Hosts as Sampling Methods for Northern Deer Ticks, *Ixodes dammini*, and Lone-Star Ticks, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Experimental & Applied Acarology**. 7, 313-322, 1989.

GUGLIELMONE, A. A. et al. **Ticks (Acari – Ixodidae) of the neotropical zoogeographic region**. Houten: Special Publication, International Consortium on ticks tick-borne of the diseases, 173p, 2003.

GUGLIELMONE A BEATI, L BARROS-BATTESTI, D LABRUNA, M NAVA, S VENZAL, J MANGOLD, A SZABO, M MARTINS, J GONZALEZ-ACUNA, D ESTRADA-PENA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, p. 83 - 100, 2006.

GUIMARÃES JH BATTESTI, DMB TUCCI, EC. **Ectoparasitos de importância veterinária**. 1ª ed. São Paulo: : Plêiade/Fapesp, 2001.

GEHLHAUSEN, S.M., SCHWARTZ, M.W., AUGSPURGER, C.K. Vegetation and microclimatic edge effects in two mixed-mesophytic forest fragments. **Plant Ecology** 147:21–35, 2000.

GRUHN, K.D., OGRZEWALSKA, M., ROZENTAL, T., FARIKOSKI, I.O., BLANCO, C., SOUZA F.L., FRANÇA, R.V.M. Evaluation of rickettsial infection in free-range capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) (Rodentia: Caviidae) and ticks (Acari: Ixodidae) in Western Amazon, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**,

GUZMÁN-CORNEJO, C., PERÉZ, T.M., NAVA, S., PÉREZ, T.M. First records of the ticks *Amblyomma calcaratum* and *Amblyomma pacaе* (Acari: Ixodidae) parasitizing mammals of Mexico. **Rev. Mex. Biodiversit.**, v.77, p.123-127, 2006.

HORTA MC PINTER, A CORTEZ, A SOARES, RM GENNARI, SM SCHUMAKER, TTS LABRUNA, MB. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinaria e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 321-325, 2005.

JONGEJAN, F., UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S3-S14, 2004.

JONES, E.K., CLIFFORD, C.M., KEIRANS, J.E., KOHLS, M.G. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of the *Amblyomma* in the Western Hemisphere. **Brighan Young University Science Bulletin, Biological Series**, v.17, p.1-40, 1972.

- KEMPER, R., ALMEIDA, R., SEPP, J., MARTINS, T., LABRUNA, M., KANADANI, A. Description of *Amblyomma romitii* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in São Francisco do Guapor, Rondônia. **Scientific Electronic Archives**, v. 2, p. 36-38, 2013.
- LABRUNA, M.B., CAMARGO, L.M.A., TERRASSINI, F.A., FERREIRA, F., SCHUMAKER, T.T., CAMARGO, E.P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 10, p. 17, 2005.
- LABRUNA, M.B., CAMARGO, L.M.A., TERRASSINI, F.A., SCHUMAKER, T.T.S., CAMARGO, E.P. Notes on Parasitism by *Amblyomma humerale* (Acari: Ixodidae) in the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 6, p. 814-817, 2002a.
- LABRUNA, M.B., WHITWORTH, T., HORTA, M.C., BOUYER, D.H., MCBRIDE, J.W., PINTER, A., POPOV, V., GENNARI, S.M., WALKER, D.H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, 42: 90-98, 2004.
- LABRUNA MB KASAI, N FERREIRA, F FACCINI, JLH GENNARI, SM. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002a.
- LABRUNA MB MATTAR V, S NAVA, S BERMUDEZ, S VENZAL, JM DOLZ, G ABARCA, K ROMERO, L DE SOUSA, R OTEO, J ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsiosis en America Latina, el Caribe, Espana y Portugal. **Revista MVZ (Medicina Veterinaria y Zootecnia)**, v. 16, n. 2, p. 2435, 2011.
- LABRUNA MB PACHECO, RC RICHTZENHAIN, LJ SZABO, MPJ. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of Sao Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869, 2007.
- LABRUNA, M.B., ROMERO, M., MARTINS, T.F., TOBLER, M., FERREIRA, F. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) infesting tapirs (*Tapirus terrestris*) and Peccaries (*Tayassu pecari*) in Peru. **Systematic and Applied Acarology**, v. 15, n. 2, p. 109-112, 4, 2010.

LABRUNA MB WHITWORTH, T BOUYER, DH MCBRIDE, J CAMARGO, LMA CAMARGO, EP POPOV, V WALKER, HD. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology** v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004.

LUGARINI C MARTINS, TF OGRZEWALSKA, M DE VASCONCELOS, NCT ELLIS, VA DE OLIVEIRA, JB PINTER, A LABRUNA, MB SILVA, JCR. Rickettsial agents in avian ixodid ticks in northeast Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 364-375, 2015.

LUZ HR COSTA NETO, SFD WEKSLER, M GENTILE, R FACCINI, JLH. Ticks parasitizing wild mammals in Atlantic Forest areas in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 3, p. 409, 2018.

MARQUES, S.M., BARROS-BATTESTI, D.M., FACCINI, J.L., ONOFRIO, V.C. Brazilian distribution of *Amblyomma varium* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae), a common parasite of sloths (Mammalia: Xenarthra). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97, 1141–1146; 2002.

MELO AL,WITTER R., MARTINS, F.T., PACHECO, T.A., ALVES, A.S., CHITARRA, C.S., DUTRA, V., NAKAZATO, L., PACHECO, R.C., LABRUNA, M.B., AGUIAR, D.M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 30: 112–116, 2016.

MARTINS, T.F., BARBIERI, A.R.M., COSTA, F.B., TERASSINI, F.A., CAMARGO, L.M.A., PETERKA, C.R.L., RICHARD, C.P., DIAS, R.A., NUNES, P.H., MARCILI, A., SCOFIELD, A., CAMPOS, A.K., HORTA, M.C., GUILLOUX, A.G.A., BENATTI, H.R., RAMIREZ, D.G., BARROS-BATTESTI, D.M., LABRUNA, M.B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & Vectors**, v. 9, 2016.

MARTINS, T.F., ONOFRIO, V.C., BARROS-BATTESTI, D.M., LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75-99, 2010.

MARTINS, T.F., FECCHIO, A., LABRUNA, M.B. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) on wild birds in the Brazilian Amazon. **Systematic and Applied Acarology**, v. 19, n. 4, p. 385-393, 2014a.

MARTINS, T.F.; GIANIZELLA, S.L.; NUNES, P.H.; FARIA, D.C.L.O.; NASCIMENTO, C.A. R.; ABRAHAO, C.R.; MIRANDA, F.R.; TEIXEIRA, R.H.F.; RAMIREZ, D.G.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. New records of *Amblyomma goeldii* (Acari: Ixodidae) and description of the nymphal stage. **Zootaxa** 3949 (3): 439–444, 2015.

MCINTOSH D BEZERRA, RA LUZ, HR FACCINI, JLH GAIOTTO, FA GINÉ, GAF ALBUQUERQUE, GR. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. **Brazil. J. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p. 879-883, 2015.

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** ,1998; 84: 478-484.

MOERBECK L VIZZONI, VF MACHADO-FERREIRA, E CAVALCANTE, RC OLIVEIRA, SV SOARES, CAG AMORIM, M GAZÊTA, GS. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 6, p. 1458-1466, 2016.

NAVA, S., BEATI, L., LABRUNA, M.B., CÁCERES, A.G., MANGOLD, A.J., GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* 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*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, 5(3): 252-276, 2014.

NEEDHAM, G.R.; TEEL, P.D. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. **Annu. Rev. Entomol.** 36: 659–681, 1991.

OLIVEIRA P BORGES, L LOPES, C LEITE, R. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) on pastures

of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 295-301, 2000.

OGRZEWALSKA M PACHECO, RC UEZU, A RICHTZENHAIN, LJ FERREIRA, F LABRUNA, MB. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in an Atlantic rain forest region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p. 1225-1229, 2009.

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

OGRZEWALSKA, M., MACHADO, C., ROZENTAL, T., FORNEAS D., CUNHA, L.E., DELEMOS, E.R.S. Microorganisms in the ticks *Amblyomma dissimile* Koch 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch 1844 collected from snakes in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 33, 154–161., 2019.

OGRZEWALSKA, M; LITERAK, I; CARDENAS-CALLIRGOS, JM; CAPEK, M; LABRUNA, MB. *Rickettsia bellii* in ticks *Amblyomma varium* Koch, 1844, from birds in Peru. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, 3(4), p. 254 - 256, 2012.

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

PACHECO A CORDEIRO, MD CEPEDA, MB LUZ, HR CARDOZO, SV BERTO, BP GUTERRES, A FONSECA, A.H. Hemoparasites in ticks of wild birds of Serra dos Órgãos National Park, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. AHEAD, 2019.

PACHECO RC HORTA, MC MORAES-FILHO, J ATALIBA, AC PINTER, A LABRUNA, MB. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, v. 27, n. 3, p. 364-371, 2007.

PINTO, S.R.R., MENDES, G., SANTOS, A.M.M., DANTAS, M., TABARELLI, M., MELO, F.P.L. Landscape attributes drive complex spatial microclimate configuration of Brazilian Atlantic forest fragments. **Trop Conserv Sci**, 3:389–402, 2010.

SANTOLIN, I.D.A.C. **Estudo de carrapatos associados com aves no entorno do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil; detecção de Rickettsia spp., e o desenvolvimento de métodos moleculares para análise de interações carrapato**

microrganismo. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014.

SOUSA KCM FERNANDES, MP HERRERA, HM FRESCHI, CR MACHADO, RZ ANDRÉ, MR. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 245-253, 2018/02/01/ 2018.

SABATINI G PINTER, A NIERI-BASTOS, FA MARCILI, A LABRUNA, MB. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their *Rickettsia* in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of Sao Paulo, Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010.

SCOFIELD, A., BAHIA, M., MARTINS, A.L., GÓES-CAVALCANTE, G., MARTINS, T.F., LABRUNA, M.B. *Amblyomma dissimile* Koch (Acari: Ixodidae) attacking *Primolius maracana* Vieillot (Psittaciformes: Psittacidae) in the Amazon region, state of Pará, Brazil. **Neotropical entomology**, v. 40, p. 509-511, 2011.

SERRA-FREIRE, N.M. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 141-147, 2010.

SILVA, J.M.C.; RYLANDS, A.B.; FONSECA, G.A.B. The fate of the Amazonian areas of endemism. **Conservation Biology**, v.19, n.3, p.689-694, 2005.

SANTOS DIAS, J.A.T. Ixodideos (Acarina: Ixodoidea) em Coleção no Museu Zoológico de Amsterdã. **García de Orta, série Zool.**, v.13, p.75-83, 1986.

SOARES, H.S., BARBIERI, A.R., MARTINS, T.F., MINERVINO, A.H., LIMA, J.T., MARCILI, A., GENNARI, S.M., LABRUNA, M.B. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Exp App Acarol**, v. 65, n. 1, p. 125-140, 2015.

SPOLIDORIO MG MINERVINO, AHH VALADAS, SYOB SOARES, HS NEVES, KAL LABRUNA, MB RIBEIRO, MFB GENNARI, SM. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 214-219, 2013.

SHANNON, C. E. A Mathematical Theory of Communication. **Bell System Technical Journal**, 3 (27), 1948.

THOMPSON, G.B. Ticks in Jamaica, B.W.I. Records and notes (including a summary of the distribution of the West Indian species). **Annals and Magazine of Natural History**, 12, 3 (27), 220–229, 1950.

WIDMER, C.E., ALMEIDA, A.P., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B. Tickborne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, 11: 1001–1005; 2011.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM CARRAPATOS E PULGAS DE ANIMAIS SELVAGENS NO ESTADO DO RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

Os carrapatos e as pulgas apresentam grande importância na saúde animal e para a saúde pública, pois muitas espécies participam do ciclo de transmissão de hemoparasitos causadores de doenças em animais e seres humanos. O presente estudo avaliou a detecção de grupos de hemoparasitos da ordem Piroplasmida e bactérias dos gêneros *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia* em carrapatos e pulgas que parasitam animais selvagens no estado do Rio de Janeiro, Brasil. O trabalho foi realizado com carrapatos e pulgas coletados no ambiente e em 26 animais selvagens, sendo sete espécies de mamíferos (*Hydrochoerus hydrochaeris*, *Tapirus terrestris*, *Tayassu tajacu*, *Didelphis aurita*, *Cuniculus paca*, *Cerdocyon thous*, *Coendou prehensilis*) e uma espécie de ave (*Dromaius novaehollandiae*). Os artrópodes foram morfologicamente identificados usando chaves taxonômicas específicas. O DNA extraído de cada ectoparasito foi testado para a pesquisa de *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. e microrganismos da ordem Piroplasmida por meio da Reação em Cadeia da Polimerase. No total foram testados 450 ectoparasitos (396 carrapatos e 54 pulgas), sendo identificadas nove espécies de carrapatos, todas do gênero *Amblyomma*, e apenas uma espécie de pulga. *Rickettsia bellii* foi detectada em *A. dubitatum* e *A. pacae*; *Rickettsia* sp. cepa AL em *A. longirostre*; “*Candidatus Rickettsia senegalensis*” e *Rickettsia felis* em *Ctenocephalides felis felis*. Na pesquisa de DNA de hemoparasitos da Família Anaplasmataceae, *Wolbachia* sp. foi detectado em *C. f. felis*. Quanto à pesquisa de DNA de *Borrelia* spp., uma espécie ainda não descrita até o presente momento foi detectada em *A. calcaratum* e denominada neste trabalho como *Borrelia* sp. cepa Acalc110. Todas as amostras testadas foram negativas para *Ehrlichia* spp. e para microrganismos da Ordem Piroplasmida. Esse estudo traz o primeiro registro de “*Candidatus R. senegalensis*” no Brasil, uma riquetsia intimamente relacionada com *R. felis*. Além disso, contribui também para o aumento no número de espécies de *Amblyomma* infectadas por *Borrelia* sp.

Palavras-Chave: Agentes patogênicos, Endossimbiontes, Ixodídeo, Sifonápteros, Animais silvestres, Brasil

ABSTRACT

Ticks and fleas are of great importance, as many species participate in the transmission cycle of disease-causing hemoparasites in animals and humans. The present study evaluated the detection of groups of hemoparasites of the order Piroplasmida and bacteria of the genera *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma* and *Ehrlichia* in ticks and fleas that parasitize wild animals in the state of Rio de Janeiro, Brazil. The work was carried out with ticks and fleas collected in the environment and in 26 wild animals, seven species of mammals, (*Hydrochoerus hydrochaeris*, *Tapirus terrestris*, *Tayassu tajacu*, *Didelphis aurita*, *Cuniculus paca*, *Cerdocyon thous*, *Coendou prehensilis*) (*Dromaius novaehollandiae*). Arthropods were morphologically identified using specific taxonomic keys. The DNA extracted from each ectoparasite was tested for the presence of *Rickettsia* spp., *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. and microorganisms of the order Piroplasmida by means of the Polymerase Chain Reaction (PCR). In total, 450 ectoparasites (396 ticks and 54 fleas) were tested, with ticks identified in nine species, all of the genus *Amblyomma*. All fleas were only in the species *C. f. felis*. *Rickettsia bellii* was detected in *A. dubitatum* and *A. paca*; *Rickettsia* sp. cepa AL in *A. longirostre*; "*Candidatus R. senegalensis*" and *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis*; hemoparasites of the Order Piroplasmida in *A. sculptum* and *A. longirostre*. For the presence of hemoparasites of the Family Anaplasmataceae, *Wolbachia* sp. was detected in *C. f. felis*. For the presence of *Borrelia* spp., *Borrelia* sp. was detected in *A. calcaratum*. All samples tested were negative for the Dsb gene present in *Ehrlichia* species and for the Order Piroplasmida. This study brings the first record of "*Candidatus R. senegalensis*" in Brazil, a *Rickettsia* closely related to *R. felis*. In addition, it also contributes to the increase in the number of *Amblyomma* species infected with *Borrelia* sp.

Keywords: Pathogens, Endosymbionts, Ixodid, Siphonaptera, Wild animals, Brazil

1 INTRODUÇÃO

Na natureza, os microrganismos transmitidos por vetores são mantidos em vários artrópodes cuja prevalência pode estar se expandindo devido ao aquecimento global e à atividade humanas, que incluem práticas agrícolas, desportivas, invasão florestal e expansão urbana o que ajuda a exposição humana a agentes circulantes nesses ambientes modificados (OGUNTOMOLE et al., 2018). Conhecer as espécies de hemoparasitos e de seus artrópodes vetores que estão se aproximando ao convívio humano é muito importante, principalmente numa visão da perspectiva da saúde única, uma vez que envolve saúde animal, humana e ambiental.

Dentre esses artrópodes vetores, as pulgas e carrapatos são de grande importância, pois muitas espécies participam do ciclo de transmissão de hemoparasitos causadores de doenças em animais e em seres humanos (BITAM et al., 2010).

Os carrapatos são classificados na subclasse Acari e se alimentam em diferentes animias, mamíferos, aves, répteis e anfíbios, em todo o mundo (BARROS-BATTESTI et al., 2006). No Brasil, atualmente, a fauna de carrapatos é constituída por 73 espécies, a maioria pertencente ao gênero *Amblyomma* (DANTAS-TORRES et al., 2019) e que parasitam uma grande diversidade de animais selvagens. Nos últimos anos, surgiram muitos estudos sobre registros do parasitismo de carrapatos em animais selvagens de diferentes regiões do Brasil (HORTA et al., 2011; SARAIVA et al., 2012; SPOLIDORIO et al., 2013; MARTINS et al., 2014; SOARES et al., 2015; WITTER et al., 2016; ZIMMERMANN et al., 2018). Porém, a respeito dos agentes biológicos que eles albergam ainda são pouco conhecidos por espécies de carrapatos que parasitam animais selvagens (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

No Brasil existem cerca de 60 espécies e/ou subespécies de pulgas registradas na literatura e, dessas, 29 espécies infestam principalmente marsupiais (LINARDI et al., 2000). O conhecimento a respeito da função vetorial de muitas espécies pulgas ainda é escasso, porém sabe-se que algumas podem funcionar como vetores de uma grande diversidade de bactérias, tais como *Yersinia pestis*, *Francisella tularensis*, *Bartonella* spp., *Wolbachia* spp., *Rickettsia* spp. (BITAM et al., 2010).

Neste contexto, o presente estudo avaliou a detecção de DNA de hemoparasitos da da ordem Piroplasmida e bactérias dos gêneros *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma* e *Ehrlichia* em carrapatos e pulgas que parasitam animais selvagens no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Delineamento do estudo

2.1.1 Obtenção das amostras e áreas de estudo

Os ectoparasitos usados no presente estudo fazem parte de um banco de amostras do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) e são oriundos de animais selvagens (silvestres e exóticos) livres, mantidos em cativeiro ou atropelados em rodovias e, também, do ambiente (recintos ou ar livre) onde habitam animais selvagens. O quadro 1 mostra as sete localidades no estado do Rio de Janeiro cujos ectoparasitos foram coletados entre os anos de 2013 e 2019.

Município	Local	Coordenada geográfica	Ectoparasitos		Data de aquisição (Mês/ano)
			Carrapato	Pulga	
Mangaratiba	Jardim Zoológico	22°54'58.135"S 44°4'23.046"W	147		08/2016 e 09/2018
Paracambi	Rodovia	22°38'36"S 43°42'46"W	20		01/2017
Teresópolis	Rodovia	22°27'55"S 42°59'38"W	1		02/2017
Itatiaia	Rodovia	22°29'19"S 44°35'18"W	7		03/2017
Seropédica	Campus-UFRRJ	22°45'38"S 43°40'40"W	24	54	2013/2014
Seropédica	Campus-UFRRJ	22°45'25"S 43°41'50"W	172		10/2018
Resende	Rodovia	22°19'47"S 44°31'53"W	10		02/2019
Resende	Rodovia	22°25'53"S 44°28'28"W	15		10/2019

Quadro 1. Locais de origem, no estado do Rio de Janeiro, e datas de coleta dos ectoparasitos usados no presente estudo.

As amostras de ectoparasitos (pulgas e carrapatos) usados no presente estudo vieram de coletas feitas em 26 animais selvagens, distribuídas em sete espécies de mamíferos (*Hydrochoerus hydrochaeris* (n=4), *Tapirus terrestris* (n=3), *Tayassu tajacu*(n=1), *Didelphis aurita* (n=11), *Cuniculus paca* (n=1), *Cerdocyon thous* (n=2), *Coendou prehensilis* (n=3) e uma espécie de ave (*Dromaius novaehollandiae*, n=1), bem como de coletas realizadas no

ambiente (n=202) em que normalmente é frequentado por animais silvestres como capivaras e outros.

As amostras do município de Mangaratiba (n= 147) são oriundas do ambiente e de animais selvagens cativos em um Jardim Zoológico (local turístico de visitação humana), onde existem cerca de 500 animais da fauna sul-americana, europeia e africana coexistindo no mesmo local (ARAÚJO et al., 2019). Esses animais eram adaptados ao convívio humano, portanto não houve a necessidade de contenção química. Desta forma, os carrapatos foram coletados durante uma abordagem de rotina juntamente com o médico veterinário responsável pelo local. No ambiente onde esses animais vivem foi feita a captura de carrapatos em vida livre através da técnica de arraste com flanela branca sobre a vegetação (OLIVEIRA et al., 2000).

Os carrapatos oriundos dos municípios de Paracambi (n=20), Teresópolis (n=1), Itatiaia (n=7) e Resende (n=25) foram obtidos de animais silvestres encontrados atropelados e mortos em rodovias.

Os carrapatos e pulgas do município de Seropédica foram oriundos do ambiente (n=?) e de gambás (*D. aurita*, n=?) coletados também em áreas de visitação humana, no *campus* da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Foram elaboradas capturas de gambás no período de fevereiro de 2013 a outubro de 2014. A captura foi feita utilizando armadilhas modelo Tomahawk (90x45x50cm e 50x21,5x20 cm) e contidos quimicamente recebendo uma pré-anestesia de Atropina 1% (Sulfato de Atropina[®], UCB, 1mg/Kg SC) e Xilazina 2% (Anasedan[®], Cespo, 2mg/Kg IM), e anestesia com uma associação de Tiletamina + Zolazepan (Zoletil[®] 50, Virbac, 7mg/mL, IM). Os carrapatos em vida livre foram capturados através da técnica de arraste com flanela branca sobre a vegetação (OLIVEIRA et al., 2000) ao redor do Lago-Açú, uma área bem habitada por capivaras e aves silvestres, e também considerada como um local de lazer muito frequentado pelos alunos da Universidade e pela comunidade do próprio município. A captura, manutenção e coleta de amostras foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRRJ sob o protocolo nº 255/2012 e autorizada pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) sob protocolo nº 34701 -2.

Todos os ectoparasitos foram preservados em tubos contendo álcool isopropílico para a conservação do DNA até o momento das análises moleculares. A identificação taxonômica dos carrapatos foi feita com base na morfologia usando chaves dicotômicas específicas para os carrapatos ixodídeos, sendo Martins et al. (2010) para ninfas,

Barros-Battesti et al. (2006) e Nava et al. (2014) para adultos. A identificação taxonômica das pulgas foi realizada com base na morfologia usando a chave dicotômica de Linardi et al. (2000).

2.2 Análises Moleculares

2.2.1 Extração de DNA

A extração de DNA dos carrapatos em estágio larval e das pulgas foi realizada empregando-se a técnica de fervura, como realizado por Horta et al. (2005). Resumidamente, cada espécime foi macerado na presença de tampão (TE, Tris EDTA), o material resultante foi centrifugado a 13200rpm e aquecido a 100°C, por 30 minutos. Já a extração de DNA das ninfas e adultos de carrapatos foi realizada individualmente pelo método Fenol/Fenol-Clorofórmio, de acordo com o protocolo estabelecido por Santolin et al. (2013).

2.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Ensaio de PCR foram realizadas para a pesquisa de microrganismos bacterianos e protozoários transmitidos por carrapatos. O quadro 2 apresenta os *primers* específicos que foram utilizados, juntamente com os genes alvos, tamanho do produto amplificado, seguindo o protocolo original de cada *primer*.

2.2.3 Eletroforese e análise dos resultados

Um volume de 10 µL dos produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100bases DNA Ladder, product #SM024, Thermo Scientific).

Especificidade/ Gene/Primer	Sequência dos primers (5'-3')	FA	Referência
<i>Rickettsia</i> spp.			
gltA CS239 F CS1069 R	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	834 pb	(LABRUNA et al., 2004)
htrA (17-kDa) 17k3 17k5	TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	549 pb	(LABRUNA et al., 2004)
Família Anaplasmataceae 23S rDNA Ana23S-212f Ana23S-723r	ATAAGCTGCGGGGAATTGTC TGCAAAAAGGTACGCTGTCC	515bp	(DAHMANI et al., 2015)
<i>Anaplasma</i> spp.			
16S rRNA EE-1	TCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	1433 pb	(BARLOUGH et al., 1996)
EE-2	AGTCACTGACCCAACCTTAAATGGCTG		
EE-3	GTCGAACGGATTATCTTTATAGCTTGC	926 pb	
EE-4	CCCTTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC		
<i>Ehrlichia</i> spp.			
Dsb DSB-330 DSB-380 DSB-720	GATGATGCTTGAAGATATSAAACAAAT ATTTTTAGRGATTTTCCAATACTTGG CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC	349 pb	(ALMEIDA et al., 2013)
<i>Borrelia</i> spp.			
FlaB FlaLL FlaRL FlaLS FlaRS	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT AACAGCTGAAGAGCTTGGAAAT CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC	665 pb 354 pb	(STROMDAHL et al., 2003)
FlaB BorFlaF1 BorFlaR1 BorFlaF2 BorFlaR2	TACATCAGCTATTAATGCTTCAAGAA GCAATCATWGCCATTGCRGATTG CTGATGATGCTGCTGGWATGG TCATCTGTCAATRTWGCATCTT	740 pb	(BLANCO et al., 2017)
16S 16S-Fin1 adapt 16S-LDPR2	CCAACACCTCACAGCACGAGCTGA AGCAGCTAAGAATCTTCCGCAATGG	733 pb	(DERDÁKOVÁ et al., 2003) Este estudo
Hpt <i>Hptf</i> <i>HptR</i>	GCAGAYATTACAAGAGARATGG CYTCRTCACCCATTGAGTTCC	433 pb	(MCCOY et al., 2014)
glpQ <i>glpQ+1</i> <i>Glpq-1</i>	GGGGTTCTGTTACTGCTAGTGCCATTAC CAATTTAGATATGTCTTTACCTTGTGTTTATGCC	817 pb	(SCHWAN et al., 2005)
Ordem Piroplasmida			
18S rRNA Bcommon-F Bcommon-R	GCATTTGCGATGGACCATTCAAG CCTGTATTGTTATTTCTTGTCACCTC	200 pb	(QUROLLO et al., 2017)
18S rRNA BT-F3 BT-R3	TGGGGGGAGTATGGTCGCAAG CTCCTTCCTTTAAGTGATAAG	650 pb	(SEO et al., 2013)

Quadro 2. Lista de primers usados para PCR no presente estudo. FA= fragmento amplificado

2.2.4 Sequenciamento

O material para sequenciamento foi purificado a partir de 5µL do produto de PCR das amostras positivas, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções em um analisador genético automatizado (ABI 3730 DNA Analyser, Thermo Fisher Scientific®) na Plataforma de Sequenciamento de DNA – RPT01A PDTIS/FIOCRUZ. As sequências obtidas foram montadas através do programa DNA Baser® e submetidas a pesquisa de homologia com outras sequências depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTn.

2.2.5 Análise Filogenética

Para todas as análises filogenéticas realizadas, as sequências obtidas no sequenciamento e as obtidas em bancos de dados foram alinhadas pela ferramenta *MUSCLE* (EDGAR, 2004) no programa *Seaview4* (GOUY et al., 2010). As relações filogenéticas foram estimadas usando inferência filogenética por Máxima Verossimilhança (MV) implementado na ferramenta *PhyML* (GUINDON; GASCUEL, 2003) sob um modelo de evolução de sequência que foi escolhido depois de testes de modelos alternativos hierarquicamente pela computação usando o critério de informação Bayesiano, determinado no MEGA versão 7 (KUMAR et al., 2016). O suporte estatístico dos clados foi medido por uma busca heurísticas com 1.000 repetições de “*bootstrap*”. As relações filogenéticas foram visualizadas no software *FigTree* v.1.4 (RAMBAUT, 2012).

3 RESULTADOS

Um total de 450 ectoparasitos (396 carrapatos e 54 pulgas) foram avaliados para a presença de hemoparasitos, sendo nove espécies de carrapatos e uma espécie de pulga. A tabela 1 apresenta a relação das espécies dos ectoparasitos de acordo com as espécies dos hospedeiros em cada localidade de origem.

Entre as amostras examinadas por PCR usando as sequências *gltA* e *htrA* como alvos para *Rickettsia* spp., um total de 3.1% (14/450) produziram *amplicons* dos tamanhos esperados. Os dados das análises moleculares forneceram identificações tais como *Rickettsia bellii* em *Amblyomma dubitatum* (um macho) e *Amblyomma paca* (uma fêmea), *Rickettsia* sp. cepa AL em *Amblyomma longirostre* (três machos), *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em *Amblyomma ovale* (uma fêmea), *Rickettsia felis* e “*Candidatus R. senegalensis*” em *Ctenocephalides felis felis* (oito fêmeas) (Tabela 2). A tabela 3 demonstra as sequências homólogas aos fragmentos dos genes de *Rickettsia* spp. detectados nas amostras positivas de carrapatos e pulgas.

Do total de amostras testadas usando como alvo as sequências do gene 23S presente em organismos da Família Anaplasmataceae, 2.0% (9/450) produziram *amplicons* dos tamanhos esperados. Essas amostras positivas eram espécimes de pulgas *C. f. felis* (Tabela 2). O sequenciamento gerado mostrou 99.28% de similaridade com *Wolbachia* sp. endosymbiont (FR827940).

Das amostras testadas para a presença de *Borrelia* spp., tendo como alvo os genes *flaB* e 16S, apenas uma (0,2%) produziu *amplicons* do tamanho esperado, referente a um carrapato da espécie *Amblyomma calcaratum* (Tabela 2). O sequenciamento do *amplicon* gerado para os genes *flaB* e 16S rRNA apresentou 89,46% e 98,72% de identidade com *Borrelia venezuelensis* cepa RMA01 e *Borrelia hermsii*, respectivamente (nº de acesso no GenBank MG651650 e KX171924).

Todas as amostras testadas foram negativas para o gene 16S rRNA presente em *Anaplasma* spp., para o gene *dsb* presente em *Ehrlichia*, para o gene 18S rRNA presente em organismos da Ordem Piroplasmida e para os genes *hpt* e *glpQ* presentes de *Borrelia* spp.

As análises filogenéticas para os hemoparasitos encontrados neste estudo estão ilustradas nas figuras 1, 2, 3 e 4.

Os números de acesso à sequência de nucleotídeos GenBank para as sequências parciais geradas no presente estudo são: MT012708 (*Rickettsia felis* isolado 17P), MT012709 (*Rickettsia felis* isolado 20P), MT012710 (*Rickettsia felis* isolado 21P), MT012711(*Rickettsia felis* isolado 23P), MT012712 (*Rickettsia felis* isolado 24P), MT012713 (*Rickettsia felis* isolado 22P), MT012714 (*Rickettsia felis* isolado 18P), MT012715 (*Rickettsia bellii* isolado Apacae7a), MT012716 (*Rickettsia bellii* isolado Adub61), MT012717(*Rickettsia* sp. isolado 19P), MT012718 (*Rickettsia* sp. isolado AO4A), MT012719 (*Rickettsia* sp. isolado AL13A), MT012720 (*Rickettsia* sp. isolado AL12A), MT012721 (*Rickettsia felis* isolado 17P, *htrA*), MT012722 (*Rickettsia felis* isolado 20P, *htrA*), MT012723 (*Rickettsia felis* isolado 21P, *htrA*), MT012724 (*Rickettsia felis* isolado 23P, *htrA*), MT012725 (*Rickettsia felis* isolado 22P, *htrA*), MT012726 (*Rickettsia felis* isolado 18P), MT012727 (*Rickettsia felis* isolado 26P, *htrA*), MT012728 (*Rickettsia* sp. 19P, *htrA*), MT018009 (*R. parkeri* cepa Mata Atlântica iscolado 4a, *htrA*), MT018006 (*Rickettsia* sp. *A. longirostre* 14A, *htrA*), MT018007 (*Rickettsia* sp. *A. longirostre* 19A, *htrA*), MT018005 (*Borrelia* sp. strain Acalc, *flaB*), MT023337 (*Borrelia* sp. strain Acalc110, 16S), MT026192 (*Wolbachia* sp. endosymbiont).

Tabela 1. Espécies dos ectoparasitos de acordo com as espécies dos hospedeiros e a localidade de origem das amostras.

Hospedeiros	NA	Localidade	Ectoparasitos										Total
			Carrapato									Pulga	
			<i>A. bra</i>	<i>A. cal</i>	<i>A. dub</i>	<i>A. inc</i>	<i>A. lon</i>	<i>A. ova</i>	<i>A. scu</i>	<i>A. pac</i>	<i>A. par</i>	<i>C. f. fel</i>	
Mamíferos													
<i>Tapirus terrestris</i>	2	Mangaratiba								2F,5M, 1N			8
<i>Tayassu tajacu</i>	1	Mangaratiba								1M, 1N			2
	1	Resende				2F, 1N							3
<i>Cuniculus paca</i>	1	Resende									3F, 2M		5
<i>Tayassu pecari</i>	1	Resende							4F,1M				5
<i>Hydrochoerus</i>	3	Mangaratiba			30M,10F	1N			1F	40M,6F,6N			94
<i>hydrochaeris</i>	1	Paracambi								4F,11N			15
<i>Cerdocyon thous</i>	1	Paracambi								1N			1
<i>Didelphis aurita</i>	1	Paracambi		1M,1N								2M	4
	1	Seropédica								24N			24
	9	Seropédica										42F, 12M	54
<i>Coendou</i>	1	Itatiaia	7N										7
<i>prehensilis</i>	1	Teresópolis						1N					1
	1	Resende						1F,10M,1N					12
Aves													
<i>Dromaius</i>	1	Mangaratiba								3M,10N			13
<i>novaehollandiae</i>													
Carrapatos em	-	Seropédica		5N						2M,1F,164N			172
vida livre	-	Mangaratiba			3N					27N			30
Total	26		7	7	43	4	13	6	309	5	2	54	450

NA= número de animais/ *A. bra*= *A. brasiliense*; *A. cal*= *A. calcaratum*; *A. dub*= *A. dubitatum*; *A. inc*= *A. incisum*; *A. lon*= *A. longirostre*; *A. ova*= *A. ovale*; *A. scu*= *A. sculptum*; *A. pac*= *A. pacae*; *A. par*= *A. parkeri*; *C.C.fel*= *C.f. felis* / **M**= macho; **F**= fêmea; **N**= ninfa

Tabela 3. Detecção molecular dos gêneros *Rickettsia*, *Borrelia* e da Família Anaplasmataceae em ectoparasitos de animais silvestres no estado do Rio de Janeiro.

Ectoparasitos			Gênero <i>Rickettsia</i>		Família Anaplasmataceae		Gênero <i>Borrelia</i>		
Espécie	Est.	Nº	Hospedeiro	Nº pos. (%)	<i>gltA</i> e <i>htrA</i>	Nº pos. (%)	23S	Nº pos. (%)	<i>FlaB</i> e 16S
<i>A. dubitatum</i>	A	40	<i>H. hydrochaeris</i>	1 (2.5)	<i>R. bellii</i>	0		0	
<i>A. longirostre</i>	A	11	<i>C. prehensilis</i>	3 (18.2)	<i>Rickettsia</i> sp. cepa AL	0		0	
<i>A. calcaratum</i>	A	1	<i>D. aurita</i>	0		0		1 (100)	<i>Borrelia</i> sp.
<i>A. ovale</i>	A	5	<i>T. pecari</i>	1 (20.0)	<i>Rickettsia</i> cepa Mata Atlântica	0		0	
<i>A. paca</i>	A	5	<i>C. paca</i>	1 (20.0)	<i>R. bellii</i>	0		0	
<i>C. f. felis</i>	A	54	<i>D. aurita</i>	1 (1.9)	“ <i>Candidatus R. senegalensis</i> ”	9 (16.7)	<i>Wolbachia</i> sp.	0	
				7 (13.0)	<i>R. felis</i>	0		0	

Est.= estágio/ **N**= ninfa; **A**= adulto / **Nº**= número de carrapatos/ **Nº pos** = Número positivo de carrapatos/ **NP**= não parasitária

Tabela 3. Sequências homólogas aos fragmentos dos genes de *Rickettsia* spp. detectados em carrapatos e pulgas de animais silvestres no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

Espécie de ectoparasito	<i>gltA</i>				<i>htrA</i>		
	Isolado	Espécie/ cepa homóloga	Nº de acesso	Homologia	Espécie/ cepa homóloga	Nº de acesso	Homologia
<i>A. dubitatum</i>	Adub61	<i>Rickettsia bellii</i>	CP000087	99.54%	-	-	-
<i>A. longirostre</i>	AL12A	<i>Rickettsia</i> sp. cepa AL	EU274654	100%	<i>Rickettsia</i> sp. cepa AL	EU274655	100%
<i>A. longirostre</i>	AL13A	<i>Rickettsia</i> sp. cepa AL	EU274654	100%	<i>Rickettsia</i> sp. cepa AL	EU274655	100%
<i>A. longirostre</i>	AL12A	-	-	-	<i>Rickettsia</i> sp. cepa AL	EU274655	100%
<i>A. ovale</i>	AO4A	<i>R. parkeri</i> cepa Mata Atlântica	JQ906783	100%	<i>R. parkeri</i> cepa Mata Atlântica	CP040325	100%
<i>A. pacae</i>	Apacae7A	<i>Rickettsia bellii</i>	JQ906786	99.86%	-	-	-
<i>C. f. felis</i>	17P	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%
<i>C. f. felis</i>	18P	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%
<i>C. f. felis</i>	19P	“ <i>Candidatus R. senegalensis</i> ”	KU499847	100%	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	97.63%
<i>C. f. felis</i>	21P	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%
<i>C. f. felis</i>	22P	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%
<i>C. f. felis</i>	23P	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%
<i>C. f. felis</i>	24p	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%
<i>C. f. felis</i>	45P	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%	<i>Rickettsia felis</i>	CP000053	100%

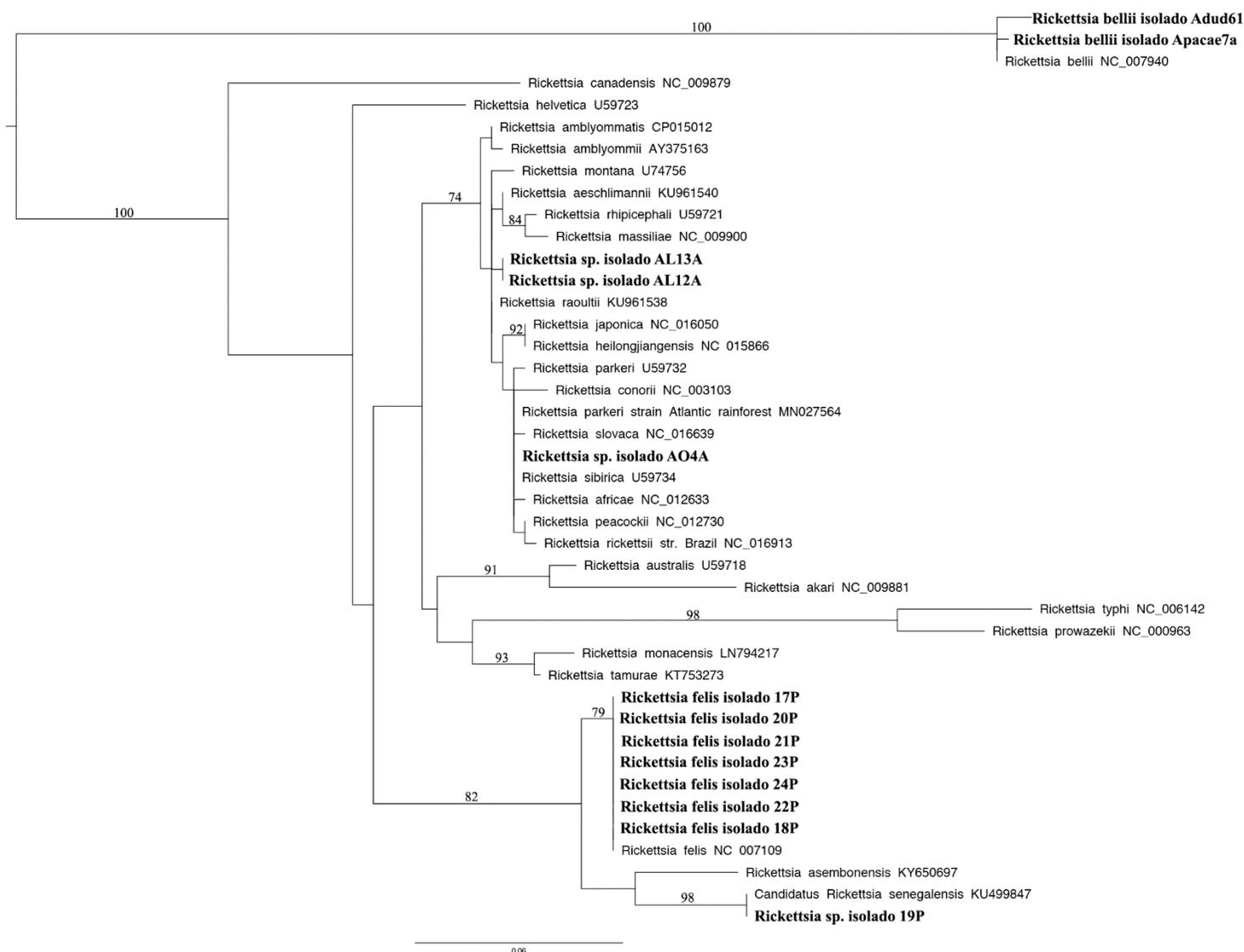


Figura 1. Árvore filogenética das espécies de *Rickettsia* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene *gltA*, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.

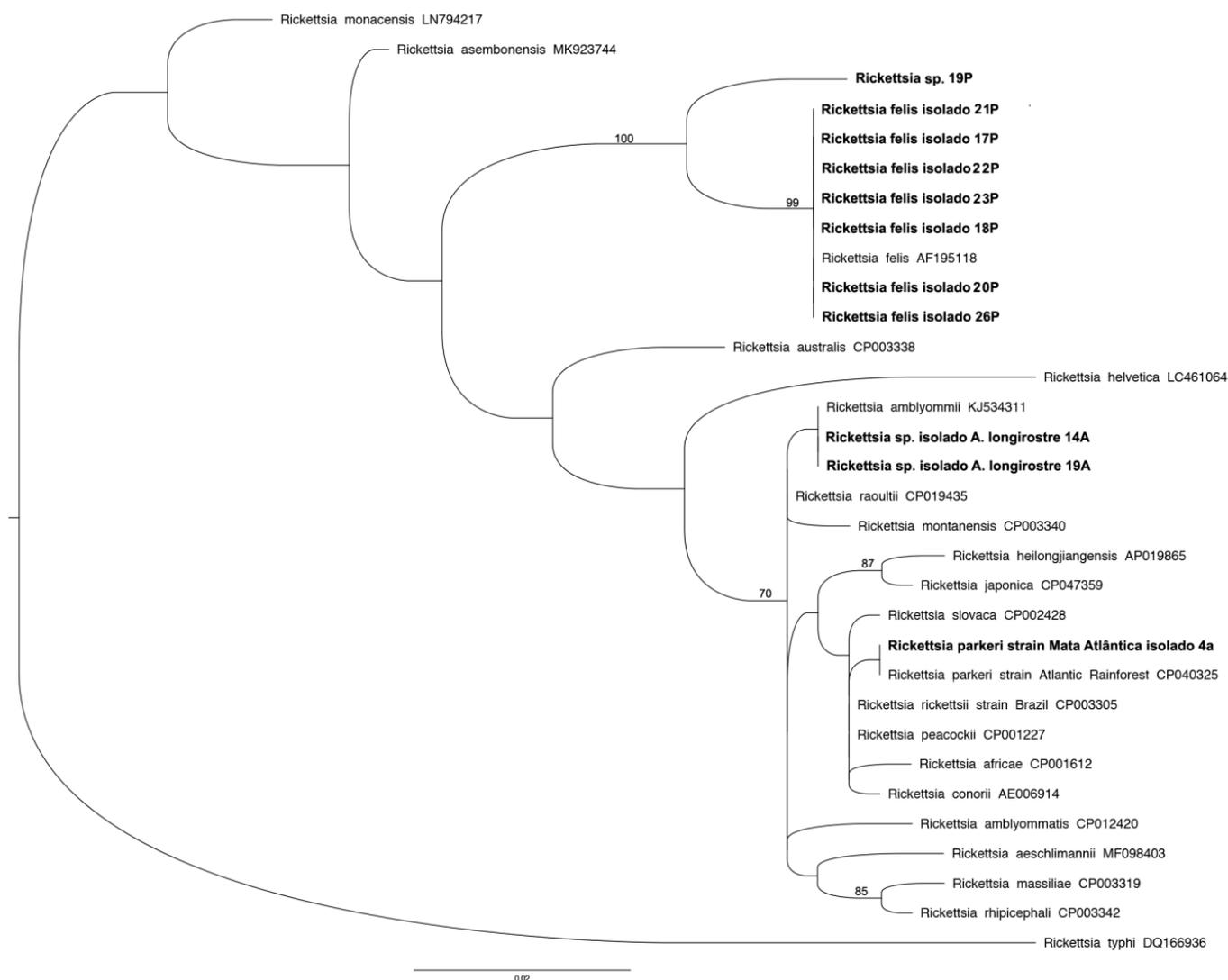


Figura 2. Árvore filogenética das espécies de *Rickettsia* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene *htrA*, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.

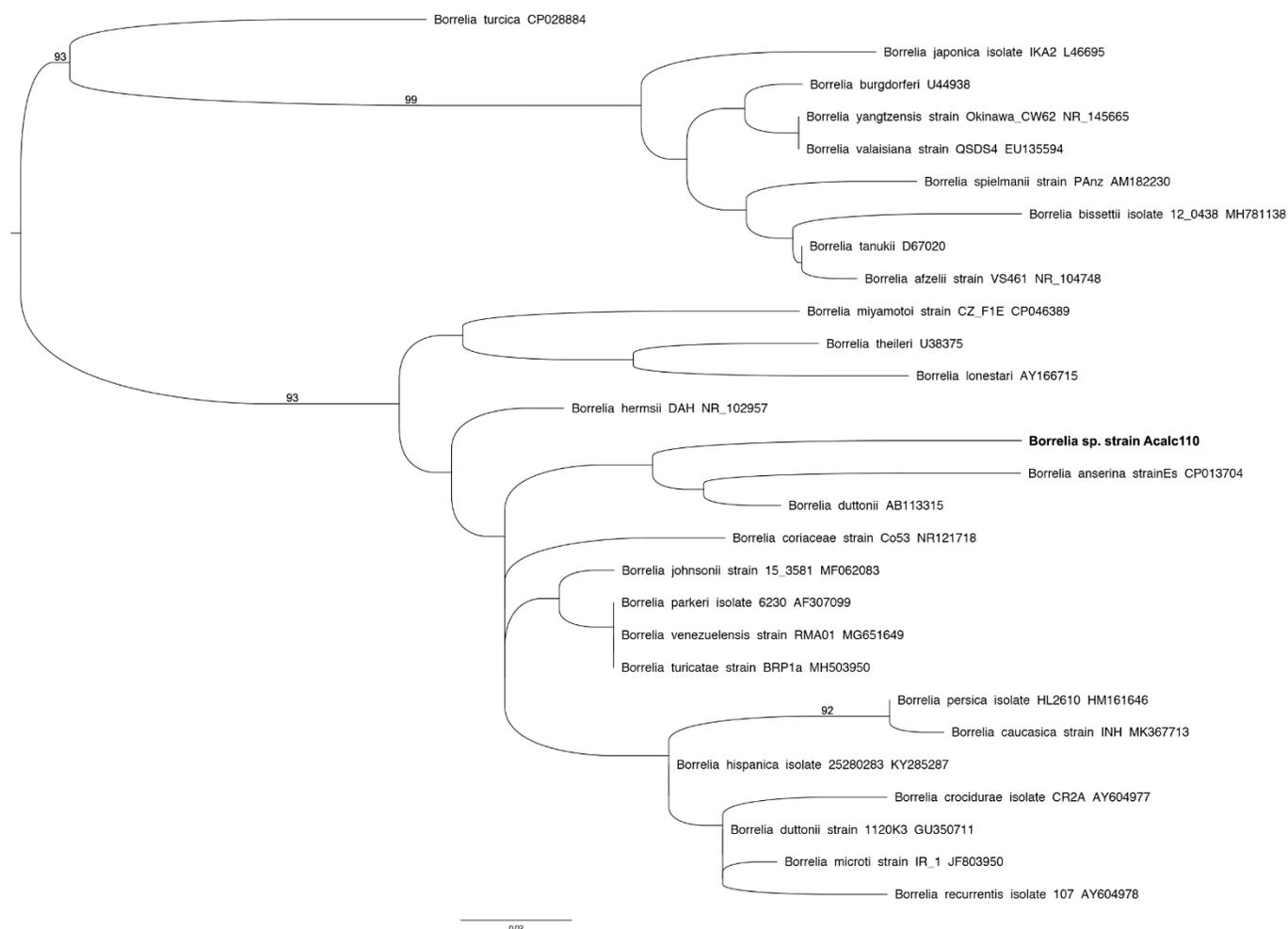


Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Borrelia* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene 16S, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.

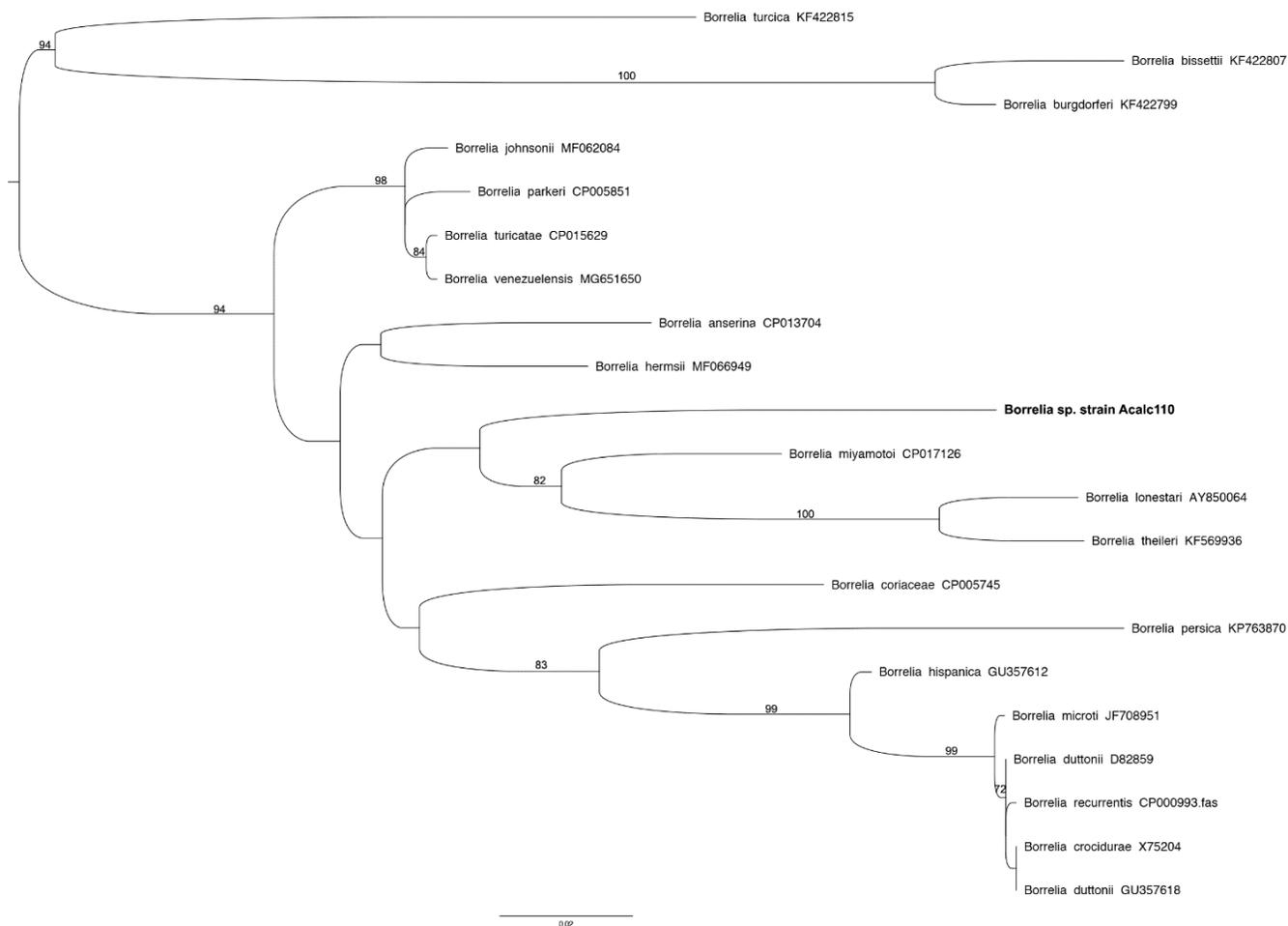


Figura 4. Árvore filogenética das espécies de *Borrelia* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene *flaB*, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.

4 DISCUSSÃO

Esse estudo abordou sobre a detecção de hemoparasitos em carrapatos e pulgas oriundos de animais selvagens e de vida livre no ambiente no estado do Rio de Janeiro, onde muito dos quais estavam presentes em áreas que sempre há visitação humana, a exemplo de Mangaratiba. Dentre as espécies encontradas, *A. sculptum* foi a mais frequente e representa um dos principais artrópodes vetores de importância para saúde pública, pois participa do ciclo de transmissão da bactéria *R. rickettsii*, responsável pela Febre Maculosa Brasileira (SZABÓ et al., 2013a).

Um dos principais resultados obtidos nesse trabalho foi a detec o de *R. parkeri*. cepa Mata Atlântica. O carrapato *A. ovale*,   incriminado como o principal vetor dessa espécie de bactéria (SZABÓ et al., 2013a; SZABÓ et al., 2013b), com casos ocorrendo em locais de Mata atlântica (SPOLIDORIO et al., 2010; SEVÁ et al., 2019). Trata-se de uma cepa recentemente associada   *Rickettsia parkeri* (NIERI-BASTOS et al., 2018) de grande importância para a saúde pública, pois apresenta uma patogenicidade capaz de produzir uma rickettsiose com diversos casos no Brasil (KRAWCZAK et al., 2016; SEVÁ et al., 2019). Resende, que é a cidade de origem da amostra positiva já reportou casos fatais humanos de Febre Maculosa e tem descri o molecular da presença de *R. rickettsii* (CUNHA et al. 2009), porém não há dados relatados de rickettsiose por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Dessa forma, torna-se importante esse achado pois estabelece a ocorrência do agente nesta  rea.

DNA de *R. bellii* foi detectado em um carrapato *A. dubitatum* coletado em uma capivara e em um carrapato *A. pacae* coletado em uma paca. Essa bactéria é considerada a *Rickettsia* mais comum em várias espécies de carrapatos na América Latina (LABRUNA et al., 2011), e no Brasil já foi encontrada em diversas espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* (LABRUNA et al., 2004; PACHECO et al., 2009; BRITES-NETO et al., 2013). A patogenicidade de *R. bellii* ainda é desconhecida para seres humanos (LABRUNA et al., 2011). No entanto, há estudos experimentais onde essa bactéria causou forma o de escara de inocula o em cobaios (OGATA et al., 2006; LA SCOLA et al., 2009), além de estudos com base de dados sorológicos realizados no Brasil mostrando que essa bactéria

pode causar infecções naturais em capivaras, cães e cavalos (PACHECO et al., 2007; SPOLIDORIO et al., 2013; VIEIRA et al., 2018; BUDWEG et al., 2019).

Três amostras de *A. longirostre* foram positivas para *Rickettsia* sp. cepa AL. Esse agente riquetsial é comumente encontrado nessa espécie de carrapato coletada em aves silvestres (OGRZEWALSKA et al., 2008; PACHECO et al., 2019). *Rickettsia* sp. cepa AL é geneticamente relacionada a “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” (OGRZEWALSKA et al., 2008) e recentemente Karpathy et al. (2016) propôs reclassificá-la para *Rickettsia amblyommatis* em conformidade com o Código Internacional de Nomenclatura de Procariontes.

DNA de *R. felis* e “*Ca. R. senegalensis*” foram detectados em pulgas *C. f. felis*. No Brasil, a bactéria *R. felis* é comumente encontrada em pulgas *Ctenocephalides* spp. em várias regiões (HORTA et al., 2014). Inclusive, *C. f. felis* é um ectoparasito comum em cães no Brasil (COSTA et al., 2013). Nesse trabalho, os espécimes de pulgas foram encontrados em gambás *D. aurita* cativo ou vida livre?, um marsupial bem adaptado às ações antropogênicas, sendo encontrado em locais bem próximo ao homem, como em telhados de casas, oco de árvores e outros abrigos (JANSEN, 2020). Devido a esse hábito sinantrópico, eles podem ser fundamentais na transmissão de agentes patogênicos por ectoparasitas para humanos e animais domésticos (ANTUNES, 2005). Ademais, é importante ressaltar a patogenicidade de *R. felis*, o qual é responsável pela Febre Maculosa transmitida por pulgas, doença considerada uma ameaça global emergente à saúde humana e muito comum no continente africano (BROWN et al., 2016). No Brasil, esse agente riquetsial já foi associado a casos de infecção em paciente com febre e erupção cutânea (RAOUL et al., 2001a; RAOULT et al., 2001b), porém esse achado é pouco consistente e a infecção por *R. felis* precisa ser melhor estudada.

“*Candidatus Rickettsia senegalensis*” é um agente que foi descrito recentemente. Esse microrganismo foi primeiramente isolado em pulgas *C. felis* coletadas em gatos no Senegal, na África, no ano de 2015, e seu DNA foi testado e sequenciado nos genes *rrs*, *gltA*, *ompB* e *sca4*, apresentando 99,65%, 97,68%, 95,24% e 97,2% de similaridade com *R. felis*, respectivamente (MEDIANNIKOV et al., 2015). Esse fato levou a considerar essa bactéria como tendo uma relação bastante estreita com *R. felis*, porém tendo diferenças genéticas o suficiente para ser considerada uma nova espécie (ANGELAKIS et al., 2016). *Rickettsia* sp. isolado 19P mostrou 100% de similaridade com as sequências *gltA* de “*Ca. R. senegalensis*” encontrado por Mediannikov et al.

(2015). Por tanto, esse trabalho apresenta o primeiro relato de um organismo com homologia semelhante à *Ca. "R. senegalensis"* no Brasil.

Depois do seu primeiro isolamento e caracterização genética (MEDIANNIKOV et al., 2015), "*Ca. R. senegalensis*" tem sido cada vez mais relatados em outras áreas do mundo, como na Índia (KHAN et al., 2016), Califórnia (MAINA et al., 2016), Estados Unidos (NODEN et al., 2017), Ásia (HORNOK et al., 2018), Chile (CEVIDANES et al., 2018) e, recentemente, na Colômbia (BETANCOURT-RUIZ et al., 2019).

Esses estudos anteriores fizeram análises filogenéticas de *R. felis* e "*Ca. R. senegalensis*" baseados no gene *gltA*, onde foi possível estabelecer que essas duas espécies, juntamente com outras cepas e espécies, formam um clado compacto e isolado, denominado Grupo *Rickettsia felis* (Bactérias que pertenciam ao antigo Grupo de transição), mas sendo um grupo irmão dos clados contendo as espécies de *Rickettsia* spp. do Grupo Febre Maculosa e do Grupo Tifo (MEDIANNIKOV et al., 2015; HORNOK et al., 2018).

Os espécimes de "*Ca. Rickettsia senegalensis*" nesses países foram detectados em pulgas oriundas de animais de companhia, isto é, cães e gatos (MEDIANNIKOV et al., 2015; KHAN et al., 2016; NODEN et al., 2017; HORNOK et al., 2018; CEVIDANES et al., 2018; BETANCOURT-RUIZ et al., 2019). Com exceção de Maina et al. (2016) que detectou essa bactéria em pulgas *C. f. felis* oriundas de gatos domésticos e gambás (*Didelphis virginiana*) em áreas com surto de rickettsiose por pulgas na Califórnia. O presente estudo trouxe a detecção desse microrganismo em gambá em pulgas de *D. aurita*, um animal silvestre com hábitos sinantrópicos muito próximos do convívio humano. É importante ressaltar que a patogenicidade de "*Ca. Rickettsia senegalensis*" ainda é desconhecida (MEDIANNIKOV et al., 2015).

Neste estudo também foi detectado DNA de *Wolbachia* sp. em pulgas Espécie?. Este bioagente é considerado não patogênico e está incluído na família Anaplasmataceae, juntamente com os gêneros *Ehrlichia*, *Neorickettsiae* e *Anaplasma* (DUMLER et al., 2001). Trata-se de uma bactéria comumente encontrada em sinfonápteros, sendo considerada um endossimbionte. No Brasil, um estudo recente avaliou a presença de patógenos e endossimbiontes em pulgas coletadas de *D. aurita* em qual estado, onde foi detectado DNA de *W. pipientis* (BEZERRA-SANTOS et al., 2020). É interessante salientar que as espécies de *Wolbachia* podem ser importantes aliadas no controle biológico de insetos vetores como as pulgas, uma vez que sua presença pode causar mudanças na biologia desses sinfonápteros, influenciando na

reprodução, determinação do sexo e comportamento (WERREN et al., 2008; DOUDOUNIS et al., 2012).

O presente estudo também detectou DNA de *Borrelia* sp. em um carrapato da espécie *A. calcaratum*, coletado em um gambá atropelado em Paracambi. *Amblyomma calcaratum* tem como hospedeiros principais mamíferos da Ordem Xenarthra. A fase adulta desse carrapato demonstra bastante especificidade a tamanduás (*Myrmecophaga* spp. e *Tamandua* spp.) (GUGLIELMONE et al., 2003), enquanto que as fases imaturas são frequentemente encontradas em aves passeriformes (OGRZEWSKA et al., 2010). Até o momento não há registros sobre a infestação por esta espécie de carrapato em humanos. Recentemente, Pacheco et al. (2019) fez a primeira descrição de *Borrelia* sp. em carrapato do gênero *Amblyomma* na América do Sul, em um espécime de *A. longirostre* oriundo de aves no Rio de Janeiro, um carrapato que ainda não foi encontrado parasitando o homem, mas tem como hospedeiro principal porcos-espinhos e também já foi relatado em diversos outros mamíferos (cervídeos, canídeos, suínos domésticos) (GUGLIELMONE et al., 2014) e aves silvestres na fase imatura (LUZ et al., 2012).

Apesar de não alinhar filogeneticamente aos clados de *Borrelia* do grupo Doença de Lyme, *Borrelia* sp. cepa Acalc110 não compõe o grupo filogenético que vem em expansão, associado a hospedeiros répteis e vetorizados por carrapatos dos gêneros *Amblyomma* ou *Hyalomma* (TAKANO et al., 2010) o qual estão localizadas as primeiras espiroquetas recém-detectadas em carrapatos do gênero *Amblyomma* na América latina (PACHECO et al., 2009; CICUTTIN et al., 2019). A análise filogenética (Figura 3) demonstrou que *Borrelia* sp. cepa Acalc110 pertence ao Grupo *Borrelia recurrentis* e está próxima geneticamente de *Borrelia hermsii*. Por ser uma espécie recentemente descoberta, pouco se sabe sobre a biologia, ecologia e potencial patogênico desta espiroqueta.

Os iniciadores direcionados aos genes *hpt* e *glpQ* de *Borrelia* spp. não amplificaram os produtos de *Borrelia* sp. cepa Acalc110, provavelmente por ser uma PCR convencional e a amostra não possuir DNA em concentração suficiente para a amplificação.

Nenhuma das amostras de carrapatos amplificaram para *Ehrlichia* spp. ou piroplasmídeos. Ogrzewalska et al. (2019) não detectaram piroplasmídeos em *Amblyomma*, mas ressaltam a importância de mais pesquisas sobre a infecção e não descartam a possível circulação desses patógenos entre as espécies de carrapatos no

Brasil. De fato, os artrópodes vetores envolvidos no ciclo de transmissão de espécies de *Ehrlichia* e *Anaplasma* entre mamíferos silvestres no Brasil ainda são desconhecidos (SOUSA et al., 2017). Contudo, Estudos realizados no Pantanal brasileiro já detectaram evidências de DNA de *Anaplasma* spp. e *Ehrlichia* spp. em carrapatos das espécies *A. sculptum* coletado de um cão (MELO et al., 2016); em *A. sculptum*, *A. triste* e ninfa de *Amblyomma* spp. coletados em onça-pintada (*Panthera onca*) (WIDMER et al., 2011); além de *A. sculptum*, *A. parvum* e larvas de *Amblyomma* spp. coletados em cachorro-domato (*Cerdocyon Thousand*) (SOUSA et al., 2017). Ademais, há de se considerar que essa detecção de DNA de *Ehrlichia* ou *Anaplasma* em carrapatos encontrados parasitando animais pode estar relacionada aos restos da refeição sanguínea do artrópode no hospedeiro infectado (DE SOUSA. et al., 2017). Portanto, até o momento não há evidências de infecção e transmissão de *Ehrlichia* spp. e *Anaplasma* spp. através de carrapatos do gênero *Amblyomma* no Brasil (GRUHN et al., 2019).

Da mesma forma, nenhuma das amostras de pulgas amplificaram para *Ehrlichia* spp. ou piroplasmídeos. Por serem patógenos associados principalmente com carrapatos, até agora ainda são escassas pesquisas que visem a procura desses microrganismos em pulgas. Embora isso, DNA de *Ehrlichia canis* foi encontrado em pulgas das espécies *Cediopsylla inaequalis* e *Xenopsylla cheopis* coletadas em raposas vermelhas (*Vulpes vulpes*) na Itália, além de outras espécies de patógenos da família Anaplasmataceae (*A. ovis*, *A. marginale* e *A. phagocytophilum*) (TORINA et al., 2013). No Brasil, um estudo detectou *E. canis* em pulgas da espécie *Polygenis (P.) bohlsi bohlsi* coletada em um roedor (*Thrichomys fosteri*), cujo sangue foi negativo em ensaios de PCR para *Ehrlichia*. O autores acreditam que a positividade foi devido ao DNA residual do sangue do hospedeiro no trato digestivo dos sifonápteros (SOUSA et al., 2017).

5 CONCLUSÕES

No presente estudo, *R. bellii* foi detectada em *A. dubitatum* e *A. pacae*; *Rickettsia* sp. cepa AL foi detectado em *A. longirostre*, e *Wolbachia* sp. foi detectado em *C. f. Feliz*.

Todas as amostras testadas foram negativas para *Ehrlichia* spp. e para microrganismos da Ordem Piroplasmida.

Esse estudo apresenta o primeiro registro de “*Candidatus R. senegalensis*” no Brasil, uma *Rickettsia* intimamente relacionada com *R. felis* e detectada em *C. felis felis*.

Além disso, o presente estudo contribui para o aumento no número de espécies de *Amblyomma* infectado com *Borrelia* sp.

6 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.P., SOUZA, T.D., MARCILI, A., LABRUNA, M.B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology** v. 50, n. 3, p. 640-646, 2013.

ANGELAKIS, E., MEDIANNIKOV, O., PAROLA, P., RAOULT, D. *Rickettsia felis*: the complex journey of an emergent human pathogen. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 554-564, 2016.

ANTUNES, G.M. **Diversidade e potencial zoonótico de parasitos de *Didelphis albiventris* Lund, 1841 (Marsupialia: Didelphidae)**. 2005. 122 (Tese Doutorado). Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

APPERSON, C.S., ENGBER, B., NICHOLSON, W.L., MEAD, D.G., ENGEL, J., YABSLEY, M.J., DAIL, K., JOHNSON, J., WATSON, D.W. Tick-borne diseases in North Carolina: is "*Rickettsia amblyommii*" a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 8, n. 5, p. 597, 2008.

ARAÚJO, I.M., MAGALHÃES-MATOS, P.C., CORDEIRO, M.D., PACHECO, A. ROCHA, B.S., FEITOZA, L.F.B.B., SANAVRIA, A., FONSECA, A.H. Ticks in wild animals at a resort and the first documentation of *Amblyomma sculptum* infesting Emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 177-179, 2019.

BARLOUGH, J.E., MADIGAN, J.E., DEROCK, E., BIGORNIA, L. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). **Veterinary Parasitology**, v. 63, n. 3, p. 319-329, 1996/06/01/ 1996.

BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1ª ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.

BETANCOURT-RUIZ, P., MARTÍNEZ-DÍAZ, H.C., GIL-MORA, J., OSPINA, C. OLAYA, BENAVIDES, L.A, BOLAÑOS E., CUERVO E., BLANTON C., HIDALGO,

M. Candidatus *Rickettsia senegalensis* in Cat Fleas (Siphonaptera: Pulicidae) Collected from Dogs and Cats in Cauca, Colombia. **Journal of Medical Entomology**, 2019.

BEZERRA-SANTOS, M.A., NOGUEIRA, B.C.F., YAMATOIGI, R.S., RAMOS, R.A.N., GALHARDO, J.A., CAMPOS, A.K. Ticks, fleas and endosymbionts in the ectoparasite fauna of the black-eared opossum *Dipelphis aurita* in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, p. 1-10, 2020.

BITAM, I., DITTMAR, K., PAROLA, P., WHITING, M.F., RAOULT, D. Fleas and flea-borne diseases. **Interantional Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. e667-76, Aug 2010.

BLANCO, C.M., TEIXEIRA, B.R., DA SILVA, A.G., OLIVEIRA, R.C., STRECHT, L. OGRZEWALSKA, M., LEMOS, E.R.S. Microorganisms in ticks (Acari: Ixodidae) collected on marsupials and rodents from Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 90-98, 2017.

BRANDÃO, V.M.D., BARROZO, P.H.M., SOUSA, L.O., SANTOS, R.C., SCHWANKE, K., SAMPAIO, F.D., PRADO, W.S., AMARAL, A.S, CAVALCANTE, G.G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. **Cienc. Rural**, v. 49, 2019.

BRITES-NETO, J., NIERI-BASTOS, F., BRASIL, J., DUARTE, K., MARTINS, T. VERISSIMO, C., BARBIERI, A., LABRUNA, M. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 367 - 372, 2013.

BROWN, L.D., MACALUSO, K.R. *Rickettsia felis*, an Emerging Flea-Borne Rickettsiosis. **Curr Trop Med Rep**, v. 3, p. 27-39, 2016.

BUDWEG, C.I., SOUSA, A.O., CARVALHO, T.R.V., SOUZA, ZÊS DE AZEVEDO SERPA, MC MARTINS, TF NIERI-BASTOS, F MARCILI, A LABRUNA, MB MORAES-FILHO, J. Serological survey of *Rickettsia* in equids from Vale do Paraíba, São Paulo, Brazil, and their tick identification and molecular investigation of *Rickettsia*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 4, p. e158159-e158159, 2019.

CABEZAS-CRUZ, A., ZWEYGARTH, E., VANCOVA, M., BRONISZEWSKA, M., GRUBHOFFER, L., PASSOS, L.M., RIBEIRO, M.F., ALBERDI, P., DE LA FUENTE, J. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., a new species within the genus *Ehrlichia* isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Jan 12 2016.

CEVIDANES, A., DI CATALDO, S., VERA, F., LILLO, P., MILLÁN, J. Molecular detection of vector-borne pathogens in rural dogs and associated *Ctenocephalides felis* fleas (Siphonaptera: Pulicidae) in Easter Island (Chile). **Journal of Medical Entomology**, v. 55, n. 6, p. 1659-1663, 2018.

COSTA, A.P., SILVA, A.B., COSTA, F.B., XAVIER, G.S., MARTINS, T.F., LABRUNA, M.B., GUERRA, R.M.S.N.C. A Survey of Ectoparasites Infesting Urban and Rural Dogs of Maranhão State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 674-678, 2013.

DAHMANI, M., LOUDAHI, A., MEDIANNIKOV, O., FENOLLAR, F., RAOULT, D. DAVOUST, B. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 198-203, 2015/03/01/ 2015.

DANTAS-TORRES, F., MARTINS, T.F., MUÑOZ-LEAL, S., ONOFRIO, V.C., BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2019.

VIEIRA, F.T., ACOSTA, I.C.L., MARTINS, T.F., FILHO, J.M., KRAWCZAK, F.D.S., BARBIERI, A.R.M., EGERT, L., FERNANDES, D.R., BRAGA, F.R., LABRUNA, M.B. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 249, p. 43-48, 2018.

DERDÁKOVÁ, M., BEATI, L., PET'KO, B., STANKO, M., FISH, D. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in *Ixodes ricinus* ticks from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 509-516, 2003.

SOUSA KCM FERNANDES, MP HERRERA, HM FRESCHI, CR MACHADO, RZ ANDRÉ, MR. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and

ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 245-253, 2018/02/01/ 2018.

DOUDOUMIS, V. ,TSIAMIS, G., WAMWIRI, F., BRELSFOARD, C., ALAM, U., AKSOY, E., DALAPERAS, S., ABD-ALLA, A., OUMA, J., TAKAC, P. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus *Glossina*). **BMC Microbiology**, v. 12, n. 1, p. S3, 2012.

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P., DASCH, G.A., PALMER, G.H., RAY, S.C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. Pt 6, p. 2145-65, Nov 2001.

EDGAR, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics** 5: 113, 2004.

GOUY, M., GUINDON, S., GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Mol. Biol. Evol.** 27: 221–224, 2010.

GUINDON S, GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Syst. Biol.** 52: 696–704, 2003.

GUGLIELMONE, A., ESTRADA-PEÑA, A., MANGOLD, AJ BARROS-BATTESTI, DM LABRUNA, MB MARTINS, JR VENZAL, JM ARZUA, M KEIRANS, JE. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273-288, 2003.

GUGLIELMONE, A.A., ROBBINS, R.G., APANASKEVICH, D.A., PETNEY, T.N., ESTRADA-PEÑA, A., HORAK, I.G. **The hard ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae)**. 1^a ed. London: Springer, 2014.

GRUHN, K.D., OGRZEWALSKA, M., ROZENTAL, T., FARIKOSKI, I.O., BLANCO, C., SOUZA F.L., FRANÇA, R.V.M. Evaluation of rickettsial infection in free-range capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linneaus, 1766) (Rodentia: Caviidae) and ticks (Acari: Ixodidae) in Western Amazon, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, 2019. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.04.007.

HORNOK, S., BANETH, G., GRIMA, A., TAKÁCS, N., KONTSCHÁN, J., MELI, M.L. SUTER, V., SALANT, H., FARKAS, R., HOFMANN-LEHMANN, R. Molecular investigations of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) provide the first evidence of *Rickettsia felis* in Malta and Candidatus *Rickettsia senegalensis* in Israel. **New Microbes and New Infections**, v. 25, p. 3-6, 2018.

HORTA, M.C., PINTER, A., CORTEZ, A., SOARES, R.M., GENNARI, S.M., SCHUMAKER, T.T.S., LABRUNA, M.B. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 321-325, 2005.

HORTA MC DO NASCIMENTO, GF MARTINS, TF LABRUNA, MB MACHADO, LC NICOLA, PA. Ticks (Acari: Ixodida) parasitizing free-living wild animals in the Caatinga biome in the State of Pernambuco, northeastern Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 16, n. 3, p. 207-211, 2011.

HORTA MC OGRZEWALSKA, M AZEVEDO, MC COSTA, FB FERREIRA, F LABRUNA, MB. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* from five geographic regions of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 1, p. 96-100, 2014.

JANSEN AM. Marsupiais Didelfídeos: gambás e cuícas. In: A, A.;SC, P. e RS, O. (Ed.). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro, RJ: FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2020. p.167–173.

KARPATY SE SLATER, KS GOLDSMITH, CS NICHOLSON, WL PADDOCK, CD. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in North and South America. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 66, p. 5236-5243, 2016.

KHAN SA BORA, T CHATTOPADHYAY, S JIANG, J RICHARDS, AL DUTTA, P. Seroepidemiology of rickettsial infections in Northeast India. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 110, n. 8, p. 487-494, 2016.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol. Biol. Evol.** 33: 1870–1874, 2016.

KRAWCZAK FS MUÑOZ-LEAL, S GUZTZAZKY, AC OLIVEIRA, SV SANTOS, FCP ANGERAMI, RN MORAES-FILHO, J SOUZA, JC, Jr. LABRUNA, MB. *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest Infection in a Patient from a Spotted Fever-Endemic Area in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551-553, 2016.

LA SCOLA B BECHAH, Y LEPIDI, H RAOULT, D. Prediction of rickettsial skin eschars in humans using an experimental guinea pig model. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, n. 3, p. 128-133, 2009.

LABRUNA MB MATTAR V, S NAVA, S BERMUDEZ, S VENZAL, JM DOLZ, G ABARCA, K ROMERO, L DE SOUSA, R OTEO, J ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsiosis en America Latina, el Caribe, Espana y Portugal. **Revista MVZ (Medicina Veterinaria y Zootecnia)**, v. 16, n. 2, p. 2435, 2011.

LABRUNA MB MCBRIDE, JW BOUYER, DH CAMARGO, LMA CAMARGO, EP WALKER, DH. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology** v. 41, n. 3, p. 533-537, 2004.

LINARDI PM GUIMARÃES, LR. **Siphonaptera of Brazil**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2000. ISBN 8587735012.

LUZ HR FACCINI, JLH LANDULFO, GA BERTO, BP FERREIRA, I. Bird ticks in an area of the Cerrado of Minas Gerais State, southeast Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 1, p. 89-99, 2012.

MARTINS TF FECCHIO, A LABRUNA, MB. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) on wild birds in the Brazilian Amazon. **Systematic and Applied Acarology**, v. 19, n. 4, p. 385-393, 2014.

MARTINS TF ONOFRIO, VC BARROS-BATTESTI, DM LABRUNA, MB. 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.

MAINA AN, FOGARTY C, KRUEGER L, MACALUSO KR, ODHIAMBO A, NGUYEN K, ET AL. Rickettsial Infections among *Ctenocephalides felis* and Host Animals during a Flea-Borne Rickettsioses Outbreak in Orange County, California. **PLoS ONE** 11(8): 2016.

MELO AL, WITTER R., MARTINS, F.T., PACHECO, T.A., ALVES, A.S., CHITARRA, C.S., DUTRA, V., NAKAZATO, L., PACHECO, R.C., LABRUNA, M.B., AGUIAR, D.M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 30: 112–116, 2016.

MEDIANNIKOV O AUBADIE-LADRIX, M RAOULT, D. Candidatus '*Rickettsia senegalensis*' in cat fleas in Senegal. **New Microbes and New Infections**, v. 3, p. 24-28, 2015/01/01/ 2015.

MCCOY BN MAÏGA, O SCHWAN, TG. Detection of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus geigy* from Mali. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 401-403, 2014.

NAVA S BEATI, L LABRUNA, MB CÁCERES, AG MANGOLD, AJ GUGLIELMONE, AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* 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*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick-Borne diseases**, v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

NIERI-BASTOS FA MARCILI, A DE SOUSA, R PADDOCK, CD LABRUNA, MB. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 8, p. e02872-17, 2018.

NODEN BH DAVIDSON, S SMITH, JL WILLIAMS, F. First detection of *Rickettsia typhi* and *Rickettsia felis* in fleas collected from client-owned companion animals in the southern Great Plains. **Journal of Medical Entomology**, v. 54, n. 4, p. 1093-1097, 2017.

OGATA H LA SCOLA, B AUDIC, S RENESTO, P BLANC, G ROBERT, C FOURNIER, P-E CLAVERIE, J-M RAOULT, D. Genome sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. **PLoS genetics**, v. 2, n. 5, 2006.

OGRZEWALSKA M PACHECO, RC UEZU, A FERREIRA, F LABRUNA, MB. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in an Atlantic forest area in the state of Sao Paulo, Brazil, with isolation of rickettsia from the tick *Amblyomma longirostre*. **Journal of Medical Entomology** v. 45, n. 4, p. 770-4, Jul 2008.

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

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

OGRZEWALSKA, M., MACHADO, C., ROZENTAL, T., FORNEAS D., CUNHA, L.E., DELEMOS, E.R.S. Microorganisms in the ticks *Amblyomma dissimile* Koch 1844 and *Amblyomma rotundatum* Koch 1844 collected from snakes in Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 33, 154–161., 2019.

OGUNTOMOLE O NWAEZE, U EREMEEVA, ME. Tick-, flea-, and louse-borne diseases of public health and veterinary significance in Nigeria. **Tropical medicine and infectious disease**, v. 3, n. 1, p. 3, 2018.

OLIVEIRA P BORGES, L LOPES, C LEITE, R. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 92, n. 4, p. 295-301, 2000.

PACHECO R HORTA, M PINTER, A MORAES-FILHO, J MARTINS, T NARDI, M SOUZA, S SOUZA, C SZABO, M RICHTZENHAIN, L LABRUNA, M. Pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de Sao Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, p. 351 - 353, 2009.

PACHECO RC HORTA, MC MORAES-FILHO, J ATALIBA, AC PINTER, A LABRUNA, MB. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica**, v. 27, n. 3, p. 364-371, 2007.

PACHECO A CORDEIRO, MD CEPEDA, MB LUZ, HR CARDOZO, SV BERTO, BP GUTERRES, A FONSECA, AHd. Hemoparasites in ticks of wild birds of Serra dos Órgãos National Park, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. AHEAD, 2019.

QUROLLO BA ARCHER, NR SCHREEG, ME MARR, HS BIRKENHEUER, AJ HANEY, KN THOMAS, BS BREITSCHWERDT, EB. Improved molecular detection of *Babesia* infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 128, 2017/03/07 2017.

RAOULT D FOUCAULT, C BROUQUI, P. Infections in the homeless. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 77-84, Sep 2001a.

RAOULT D LA SCOLA, B ENEA, M FOURNIER, P-E ROUX, V FENOLLAR, F GALVAO, M DE LAMBALLERIE, X. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 73, 2001b.

RAMBAUT, A. FigTree v1. 4.0. A graphical viewer of phylogenetic trees. **Inst. Evol. Biol. Univ. Edinburgh**, 2012.

SANTOLIN IDAC FAMADAS, KM MCINTOSH, D. Detecção e identificação de espécies de *Rickettsia* em carrapatos coletados de aves silvestres no Brasil pela PCR-RFLP. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 35, n. Supl. 2, p. 68-73, 2013.

SARAIVA D FOURNIER, GSR MARTINS, T LEAL, KG VIEIRA, F CÂMARA, EVC COSTA, C ONOFRIO, V BARROS-BATTESTI, D GUGLIELMONE, A LABRUNA, M. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 2, p. 159-166, 2012/10/01 2012.

SEO M-G YUN, S-H CHOI, S-K CHO, G-J PARK, Y-S CHO, K-H KWON, O-D KWAK, D. Molecular and phylogenetic analysis of equine piroplasms in the Republic of Korea. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 579-583, 2013.

SEVÁ, A.P., MARTINS, T.F., MUÑOZ-LEAL, S., RODRIGUES, A.C., PINTER, A., LUZ, H.R., ANGERAMI, R.N., LABRUNA, M.B. A human case of spotted fever caused by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest and its association to the tick *Amblyomma ovale*. **Parasites Vectors**, 12:471, 2019.

SCHWAN TG RAFFEL, SJ SCHRUMPF, ME POLICASTRO, PF RAWLINGS, JA LANE, RS BREITSCHWERDT, EB PORCELLA, SF. Phylogenetic analysis of the spirochetes *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* and the potential for tick-borne relapsing fever in Florida. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3851-3859, 2005.

SOARES HS BARBIERI, AR MARTINS, TF MINERVINO, AH DE LIMA, JT MARCILI, A GENNARI, SM LABRUNA, MB. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental and Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125-140, 2015.

SPOLIDORIO, M.G., MINERVINO, A.H.H., VALADAS, SOARES, Y., NEVES, H.S., KAL LABRUNA, MB RIBEIRO, MFB GENNARI, SM. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 214-219, 2013.

SPOLIDORIO MG, LABRUNA MB, MANTOVANI E, BRANDÃO PE, RICHTZENHAIN LJ, YOSHINARI NH. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerg Infect Dis**, 16(3): 521-523, 2010.

STROMDAHL, E. WILLIAMSON, P.C., KOLLARS, T.M., EVANS, S.R., BARRY, R., VINCE, M.A., DOBBS, N. Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari : Ixodidae) removed from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5557-5562, 2003.

SZABÓ, M.P.J., PINTER, A., LABRUNA, M.B. Ecology, biology and distribution of spotted- fever tick vectors in Brazil. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, 2013a.

SZABÓ, M., NIERI-BASTOS, F. SPOLIDORIO, M. MARTINS, T., BARBIERI, A. LABRUNA, M. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 06, p. 719-728, 2013b.

TAKANO, A., GOKA, K., UNE, Y., SHIMADA, Y., FUJITA, H., SHIINO, T., WATABANE, H., KAWABATA, H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. **Environmental Microbiology Reports**, v. 12, n. 1, p. 134-146, 2010.

TORINA A BLANDA, V ANTOCI, F SCIMECA, S D'AGOSTINO, R SCARIANO, E PIAZZA, A GALLUZZO, P GIUDICE, E CARACAPPA, S. A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 125-130, 2013.

WERREN, J.H., BALDO, L., CLARK, M.E. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 741-751, 2008.

WITTER, R., MARTINS, T.F., AMPOS, A.K., MELO, A.L., CORRÊA, S.H., MORGADO, T.O., WOLF, R.W., MAY-JÚNIOR, J.A., SINKOC, A.L., STRÜSSMANN, C. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 415-423, 2016.

WIDMER, C.E., ALMEIDA, A.P., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B. Tickborne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, 11: 1001–1005; 2011.

ZIMMERMANN, N.P., AGUIRRE, A.A.R., RODRIGUES, V.S., GARCIA, M.V., MEDEIROS, J.F., BLECHA, I.M.Z., DUARTE, P.O., CRUZ, B.C., CUNHA, R.C., MARTINS, T.F. Wildlife species, Ixodid fauna and new host records for ticks in an Amazon forest area, Rondônia, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 2, p. 177-182, 2018.

CAPÍTULO III

**DETECÇÃO MOLECULAR DE HEMOPARASITOS EM
CARRAPATOS COLETADOS DE QUATIS (*Nasua nasua*) DO
PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU, ESTADO DO PARANÁ**

RESUMO

O contato humano com animais silvestres de hábitos sinantrópicos muitas vezes é mediado por artrópodes vetores como os carrapatos. Esta é a segunda mais importante rota de disseminação de agentes infecciosos, trazendo riscos à saúde humana. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo realizar a detecção molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. e protozoários da ordem Piroplasmida em carrapatos coletados em quatis (*Nasua nasua*) do Parque Nacional do Iguaçu, estado do Paraná, sul do Brasil. Este trabalho foi realizado com um total de 553 carrapatos, compreendendo larvas de *Amblyomma* spp., ninfas de *Haemaphysalis juxtakochi*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma coelebs* e adultos de *A. ovale*. A extração de DNA dos carrapatos foi realizada individualmente através do método de fenol-clorofórmio e o DNA extraído de cada amostra foi submetido a uma bateria de ensaios de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Amostras positivas foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente. Como resultados, DNA de *Anaplasma* spp. foi detectado em carrapatos da espécie *A. coelebs*; DNA de *Borrelia* sp. foi detectado em *A. coelebs*, *A. ovale* e *Amblyomma* sp.; e *Theileria* sp. em *A. coelebs*. Todas as amostras testadas foram negativas para *Ehrlichia* spp. A partir das análises filogenéticas desses hemoparasitos, pode-se observar que se tratam de espécies ainda não descritas.

Palavras-chave: Procyonidae, carrapatos, *Anaplasma*, *Borrelia*, ordem Piroplasmida, Mata Atlântica

ABSTRACT

Human contact with wild animals with synanthropic habits is often mediated by arthropod vectors such as ticks. This is the second most important way of spreading infectious agents, posing a risk to human health. Thus, this study aimed to molecular detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. and protozoa of the order Piroplasmida in ticks collected in coatis of the Iguaçu National Park, Paraná, Brazil. This study was conducted with a total of 553 ticks, larvae comprising *Amblyomma* spp., *Haemaphysalis juxtakochi* nymphs, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma coelebs* and adults of *A. ovale*. The DNA extraction of ticks was performed individually through the phenol-chloroform method and the DNA extracted from each sample was subjected to a battery of Polymerase Chain Reaction (PCR) assays. As a result, DNA from *Anaplasma* spp. was detected in tick of the specie *A. coelebs*; *Borrelia* sp. DNA was detected in *A. coelebs*, *A. ovale* and *Amblyomma* sp.; *Theileria* sp. in *A. coelebs*. All samples tested were negative for *Ehrlichia* spp. From the phylogenetic analyzes of these hemoparasites, it can be seen that it deals with species not yet described.

Keywords: Procyonidae, ticks, *Anaplasma*, *Borrelia*, order Piroplasmida, Atlantic Forest

1 INTRODUÇÃO

A fragmentação e perda de habitats representam uma das principais ameaças à biodiversidade em um determinado território, o que restringe a fauna silvestre a áreas florestais bem menores e, algumas vezes, ao crescente contato e convívio com humanos. Estudos mostram que quanto mais adaptada for uma espécie às áreas antropizadas (urbanas, suburbanas e rurais), maior será sua densidade nestes locais quando comparado a áreas menos perturbadas (DITCHKOFF et al., 2006).

Os quatis (*Nasua nasua*) são animais silvestres com grande resistência as pressões antrópicas, adaptando-se facilmente a áreas modificadas, principalmente devido à grande disponibilidade de alimentos nesses locais (FERREIRA et al., 2013). Esses animais são comumente encontrados no Parque Nacional do Iguazu (PNI), o maior remanescente florestal de Mata Atlântica da região sul do Brasil (ICMBIO, 2016). É um parque aberto ao turismo, e durante o ano inteiro recebe visitantes de toda parte do território nacional e internacional (ICMBIO, 2016). Dessa forma, o fluxo de pessoas é muito grande no PNI, o que facilita a aproximação humana a animais sinantrópicos como os quatis (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017) e conseqüentemente, ao seus ectoparasitas, como os carrapatos.

Os carrapatos constituem um grupo de ectoparasitas hematófagos de grande importância para a saúde pública devido à capacidade de transmitir inúmeros agentes patogênicos, como vírus, bactérias e protozoários (GUIMARÃES et al., 2001; DANTAS-TORRES et al., 2012). Eles parasitam uma grande diversidade de hospedeiros, podendo inclusive infestar acidentalmente o homem (BARROS-BATTESTI et al., 2006; PALOMAR et al., 2012), principalmente quando este tem contato com áreas de ocorrência de carrapatos e seus hospedeiros naturais.

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo realizar a detecção molecular de *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. e protozoários da ordem Piroplasmida em carrapatos coletados em quatis do Parque Nacional do Iguazu, estado do Paraná, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos e legais da pesquisa científica

Esta pesquisa foi realizada após aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (nº 058/2014 CEUA-IV/UFRRJ). A captura dos animais, a coleta a campo e o transporte de amostras biológicas foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob o nº 43614-3.

2.2 Área de estudo

A pesquisa foi desenvolvida a partir de amostras de DNA referentes aos ectoparasitos coletados em quatis no Parque Nacional do Iguaçu (PNI), localizado no município de Foz do Iguaçu, estado do Paraná, Brasil. As coletas foram realizadas nos meses de setembro de 2014, março e abril de 2015, totalizando um esforço amostral de 42 dias de coleta realizadas nos períodos matutino e vespertino (das 9:00 as 16:00 horas) (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017).

O PNI é uma unidade de conservação federal administrada pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio), abrangendo uma área de 185 mil hectares com grande riqueza de fauna e flora (BERTRAND et al., 2018). Anualmente esse parque recebe cerca de 1,5 milhão de turistas de diversas regiões do mundo, sendo um dos parques brasileiros que mais atraem visitantes (ICMBIO, 2016).

Para captura dos animais foram escolhidos três pontos de coletas dentro do PNI que constituem áreas de visitação turística: ponto I (25°41'03"S, 54°26'24"W) compreendendo os mirantes das cataratas com uma extensão de 1,2 Km; ponto II (25°39'05"S, 54°26'16"W) e ponto III (25°37'36"S, 54°27'39"W) que são o acesso à duas trilhas com acesso ao interior da floresta (Figura 1).



Figura 1. Área de Estudo. 1.1) Mapa do estado do Paraná, com destaque ao município de Foz do Iguaçu (vermelho); 1.2) Limites do Parque Nacional do Iguaçu (área contínua verde no território brasileiro) com destaque à área turística do parque, onde foram realizadas as coletas (ponto vermelho); 1.3) Pontos de amostragem dos quatis nas áreas turísticas do parque. Fonte: (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017).

2.3 Carrapatos

As amostras de carrapatos que constituem o presente estudo são oriundas de 86 quatis capturados nos pontos de coletas no PNI (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017). Quando avistados, os bandos de quatis eram atraídos com iscas de banana, abacaxi ou pasta de amendoim e capturados com a ajuda de um puçá (nylon multifilamento, 60 x 120 cm) e contidos com o auxílio dos pés e manualmente com luvas de couro (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017). Também, usou-se armadilhas modelo Tomahawk (90x45x50cm e 50x21,5x20 cm) em cada ponto de coleta durante todo o dia.

A contenção dos animais ocorreu quimicamente por meio de uma pré-anestesia composta por Atropina 1% (Sulfato de Atropina®, UCB, 1mg/Kg SC) e Xilazina 2% (Anasedan®, Cespo, 2mg/Kg IM) (exceto fêmeas gestantes) e uma anestesia com uma associação de Tiletamina + Zolazepan (Zoletil® 50, Virbac, 7mg/mL, IM) (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017).

O corpo desses animais foi vistoriado para a pesquisa de carrapatos. Todos os animais analisados foram marcados com brincos enumerados para evitar a recaptura. Após as coletas, os animais foram monitorados até a recuperação total da anestesia,

quando eram reintroduzidos no mesmo habitat de origem (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017). Os carrapatos foram armazenados em RNAlater[®] e, após identificados, foram congelados a -20°C até a realização das análises moleculares.

2.4 Análises moleculares

2.4.1 Extração de DNA e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A extração de DNA foi realizada individualmente de cada carrapato pelo método Fenol/ Fenol-clorofórmio, de acordo com o protocolo estabelecido por (SAMBROOK et al., 1989).

Ensaio de PCR foram realizados para a pesquisa de hemoparasitos transmitidos por carrapatos. A tabela 1 mostra os *primers* específicos que foram utilizados, juntamente com os genes alvos, tamanho do produto amplificado, seguindo o protocolo original de cada *primer*.

Para cada reação, DNA de *Borrelia anserina* cepa AL (cultura), *Babesia bigemina* (bovino positivo), *Anaplasma platys* (cão positivo) ou *Ehrlichia canis* (cão positivo) e dois controles negativos (água ultrapura) foram incluídos.

Tabela 1. Lista de *primers* usados para PCR no presente estudo.

Especificidade/ Gene/Primer	Sequência dos <i>primers</i> (5'-3')	FA	Referência
Família			
Anaplasmataceae			
23S rRNA			
Ana23S-212f	ATAAGCTGCGGGGAATTGTC	515bp	(DAHMANI et al., 2015)
Ana23S-723r	TGCAAAAGGTACGCTGTCAC		
<i>Anaplasma</i> spp.			
16S rRNA			
EE-1	TCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGC	1433 pb	(BARLOUGH et al., 1996)
EE-2	AGTCACTGACCCAACCTTAAATGGCTG		
EE-3	GTCGAACGGATTATTCTTTATAGCTTGC	926 pb	
EE-4	CCCTCCGTTAAGAAGGATCTAATCTCC		
<i>Ehrlichia</i> spp.			
Dsb			
DSB-330	GATGATGCTTGAAGATATSAAACAAAT	349 bp	(ALMEIDA et al., 2013)
DSB-380	ATTTTTAGRGATTTTCCAATACTTGG		
DSB-720	CTATTTTACTTCTTAAAGTTGATAWATC		
<i>Borrelia</i> spp.			
FlaB			
FlaLL	ACATATTCAGATGCAGACAGAGGT	665 pb	(STROMDAHL et al., 2003)
FlaRL	GCAATCATAGCCATTGCAGATTGT		
FlaLS	AACAGCTGAAGAGCTTGGAAAT	354 pb	
FlaRS	CTTTGATCACTTATCATTCTAATAGC		
<i>BorFlaF1</i>	TACATCAGCTATTAATGCTTCAAGAA	740 pb	(BLANCO et al., 2017)
<i>BorFlaR1</i>	GCAATCATWGCCATTGCRGATTG		
<i>BorFlaF2</i>	CTGATGATGCTGCTGGWATGG		
<i>BorFlaR2</i>	TCATCTGTCATTRTWGCATCTT		
<i>16S rRNA</i>			
<i>16S-Fin1 adapt</i>	CCAACACCTCACAGCACGAGCTGA	733 pb	(DERDÁKOVÁ et al., 2003) Este estudo
<i>16SLDPR2</i>	AGCAGCTAAGAATCTCCGCAATGG		
Hpt			
<i>Hptf</i>	GCAGAYATTACAAGAGARATGG	433 pb	(MCCOY et al., 2014)
<i>HptR</i>	CYTCRTCACCCCATTTGAGTTCC		
<i>glpQ</i>		817 pb	(SCHWAN et al., 2005)
<i>glpQ+1</i>	GGGGTTCTGTTACTGCTAGTGCCATTAC		
<i>Glpq-1</i>	CAATTTTAGATATGTCTTTACCTTGTTGTTTA TGCC		
Ordem			
Piroplasmida			
18S rRNA			
Bcommon-F	GCAATTTGCGATGGACCATTCAAG	200 pb	(QUROLLO et al., 2017)
Bcommon-R	CCTGTATTGTTATTTCTTGTCACTACCTC		
18S rRNA			
BT-F3	TGGGGGGAGTATGGTCGCAAG	650 pb	(SEO et al., 2013)
BT-R3	CTCCTTCCTTTAAGTGATAAG		

FA= fragmento amplificado

2.4.2 Eletroforese e análise dos resultados

Um volume de 10 μ L dos produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), separados por eletroforese (5V/cm), corados com brometo de etídio (0,5 μ g/mL) e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100bases DNA Ladder, product #SM024, Thermo Scientific).

2.4.3 Sequenciamento

O material para sequenciamento foi purificado a partir de 5 μ L do produto de PCR das amostras positivas, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções em um analisador genético automatizado (ABI 3730 DNA Analyser, Thermo Fisher Scientific®) na Plataforma de Bioinformática da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). As sequências obtidas serão alinhadas através do programa DNA Baser® e submetidas a pesquisa de homologia com outras sequências depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTn.

2.4.4 Análise filogenética

Para todas as análises filogenéticas realizadas, as sequências obtidas no sequenciamento e as obtidas em bancos de dados foram alinhadas pela ferramenta *MUSCLE* (EDGAR, 2004) no programa *Seaview4* (GOUY ET AL., 2010). As relações filogenéticas foram estimadas usando inferência filogenética por Máxima Verossimilhança (MV) implementado na ferramenta *PhyML* (GUINDON & GASCUEL, 2003) sob um modelo de evolução de sequência que foi escolhido depois de testes de modelos alternativos hierarquicamente pela computação usando o critério de informação Bayesiano, determinado no MEGA versão 7 (KUMAR et al., 2016). O suporte estatístico dos clados foi medido por uma busca heurísticas com 1.000 repetições de “bootstrap”. As relações filogenéticas foram visualizadas no software *FigTree* v.1.4 (RAMBAUT, 2012).

3 RESULTADOS

Neste estudo foi avaliado um total de 553 carrapatos, dentre eles larvas de *Amblyomma* spp., ninfas de *Haemaphysalis juxtakochi*, *Amblyomma brasiliense* e *Amblyomma coelebs*, e adultos de *Amblyomma ovale*, previamente descritos por Magalhães-Matos et al. (2017).

Do total de carrapatos analisados por PCR, 1,99% (11/553) amplificaram DNA de pelo menos um dos agentes testados (*Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. ou Ordem Piroplasmida), sendo todas as amostras negativas para *Ehrlichia* spp. As frequências de positivos por espécies de carrapatos estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2. Espécies de carrapatos e frequência de positivos para *Anaplasma* spp., *Borrelia* spp. e agentes da Ordem Piroplasmida, por espécie de carrapato.

Espécie de carrapato	No	<i>Anaplasma</i> spp.		<i>Borrelia</i> spp.		Ordem Piroplasmida	
		No pos. (%)	23S rRNA e 16S rRNA	No pos. (%)	flaB e 16S rRNA	No pos. (%)	18S rRNA
<i>Amblyomma</i> spp.	18	0	-	1 (5.6)	<i>Borrelia</i> sp.	0	
<i>H. juxtakochi</i>	5	0	-	0		0	
<i>A. brasiliense</i>	72	0	-	0		0	
<i>A. coelebs</i>	41	4 (1.0)	<i>Anaplasma</i> sp.	3 (0.7)	<i>Borrelia</i> sp.	2 (0.5)	<i>Theileria</i> sp.
	3						
<i>A. ovale</i>	45	0	-	1 (2.2)	<i>Borrelia</i> sp.	0	
Total	55	4 (1.0)		5 (0.9)		2 (0.4)	
	3						

No= número de carrapatos; No pos= número de positivos

Foi possível observar que os quatro de *Anaplasma* sp. de *A. coelebs* são idênticos entre si e possuem uma similaridade de 94,7% (447/472) e 98,09% (820/836) nos genes 23S e 16S ribossomais de *Anaplasma marginale* cepa Florida, respectivamente (número de acesso GenBank: CP001079). As sequências parciais dos genes *flaB* e 16S rRNA dos isolados de *Borrelia* spp. mostrou pequena diferença entre elas e uma identidade abaixo de 88% e 99,1%, respectivamente, com espiroquetas do grupo da Febre Recorrente

(MK604332 e KT364340). Por último, a sequência parcial do gene 18S rRNA de Piropasmídeos mostrou 97,62% de similaridade com *Theileria cervi* (AY735135).

As amostras positivas para *Borrelia* spp. não amplificaram nos ensaios de PCR para os genes *hpt* e *glpQ*, e duas delas não amplificaram para o gene 16SrRNA. Esse fato se deu, provavelmente, devido à sensibilidade dos *primers* utilizados e as amostras não possuem DNA em concentração suficiente para a amplificação.

A análise filogenética para os agentes encontrados neste estudo está ilustrada nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7. Os números de acesso à sequência de nucleotídeos no GenBank para as sequências parciais obtidas no presente estudo são: MT018000 (*Borrelia* sp. strain AC425, *flaB*), MT018001 (*Borrelia* sp. strain AC549, *flaB*), MT018002 (*Borrelia* sp. strain AC129, *flaB*) MT018003 (*Borrelia* sp. AC444, *flaB*), MT018004 (*Borrelia* sp. strain AO17, *flaB*), MT019342 (*Borrelia* sp. AC444, 16S *rRNA*), MT019525 (*Borrelia* sp. strain AC425, 16S *rRNA*), MT019528 (*Borrelia* sp. strain AC129, 16S *rRNA*); MT022490 ((*Anaplasma* sp. isolado AC191, 23S *rRNA*), MT019664 (*Anaplasma* sp. isolado AC458, 23S *rRNA*), MT019625 (*Anaplasma* sp. isolado AC240, 23S *rRNA*), MT019564 (*Anaplasma* sp. isolado AC401, 23S *rRNA*), MT019536 (*Anaplasma* sp. isolado AC191, 16S *rRNA*), MT019537 (*Anaplasma* sp. isolado AC458, 16S *rRNA*), MT019545 (*Anaplasma* sp. isolado AC240, 16S *rRNA*), MT019560 (*Anaplasma* sp. isolado AC401, 16S *rRNA*), MT019670 (*Theileria* sp. isolado *A. coelebs* 74), MT019669 (*Theileria* sp. isolado *A. coelebs* 262).

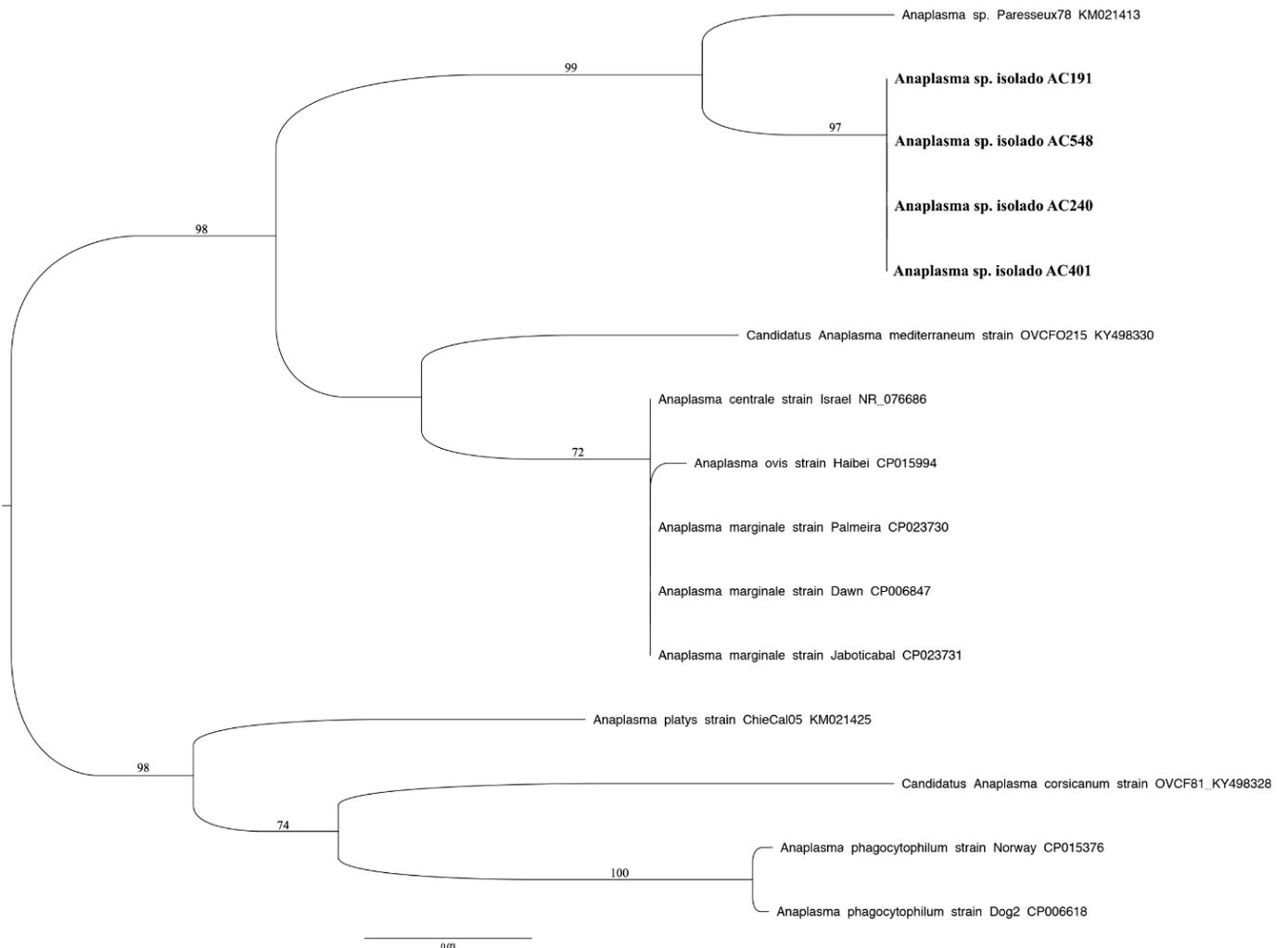


Figura 3. Árvore filogenética das espécies de *Anaplasma* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene 23S *rRNA*, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.

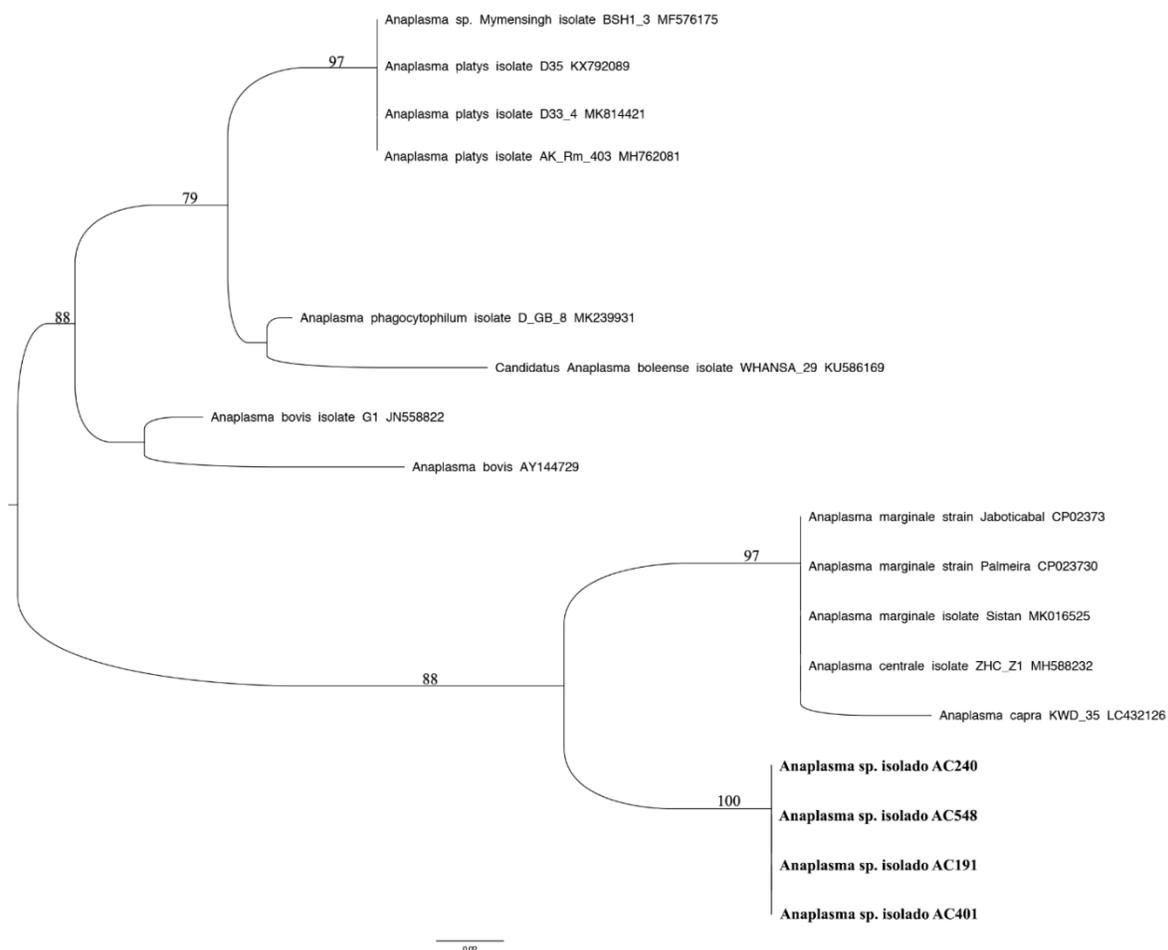


Figura 4. Árvore filogenética das espécies de *Anaplasma* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene 16S *rRNA*, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.



Figura 5. Árvore filogenética das espécies de *Borrelia* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene 16S rRNA, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.

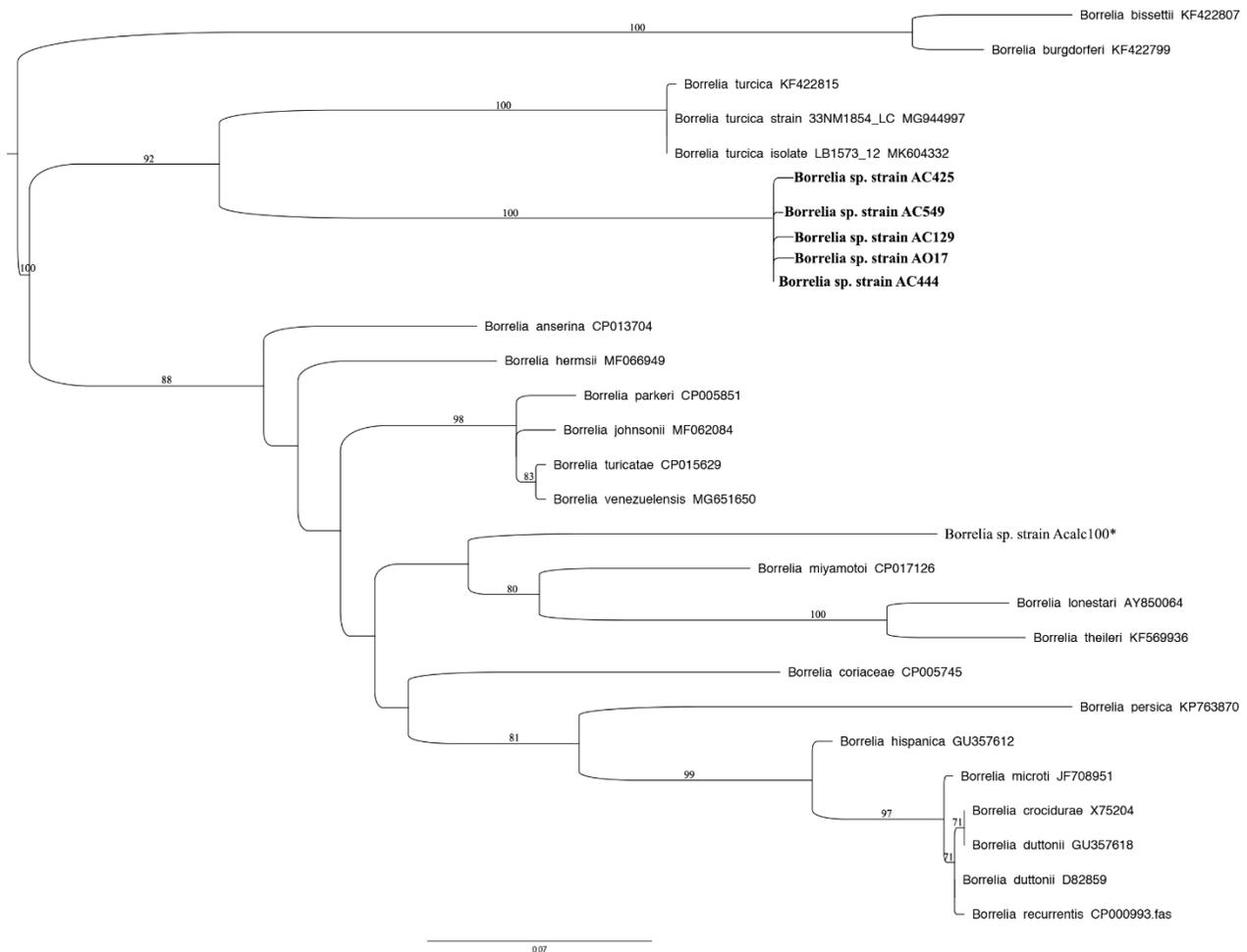


Figura 6. Árvore filogenética das espécies de *Borrelia* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene *flaB*, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.

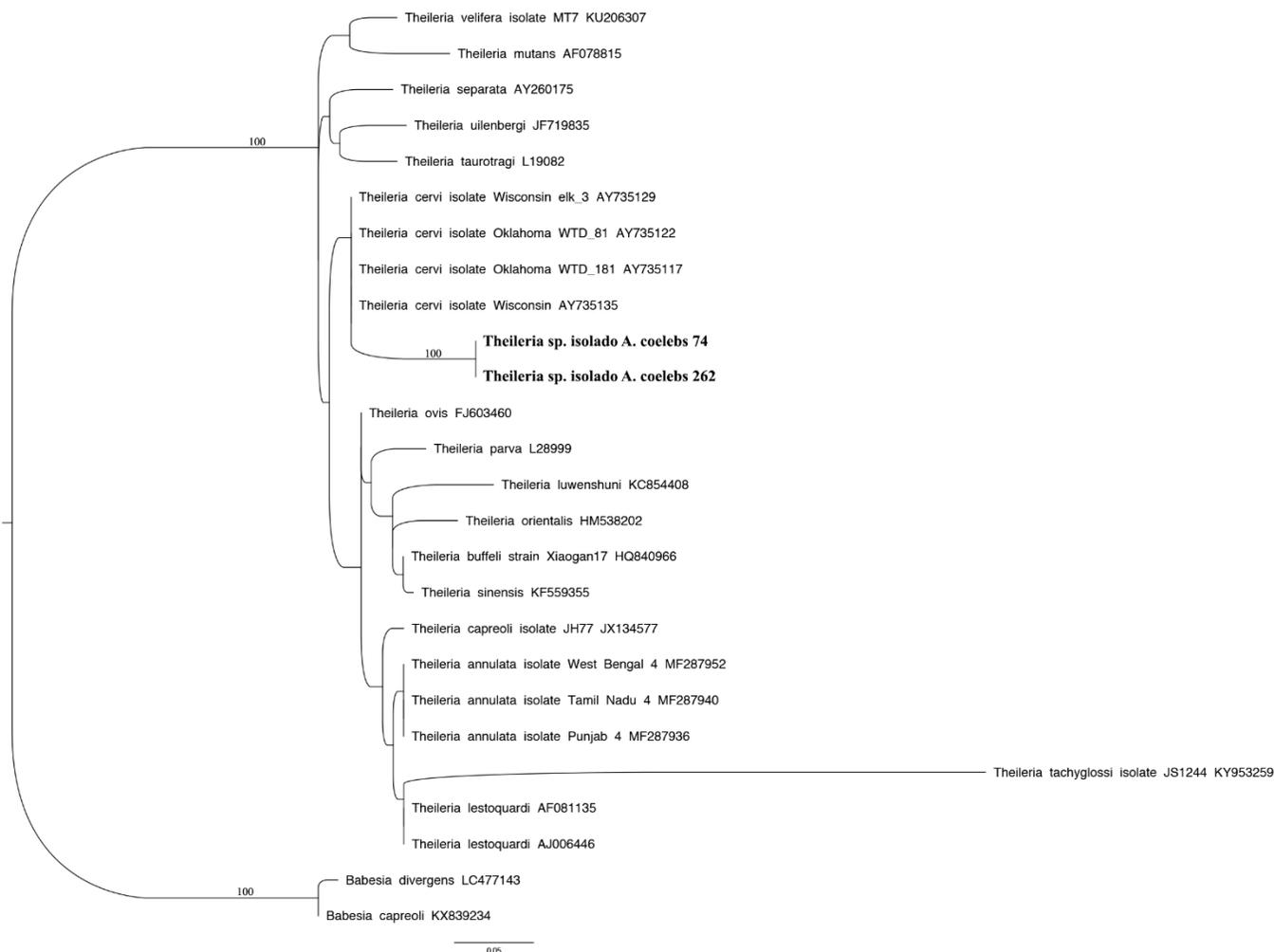


Figura 7. Árvore filogenética das espécies de *Theileria* detectado nesse estudo (em negrito), baseada nas sequências do gene 18S rRNA, utilizando os métodos ML e Bayesiano. Os números (>0,7/>70%) acima dos ramos indicam probabilidades do nó posterior ou valores de auto inicialização (MrBayes/ML). As barras de escala indicam uma distância evolutiva de 0,04 substituições por posição na sequência e os rótulos das ramificações incluem números de acesso ao GenBank.

4 DISCUSSÃO

Bioagentes dos gêneros *Borrelia*, *Anaplasma* e *Theileria* foram encontrados em carrapatos coletados em quatis oriundos do PNI, no Paraná. A análise molecular e filogenética dos isolados deixa claro que se trata de espécies ainda não descritas.

O DNA de *Borrelia* sp. foi detectado em carrapatos das espécies *A. coelebs* e *A. ovale*. A análise filogenética mostrou que os três isolados de *Borrelia* sp. em *Amblyomma coelebs* detectados nesse trabalho são próximos geneticamente de “*Can. B. ivorensis*” e de “*Can. B. africana*”, cepas que foram detectadas em *Amblyomma variegatum* coletados em bovinos na Costa do Marfim (EHOUNOUD et al., 2016). Também, é possível observar que esses isolados de *Borrelia* sp. juntam-se a um clado do grupo de *Borrelia* spp. Reptiliana (REP *Borreliae*), o qual é novo grupo filogenético também vetorizado por carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e associado a hospedeiros répteis (TAKANO et al., 2010).

Na América do Sul, a primeira espécie do gênero *Borrelia* detectada em carrapatos do gênero *Amblyomma* está mais próximas geneticamente das espécies que compõe o grupo REP *Borrelia* (PACHECO et al., 2019). Na Argentina, uma espécie de *Borrelia* também foi encontrada, infectando *A. aureolatum* coletado em aves silvestres (CICUTTIN et al., 2019). Portanto, o presente estudo vem contribuir para os achados de *Borrelia* sp. em espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma*.

O carrapato *A. coelebs* tem preferência parasitária por antas (*Tapirus terrestris*) (GUGLIELMONE et al., 2014), e nas fases imaturas já foi encontrado em outros mamíferos e aves (OGRZEWALSKA et al., 2010; LOPES et al., 2016). Por outro lado, o *A. ovale* é mais comumente registrado em carnívoros selvagens e domésticos (GUGLIELMONE, 2003; MAGALHÃES-MATOS et al., 2017), com pequenos roedores como hospedeiros durante os estágios imaturos (GUGLIELMONE, 2003). Além disso, é importante salientar a ocorrência de infestação em humanos por ambas as espécies de carrapatos (GUIMARÃES et al., 2001; SZABÓ et al., 2006; GARCIA et al., 2015; ITO et al., 2017). Porém, até o momento apenas *A. ovale* é dado como transmissor competente de doenças, como a riquetsiose humana causada por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (SZABÓ et al., 2013).

Outro importante achado obtido nesse estudo foi a detecção de DNA de *Anaplasma* sp. em *A. coelebs*. Na análise filogenética, observou-se que essas amostras entram no

mesmo grupo de *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* e *Anaplasma capra*, mas se diferenciam formando um ramo separado dessas três espécies.

No Brasil, as espécies de *Anaplasma* são mais comumente detectadas em carrapatos do gênero *Rhipicephalus*, como por exemplo, *Anaplasma marginale* que infecta bovinos e tem o carrapato *Rhipicephalus microplus* como seu principal vetor (VIEIRA et al., 2019). De fato, os artrópodes vetores envolvidos no ciclo de transmissão de espécies *Anaplasma* entre mamíferos silvestres no Brasil ainda são desconhecidos (DE SOUSA. et al., 2017). No entanto, estudos anteriores realizados no Pantanal brasileiro já detectaram DNA de *Anaplasma* spp. em diferentes espécies de *Amblyomma*, como em *A. sculptum*, *A. triste* e ninfa de *Amblyomma* spp. coletados em onça-pintada (*Panthera onca*) (WIDMER et al., 2011); e em *A. sculptum*, *A. parvum* e larvas de *Amblyomma* spp. coletados em cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (DE SOUSA. et al., 2017). Ademais, há de se considerar que essa positividade para *Anaplasma* spp. em carrapatos encontrados parasitando animais pode estar relacionada aos restos da refeição sanguínea do artrópode no hospedeiro infectado (SOUSA et al., 2017).

Nesse trabalho também foi identificado DNA de *Theileria* sp. em um carrapato da espécie *A. coelebs*. Na análise filogenética observou-se que as sequências geradas eram próximas às sequências de *Theileria cervi* disponíveis no GenBank, porém a diferença de nucleotídeos nos leva a acreditar ser uma espécie ainda não descrita ou que pelo menos não se tenha dados moleculares depositados no GenBank. No Brasil, DNA de *T. cervi* já foi detectado em veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) em Minas Gerais (SOUSA et al., 2018) e em veado-dos-pampas no Pantanal (*Ozotoceros bezoarticus*) (SILVEIRA et al., 2013; SOUSA et al., 2018).

Nenhuma das amostras amplificaram para hemoparasitos do gênero *Ehrlichia*. Estudos anteriores realizados no Pantanal brasileiro detectaram DNA *Ehrlichia* spp. em várias espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* coletados em carnívoros selvagens (WIDMER et al., 2011; MELO et al., 2016; SOUSA. et al., 2017), no entanto, a amplificação dessas amostras pode estar relacionado aos restos da refeição sanguínea do artrópode no hospedeiro infectado (DE SOUSA et al., 2017). Dessa forma, não há evidências de transmissão desse patógeno em *Amblyomma* spp. no Brasil até o momento (GRUHN et al., 2019).

5 CONCLUSÃO

Os carrapatos dos quatis de hábitos sinantrópicos que habitam o Parque Nacional do Iguaçu podem apresentaram DNA de *Anaplasma* sp., *Borrelia* sp. e *Theileira* sp. A partir das análises filogenéticas desses hemoparasitos, pode-se observar que se trata de espécies ainda não descritas.

6 REFERÊNCIAS

- ALMEIDA AP SOUZA, TD MARCILI, A LABRUNA, MB. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology** v. 50, n. 3, p. 640-646, 2013.
- BARLOUGH JE MADIGAN, JE DEROCK, E BIGORNIA, L. Nested polymerase chain reaction for detection of *Ehrlichia equi* genomic DNA in horses and ticks (*Ixodes pacificus*). **Veterinary Parasitology**, v. 63, n. 3, p. 319-329, 1996/06/01/ 1996.
- BARROS-BATTESTI DM ARZUA, M BECHARA, GH. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1^a ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.
- BERTRAND A-S GARCIA, JC BAPTISTON, IC ESTEVES, E NAUDERER, R. Caracterização preliminar de caça furtiva no Parque Nacional do Iguazu (Paraná) e os desafios para a sustentabilidade. **Biodiversidade Brasileira**, v. 8, n. 1, p. 19-34, 2018.
- BLANCO CM TEIXEIRA, BR DA SILVA, AG DE OLIVEIRA, RC STRECHT, L OGRZEWALSKA, M DE LEMOS, ERS. Microorganisms in ticks (Acari: Ixodidae) collected on marsupials and rodents from Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 90-98, 2017.
- CICUTTIN G DE SALVO, MN SANCHEZ, J CANON, C LARESCHI, M. Molecular detection of *Bartonella* in fleas (Hexapoda, Siphonaptera) collected from wild rodents (Cricetidae, Sigmodontinae) from Argentina. **Medical Veterinary Entomology**, v. 33, n. 4, p. 541-545, Dec 2019.
- DAHMANI M LOUDAHI, A MEDIANNIKOV, O FENOLLAR, F RAOULT, D DAVOUST, B. Molecular detection of *Anaplasma platys* and *Ehrlichia canis* in dogs from Kabylie, Algeria. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 2, p. 198-203, 2015/03/01/ 2015.
- DANTAS-TORRES F CHOMEL, BB OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends Parasitol**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012.

DE SOUSA KCM FERNANDES, MP HERRERA, HM FRESCHI, CR MACHADO, RZ ANDRÉ, MR. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 245-253, 2018/02/01/ 2018.

DERDÁKOVÁ M BEATI, L PET'KO, B STANKO, M FISH, D. Genetic variability within *Borrelia burgdorferi* sensu lato genospecies established by PCR-single-strand conformation polymorphism analysis of the rrfA-rrlB intergenic spacer in Ixodes ricinus ticks from the Czech Republic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 1, p. 509-516, 2003.

DITCHKOFF SS SAALFELD, ST GIBSON, CJ. Animal behavior in urban ecosystems: modifications due to human-induced stress. **Urban ecosystems**, v. 9, n. 1, p. 5-12, 2006.

EDGAR, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics** 5: 113, 2004.

EHOUNOUD CB, YAO KP, DAHMANI M, ACHI YL, AMANZOUAGHENE N, KACOU N'DOUBA A, N'GUESSAN, J.D., RAOULT, D., FENOLLAR, F., MEDIANNIKOV, O. Multiple Pathogens Including Potential New Species in Tick Vectors in Côte d'Ivoire. **PLoS Negl Trop Dis**, 10(1): e0004367, p. 1-18, 2016.

FERREIRA MS KAJIN, M VIEIRA, MV LÓRAZANGRANDI, P CERQUEIRA, R GENTILE, R. Life history of a neotropical marsupial: Evaluating potential contributions of survival and reproduction to population growth rate. **Mammalian Biology**, v. 78, n. 6, p. 406-411, 2013/11/01 2013.

GOUY, M., GUINDON, S., GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Mol. Biol. Evol.** 27: 221–224, 2010.

GUINDON S, GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Syst. Biol.** 52: 696–704, 2003.

GARCIA MV, MATIAS J, AGUIRRE AAR, CSORDAS BG, SZABÓ MPJ, ANDREOTTI R. Successful feeding of *Amblyomma coelebs* (Acari: Ixodidae) nymphs on humans in Brazil: skin reactions to parasitism. **J Med Entomol**, 52(2): 117-119, 2015.

GUGLIELMONE, A.A., ROBBINS, R.G., APANASKEVICH, D.A., PETNEY, T.N., ESTRADAPEÑA, A., HORAK, I.G. The hard ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae). London: Springer; 2014.

GUGLIELMONE AA. **Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical zoogeographic region**. 2003. ISBN 9874368284.

GUIMARÃES JH BATTESTI, DMB TUCCI, EC. **Ectoparasitos de importância veterinária**. 1ª ed. São Paulo: : Plêiade/Fapesp, 2001.

GÜNER ES WATANABE, M HASHIMOTO, N KADOSAKA, T KAWAMURA, Y EZAKI, T KAWABATA, H IMAI, Y KANEDA, K MASUZAWA, T. *Borrelia turcica* sp. nov., isolated from the hard tick *Hyalomma aegyptium* in Turkey. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1649-1652, 2004.

GRUHN, K.D., OGRZEWALSKA, M., ROZENTAL, T., FARIKOSKI, I.O., BLANCO, C., SOUZA F.L., FRANÇA, R.V.M. Evaluation of rickettsial infection in free-range capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) (Rodentia: Caviidae) and ticks (Acari: Ixodidae) in Western Amazon, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, 2019. doi:10.1016/j.ttbdis.2019.04.007.

ITO K, TANIGUCHI H, OHTAKI N, ANDO S, KAWABATA H. A first case of tick bite by *Amblyomma coelebs* in Japan. **J Dermatol**, 1-2, 2017.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol. Biol. Evol.** 33: 1870–1874, 2016.

LOPES MG, MAY L JR, FOSTER RJ, HARMSSEN BJ, SANCHEZ E, MARTINS, T.F., QUIGLEY, H., MARCILI, A., LABRUNA, M.B. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. **Parasit Vectors**, 9(1): 62, 2016.

MAGALHÃES-MATOS PC MORAES, MFD VALIM, JRA CASTRO, GNS SANTOS, PN MANIER, BSML FONSECA, AH. Ticks (Acari: Ixodidae) and lice (*Phthiraptera*:

Trichodectidae) infesting free-living coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with sylvatic and synanthropic habits in the Atlantic rainforest of Southern Brazil. **systematic and applied acarology**, v. 22, n. 6, p. 779-784, 2017.

MELO AL, WITTER R., MARTINS, F.T., PACHECO, T.A., ALVES, A.S., CHITARRA, C.S., DUTRA, V., NAKAZATO, L., PACHECO, R.C., LABRUNA, M.B., AGUIAR, D.M. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. **Medical and Veterinary Entomology**, 30: 112–116, 2016.

MCCOY BN MAÏGA, O SCHWAN, TG. Detection of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus geigy* from Mali. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 4, p. 401-403, 2014.

OGRZEWALSKA M, UEZU A, LABRUNA MB. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitol Res**, 106(4): 809-816, 2010.

PACHECO A CORDEIRO, MD CEPEDA, MB LUZ, HR CARDOZO, SV BERTO, BP GUTERRES, A FONSECA, AHd. Hemoparasites in ticks of wild birds of Serra dos Órgãos National Park, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, n. AHEAD, 2019.

PALOMAR AM SANTIBANEZ, P MAZUELAS, D RONCERO, L SANTIBANEZ, S PORTILLO, A OTEO, JA. Role of birds in dispersal of etiologic agents of tick-borne zoonoses, Spain, 2009. **Emerging Infectious Disease journal**, v. 18, n. 7, p. 1188-91, Jul 2012.

QUROLLO BA ARCHER, NR SCHREEG, ME MARR, HS BIRKENHEUER, AJ HANEY, KN THOMAS, BS BREITSCHWERDT, EB. Improved molecular detection of *Babesia* infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 128, 2017/03/07 2017.

SAMBROOK J FRITSCH, EF MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989. ISBN 0879693096.

RAMBAUT, A. FigTree v1. 4.0. A graphical viewer of phylogenetic trees. **Inst. Evol. Biol. Univ. Edinburgh**, 2012.

SCHWAN TG RAFFEL, SJ SCHRUMPF, ME POLICASTRO, PF RAWLINGS, JA LANE, RS BREITSCHWERDT, EB PORCELLA, SF. Phylogenetic analysis of the spirochetes *Borrelia parkeri* and *Borrelia turicatae* and the potential for tick-borne relapsing fever in Florida. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 8, p. 3851-3859, 2005.

SEO M-G YUN, S-H CHOI, S-K CHO, G-J PARK, Y-S CHO, K-H KWON, O-D KWAK, D. Molecular and phylogenetic analysis of equine piroplasms in the Republic of Korea. **Research in Veterinary Science**, v. 94, n. 3, p. 579-583, 2013.

SILVEIRA JAG RABELO, ÉML LACERDA, ACR BORGES, PAL TOMÁS, WM PELLEGRIN, AO TOMICH, RGP RIBEIRO, MFB. Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 4, p. 341-345, 2013/06/01/ 2013.

STROMDAHL E WILLIAMSON, PC KOLLARS, TM EVANS, Sr. BARRY, R VINCE, MA DOBBS, N. Evidence of *Borrelia lonestari* DNA in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) removed from humans. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5557-5562, 2003.

SZABÓ MP LABRUNA, MB CASTAGNOLLI, KC GARCIA, MV PINTER, A VERONEZ, VA MAGALHÃES, GM CASTRO, MB VOGLIOTTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, n. 3-4, p. 339-346, 2006.

SZABÓ MPJ PINTER, A LABRUNA, MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, 2013.

TAKANO A GOKA, K UNE, Y SHIMADA, Y FUJITA, H SHIINO, T WATABANE, H KAWABATA, H. Isolation and characterization of a novel *Borrelia* group of tick-borne borreliae from imported reptiles and their associated ticks. **Environmental Microbiology Reports**, v. 12, n. 1, p. 134-146, 2010.

VIEIRA, L.L., CANEVER, M.F., CARDOZO, L.L., CARDOSO, C.P., HERKENHOFF, M.E., NETO, A.T., VOGEL, C.I.G., MILETTI L.C. Prevalence of *Anaplasma marginale*,

Babesia bovis, and *Babesia bigemina* in cattle in the Campos de Lages region, Santa Catarina state, Brazil, estimated by multiplex-PCR. **Parasite Epidemiology and Control**, 2019.

WIDMER, C.E., ALMEIDA, A.P., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B. Tickborne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, 11: 1001–1005; 2011.

4 CONCLUSÃO GERAL

Esse estudo traz o primeiro registro de *Rickettsia bellii* em carrapatos das espécies *Amblyomma varium* e em *Amblyomma goeldii* no Brasil.

Também é apresentado o primeiro registro de “*Candidatus R. senegalensis*” no Brasil, uma *Rickettsia* intimamente relacionada com *R. felis*.

Os carrapatos dos quatis de hábitos sinantrópicos que habitam o Parque Nacional do Iguaçu podem estar infectados com *Anaplasma* sp., *Borrelia* sp. e *Theileira* sp. A partir das análises filogenéticas desses hemoparasitos, pode-se observar que se trata de espécies ainda não descritas.

Além disso, o presente estudo contribui também para o aumento no número de espécies de *Amblyomma* com DNA positivo para *Borrelia* sp.

5 REFERÊNCIAS GERAIS

- ABARCA, K., LÓPEZ, D.E.L., GONZÁLEZ, J., DABANCH, P., TORRES, J., SOLARI, M., PERRET, V.C. Evidencia seroepidemiológica de exposición humana a *Anaplasma* sp en Santiago, Chile. **Revista chilena de infectología**, v. 25, n. 5, p. 358-361, 2008.
- ABEL, I.S., MARZAGAO, G., YOSHINARI, N.H., SCHUMAKER, T.T.S. Borrelia-like spirochetes recovered from ticks and small mammals collected in the Atlantic Forest Reserve, Cotia County, State of Sao Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 5, p. 621-624, 2000.
- AGUIAR, D.M., ARAUJO, J.P., NAKAZATO, L., BARD, E., CABEZAS-CRUZ, A. Complete Genome Sequence of an *Ehrlichia minasensis* Strain Isolated from Cattle. **Microbiol Resour Announc**, v. 8, n. 15, p. e00161-19, 2019.
- ALMEIDA, A.P., SOUZA, T.D., MARCILI, A., LABRUNA, M.B. Novel *Ehrlichia* and *Hepatozoon* agents infecting the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) in southeastern Brazil. **Journal of Medical Entomology** v. 50, n. 3, p. 640-646, 2013.
- ANDERSON, J.F. Ecology of Lyme disease. **Connecticut Medicine**, v. 53, n. 6, p. 343-6, 1989.
- DUMLER, A.M, SCORPIO, J., TEIXEIRA, D., ALLEGRETTI, R., MACHADO, S.R. Molecular detection of tick-borne bacterial agents in Brazilian and exotic captive carnivores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 247-253, 2012.
- ANGELAKIS, E., MEDIANNIKOV, O., PAROLA, P., RAOULT, D. *Rickettsia felis*: the complex journey of an emergent human pathogen. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 554-564, 2016.
- ARRAGA-ALVARADO, C., PALMAR, M., PARRA, O., SALAS, P. *Ehrlichia platys* (*Anaplasma platys*) in Dogs from Maracaibo, Venezuela: An Ultrastructural Study of Experimental and Natural Infections. **Veterinary Pathology**, v. 40, n. 2, p. 149-156, 2003.
- BARBIERI, A.R.M., FILHO, J.M., NIERI-BASTOS, F.A., SOUZA, J.C., SZABÓ, M.P.J., LABRUNA, M.B. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a

spotted fever-endemic area of southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 848-853, 2014.

BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. 1^a ed. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.

BENIGNO, R.N.M., RODRIGUES, B.R.F., SERRA-FREIRE, N.M. Avaliação das infecções por *Babesia* e *Ehrlichia* em cães e das infecções humanas por carrapatos oriundos desses cães no município de Campinas, Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 33, n. 4, p. 238-245, 2012.

BERNABEU-WITTEL, M., DEL TORO, M., NOGUERAS, M., MUNIAIN, M., CARDENOSA, N., MÁRQUEZ, F., SEGURA, F., PACHÓN, J. Seroepidemiological study of *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi*, and *Rickettsia conorii* infection among the population of southern Spain. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 6, p. 375, 2006.

BEZERRA-SANTOS, M.A., NOGUEIRA, B.C.F., YAMATOGLI, R.S., RAMOS, R.A.N., GALHARDO, J.A., CAMPOS, A.K. Ticks, fleas and endosymbionts in the ectoparasite fauna of the black-eared opossum *Dipelphis aurita* in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, p. 1-10, 2020.

BISHOP, R., MUSOKE, A., MORZARIA, S., GARDNER, M., NENE, V. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. **Parasitology**, v. 129 Suppl, p. S271-83, 2004.

BITAM, I., DITTMAR, K., PAROLA, P., WHITING, M.F., RAOULT, D. Fleas and flea-borne diseases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p. e667-76, 2010.

BLANCO, C.M., TEIXEIRA, B.R., SILVA, A.G, OLIVEIRA, R.C., STRECHT, L., OGRZEWALSKA, M., LEMOS, E.R.S. Microorganisms in ticks (Acari: Ixodidae) collected on marsupials and rodents from Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul states, Brazil. **Ticks Tick-borne Dis.**, v. 8, n. 1, p. 90-98, 2017.

BRANDÃO, V.M.D., BARROZO, P.H.M., SOUSA, L.O., SANTOS, R.C., SCHWANKE, K., SAMPAIO, F.D., PRADO, W.S., AMARAL, A.S.,

CAVALCANTE, G.G. Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs from municipality of Belém, State of Pará, Brazil. **Cienc. Rural**, v. 49, 2019.

BUDWEG, C.I., SOUSA, A.O., CARVALHO, T.R.V., SOUZA, Z.Ê.S., AZEVEDO SERPA, M.C., MARTINS, T.F., NIERI-BASTOS, F., MARCILI, A., LABRUNA, M.B., MORAES-FILHO, J. Serological survey of *Rickettsia* in equids from Vale do Paraíba, São Paulo, Brazil, and their tick identification and molecular investigation of *Rickettsia*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 56, n. 4, 2019.

CABEZAS-CRUZ, A., ZWEYGARTH, E., VANCOVA, M., BRONISZEWSKA, M., GRUBHOFFER, L., PASSOS, L.M., RIBEIRO, M.F., ALBERDI, P., DE LA FUENTE, J. *Ehrlichia minasensis* sp. nov., a new species within the genus *Ehrlichia* isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Jan 12 2016.

CARVALHO, L., ARMUA-FERNANDEZ, M.T., SOSA, N., FÉLIX, M.L., VENZAL, J.M. *Anaplasma platys* in dogs from Uruguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 241-245, 2017.

CAUVIN, A., HOOD, K., SHUMAN, R., ORANGE, J., BLACKBURN, J.K., SAYLER, K.A., WISELY, S.M. The impact of vector control on the prevalence of *Theileria cervi* in farmed Florida white-tailed deer, *Odocoileus virginianus*. **Parasit Vectors**, v. 12, n. 1, p. 100, 2019.

CHILDS, J.E., PADDOCK, C.D. The ascendancy of *Amblyomma americanum* as a vector of pathogens affecting humans in the United States. **Annu Rev Entomol**, v. 48, p. 307-37, 2003.

CLARK, K.L., LEYDET, B.F., THRELKELD, C. Geographical and genospecies distribution of *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA detected in humans in the USA. **Journal of Medical Microbiology**, v. 63, n. Pt 5, p. 674-84, 2014.

CORDEIRO, M.D., BAHIA, M., MAGALHÃES-MATOS, P.C., CEPEDA, M.B., GUTERRES, A., FONSECA, A.H. Morphological, molecular and phylogenetic characterization of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 4, p. 555-561, 2018.

COSTA, A.P., SILVA, A.B., COSTA, F.B., XAVIER, G.S., MARTINS, T.F., LABRUNA, M.B., GUERRA, R.M.S.N.C. A Survey of Ectoparasites Infesting Urban and Rural Dogs of Maranhão State, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 3, p. 674-678, 2013.

DANTAS-TORRES, F. Climate change, biodiversity, ticks and tick- borne diseases: The butterfly effect. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, 2015.

DANTAS-TORRES, F., MARTINS, T.F., MUÑOZ-LEAL, S., ONOFRIO, V.C., BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2019.

DITCHKOFF, S.S., SAALFELD, S.T., GIBSON, C.J. Animal behavior in urban ecosystems: modifications due to human-induced stress. **Urban Ecosystems**, v. 9, n. 1, p. 5–12, 2006.

DOUDOUMIS, V., TSIAMIS, G., WAMWIRI, F., BRELSFOARD, C., ALAM U., AKSOY, E., DALAPERAS, S., ABD-ALLA, A., OUMA, J., TAKAC, P., AKSOY, S., BOURTZIS, K. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in laboratory and natural populations of different species of tsetse flies (genus *Glossina*). **BMC Microbiol.** 12 (Suppl. 1): S3., 2012.

DUMLER, J.S., BARBET, A.F., BEKKER, C.P., DASCH, G.A., PALMER, G.H., RAY, S.C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F.R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int J Syst Evol Microbiol**, v. 51, n. Pt 6, p. 2145-65, 2001.

DUMLER, J.S., CHOI, K.S., GARCIA-GARCIA, J.C., BARAT, N.S., SCORPIO, D.G., GARYU, J.W., GRAB, D.J., BAKKEN, J.S. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 12, p. 1828-1834, 2005.

DURDEN, L.A., HINKLE, N.C. Chapter 10 - Fleas (Siphonaptera). In: MULLEN, G. R. e DURDEN, L. A. (Ed.). **Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)**: Academic Press, p.145-169, 2019.

ESTRADA-PEÑA, A., OSTFELD, R.S., PETERSON, A.T., POULIN, R., DE LA FUENTE, J. Effects of environmental change on zoonotic disease risk: an ecological primer. **Trends in Parasitology**, v. 30, n. 4, p. 205-214, 2014.

FACCINI, J.L.H., BARROS-BATTESTI, D.M. Aspectos gerais da biologia e identificação de carrapatos. In: VOX/ICTTD-3/BUTANTAN (Ed.). **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Brazil.: Vox/ICTTD-3/Butantan, v.1, 2006.

FIGUEREDO, L.A., DA SILVA SALES, K.G., DEUSTER, K., POLLMEIER, M., OTRANTO, D., DANTAS-TORRES, F. Exposure to vector-borne pathogens in privately owned dogs living in different socioeconomic settings in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 243, p. 18-23, 2017.

FONSECA, A.H., SALLES, R.S., SALLES, S.A.N., MADUREIRA, R.C., YOSHINARI, N.H. Borreliose de Lyme simile: uma doença emergente e relevante para a dermatologia no Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 2, p. 171-178, 2005.

GUIMARÃES, J.H., TUCCI E.C., BARROS-BATTESTI, D.M. Ácaros. In: **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade/FAPESP, 2001.

GUIMARÃES, A., RAIMUNDO, J.M., RODRIGUES, R.B., PEIXOTO, M.P., SANTOS, H.A., ANDRÉ, M.R., MACHADO, R.Z., BALDANI, C.D. *Ehrlichia* spp. infection in domestic cats from Rio de Janeiro State, southeast Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, n. 1, p. 180-185, 2019.

GONZALEZ, I.H.L., LABRUNA, M.B., CHAGAS, C.R.F., SALGADO, P.A.B., MONTICELLI, C., MORAIS, L.H., ANTUNE, T.C., RAMOS, P.L., MARTINS, T.F. Ticks infesting captive and free-roaming wild animal species at the São Paulo Zoo, São Paulo, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 26 (4): 496-499, 2017.

GRUHN, K.D., OGRZEWALSKA, M., ROZENTAL, T., FARIKOSKI, I.O., BLANCO, C., SOUZA F.L., FRANÇA, R.V.M. Evaluation of rickettsial infection in free-range capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) (Rodentia: Caviidae) and ticks (Acari: Ixodidae) in Western Amazon, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, 2019.

HILDEBRANDT, A., GRAY, J.S., HUNFELD, K.P. Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. **Infection**, v. 41, n. 6, p. 1057-72, 2013.

HORTA, M.C., OGRZEWALSKA, M., AZEVEDO, M.C., COSTA, F.B., FERREIRA, F., LABRUNA, M.B. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* from five geographic regions of Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 1, p. 96-100, 2014.

HUNFELD, K.P., HILDEBRANDT, A., GRAY, J.S. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. **International Journal of Parasitology**, v. 38, n. 11, p. 1219-37, 2008.

IANNINO, F., SULLI, N., MAITINO, A., PASCUCCHI, I., PAMPIGLIONE, G., SALUCCI, S. Fleas of dog and cat: species, biology and flea-borne diseases. **Veterinaria Italiana**, v. 53, n. 4, p. 277-288, 2017.

KIVARIA, F., RUHETA, M.R., MKONYI, P.A., MALAMSHA, P.C. Epidemiological aspects and economic impact of bovine Theileriosis (East Coast Fever) and its control: a preliminary assessment with special reference to Kibaha district, Tanzania. **Veterinary Journal**, v. 173, p. 384-90, 04/01 2007.

KJEMTRUP, A.M., CONRAD, P.A. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. **International Journal of Parasitology**, v. 30, n. 12-13, p. 1323-37, 2000.

KRAWCZAK, F.S., MUÑOZ-LEAL, S., GUZTZAZKY, A.C., OLIVEIRA, S.V., SANTOS, F.C.P., ANGERAMI, R.N., MORAES-FILHO, J., SOUZA, J.C., Jr. LABRUNA, M.B. *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest Infection in a Patient from a Spotted Fever-Endemic Area in Southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551-553, 2016.

LABRUNA, M.B., WHITWORTH, T., BOUYER, D.H., MCBRIDE, J., CAMARGO, L.M.A., CAMARGO, E.P., POPOV, V. WALKER, H.D. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology** v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004.

LA SCOLA, B., BECHAH, Y., LEPIDI, H., RAOULT, D. Prediction of rickettsial skin eschars in humans using an experimental guinea pig model. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, n. 3, p. 128-133, 2009.

LABRUNA, M.B., MATTAR, S., NAVA, S., BERMUDEZ, S., VENZAL, J.M., DOLZ, G., ABARCA, K., ROMERO, L., OTEO, J., ZAVALA-CASTRO, J.

Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v.16, p. 2435-2457, 2011.

LAURANCE, W.F., VASCONCELOS, H.L. Consequências ecológicas da fragmentação florestal na Amazônia. **Oecologia brasiliensis**, 2009.

LEMPEREUR, L., BECK, R., FONSECA, I., MARQUES, C., DUARTE, A., SANTOS, M., ZÚQUETE, S., GOMES, J., WALDER, G., DOMINGOS, A. Guidelines for the Detection of *Babesia* and *Theileria* Parasites. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 17, n. 1, p. 51-65, 2017.

LEWIS, R.E. Resume of the Siphonaptera (Insecta) of the world. **Journal of Medical Entomology** v. 35, n. 4, p. 377-89, Jul 1998.

LIMA, M.L.F., SOARES, P.T., RAMOS, C.A.N., ARAÚJO, F.R., RAMOS, R.A.N., SOUZA, I.I.F., FAUSTINO, M.A.G., ALVES, L.C.A. Molecular detection of *Anaplasma platys* in a naturally-infected cat in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 381-385, 2010.

LINARDI, P.M., GUIMARÃES, L.R. **Siphonaptera of Brazil**. Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 2000.

LINARDI, P.M., SANTOS, J.L. *Ctenocephalides felis felis* vs. *Ctenocephalides canis* (Siphonaptera: Pulicidae): some issues in correctly identify these species. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 4, p. 345-54, Oct-Dec 2012.

LOCKHART, J.M., DAVIDSON, W.R., STALLKNECHT, D.E., DAWSON, J.E. Site-specific geographic association between *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) infestations and *Ehrlichia chaffeensis*-reactive (Rickettsiales: Ehrlichieae) antibodies in white-tailed deer. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 153-158, 1996.

LOCKHART, J.M., DAVIDSON, W.R., STALLKNECHT, D.E., DAWSON, J.E., HOWERTH, E.W. Isolation of *Ehrlichia chaffeensis* from wild white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) confirms their role as natural reservoir hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 7, p. 1681-6, 1997.

LOPES, F.A., REZENDE, J., SILVA, D.B.S., ALVES, F.C.G., OLIVEIRA, C., COSTA, I.P. Evidência molecular de *Borrelia burgdorferi sensu lato* em pacientes no centro-oeste brasileiro. **Revista Brasileira de Reumatologia**, 2017.

- LUZ, H.R., COSTA NETO, S.F.D., WEKSLER, M., GENTILE, R., FACCINI, J.L.H. Ticks parasitizing wild mammals in Atlantic Forest areas in the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 27, n. 3, p. 409, 2018.
- MACHADO, R.Z., ANDRÉ, M.R., WERTHER, K., DE SOUSA, E., GAVIOLI, F.A., ALVES JUNIOR, J.R.F. Migratory and Carnivorous Birds in Brazil: Reservoirs for Anaplasma and Ehrlichia Species? **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 8, p. 75-708, 2012.
- MAGALHÃES-MATOS, P.C., MORAES, M.F.D., VALIM, J.R.A., CASTRO, G.N.S., SANTOS, P.N., MANIER, B.S.M.L., FONSECA, A.H. Ticks (Acari: Ixodidae) and lice (*Phthiraptera: Trichodectidae*) infesting free-living coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with sylvatic and synanthropic habits in the Atlantic rainforest of Southern Brazil. **Sys Appl Acarol**, v. 22, n. 6, p. 779-784, 2017.
- MAGGI, R.G., MASCARELLI, P.E., HAVENGA, L.N., NAIDOO, V., BREITSCHWERDT, E.B. Co-infection with *Anaplasma platys*, *Bartonella henselae* and Candidatus *Mycoplasma haematoparvum* in a veterinarian. **Parasit. Vect.**, v. 6, n. 1, p. 103, 2013/04/15 2013.
- MANTOVANI, E., COSTA, I.P., GAUDITANO, G., BONOLDI, V.L.N., HIGUCHI, M.L., YOSHINARI, N.H. Description of Lyme disease- like syndrome in Brazil: is it a new tick borne disease or Lyme disease variation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 4, p. 443 - 447, 2007.
- MANTOVANI, E., MARANGONI, R.G., GAUDITANO, G., BONOLDI, V.L.N., YOSHINARI, N.H. Amplification of the flgE gene provides evidence for the existence of a Brazilian borreliosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 54, p. 153-158, 2012.
- MAZZOTTI, G.A., SILVA, W.A.C., CARNEIRO, F.T., SCALON, M.C., LIMA, M.A., TEIXEIRA, M.A., LIMA, A.C.F., PALUDO, G.R. Investigação molecular de *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia* spp. em felídeos selvagens cativos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 528-535, 2018.
- MCDADE, J.E. Ehrlichiosis—a disease of animals and humans. **Journal of Infectious Diseases**, v. 161, n. 4, p. 609-617, 1990.

MERTEN, H.A., DURDEN, L.A. A state-by-state survey of ticks recorded from humans in the United States. **Journal of Vector Ecology**, v. 25, n. 1, p. 102-13, Jun 2000.

MIRO, G., CHECA, R., PAPANINI, A., ORTEGA, N., GONZALEZ-FRAGA, J.L., GOFTON, A., BARTOLOME, A., MONTOYA, A., GALVEZ, R., MAYO, P.P., IRWIN, P. *Theileria annae* (syn. *Babesia microti*-like) infection in dogs in NW Spain detected using direct and indirect diagnostic techniques: clinical report of 75 cases. **Parasit Vectors**, v. 8, p. 217, 2015.

MMA. Mata Atlântica., p. <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>, 2020. Acesso em: Acesso em 22 de dezembro de 2019.

MONGRUEL, A.C.B., BENEVENUTE, J.L., IKEDA, P., ANDRÉ, M.R., MACHADO, R.Z., CARRASCO, A.O.T., SEKI, M.C. Detection of *Anaplasma* sp. Phylogenetically related to a. phagocytophilum in a free-living bird in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 26, n. 4, p. 505-510, 2017

MONICA E.B, CARLOS JOSÉ, S. Caracterização dos fragmentos florestais amazônicos remanescentes na microbacia hidrográfica do rio Taxidermista I em Alta Floresta, MT. **Biotemas**, v. 26, n. 4, p. 45-51, 2013.

MCINTOSH, D., BEZERRA, R.A., LUZ, H.R., FACCINI, J.L.H., GAIOTTO, F.A., GINÉ, G.A.F., ALBUQUERQUE, G.R. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. **Brazil. J. Microbiol.**, v. 46, n. 3, p. 879-883, 2015.

NIERI-BASTOS, F.A., MARCILI, A., SOUSA, R., PADDOCK, C.D., LABRUNA, M.B. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* on the New World. **Appl Environ Microbiol**, 84(8), 2018.

NASCIMENTO, K.K.G, VERÍSSIMO, S.M.M., RAIA, V.A., GUIMARÃES R.C.S., SEADE G.C.C., AZEVEDO A.C.P, MATOS S.P., OLIVEIRA J.M, BEZERRA, I.A, MARTINS, T.F. Tick fauna of wild animals received and attended at the Santarém Zoological Park, western Pará State, Brazil. **Ciencia Rural**, 47 (10), 2017.

O'DWYER, L.H., SOARES, C.O., MASSARD, C.L., SOUZA, J.C.P., FLAUSINO, W., FONSECA, A.H. Soroprevalência de *Borrelia burgdorferi* *latu sensu* associada à

presença de carrapatos em cães de áreas rurais do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Ciência Rural**, v. 34, p. 201-205, 2004.

ORD, R.L., LOBO, C.A. Human Babesiosis: Pathogens, Prevalence, Diagnosis and Treatment. **Curr Clin Microbiol Rep**, v. 2, n. 4, p. 173-181, 2015.

OSTFELD, R. BRUNNER, J. Climate change and Ixodes tick- borne diseases of humans. **Philos. Trans. R. Soc. B-Biol. Sci.** 370, 2015.

PACHECO, A., CORDEIRO, M.D., CEPEDA, M.B., LUZ, H.R., CARDOZO, S.V., BERTO, B.P., GUTERRES, A., FONSECA, A.H.. Hemoparasites in ticks of wild birds of Serra dos Órgãos National Park, state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, 2019.

PADDOCK, C.D., SUMNER, J.W., COMER, J.A., ZAKI, S.R., GOLDSMITH, C.S., GODDARD, J., MCLELLAN, S.L.F., TAMMINGA, C.L., OHL, C.A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.** 38, 805–811, 2004.

PAROLA, P., PADDOCK, C.D., SOCOLOVSCHI, C., LABRUNA, M.B., MEDIANNIKOV, O., KERNIF, T., ABDAD, M.Y., STENOS, J., BITAM, I., FOURNIER, P.E., RAOULT, D. Update on Tick- Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 657-702, 2013.

PAROLA, P., SANOGO, O.Y., LERDTHUSNEE, K., ZEAITER, Z., CHAUVANCY, G., GONZALEZ, J.P., MILLER, R.S., TELFORD, I.I.I., S.R. WONGSRICHANALAI, C. RAOULT, D. Identification of *Rickettsia* spp. and *Bartonella* spp. in Fleas from the Thai-Myanmar Border. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, n. 1, p. 173-181, 2003.

PAWEŁCZYK, O., SOLARZ, M.A.K. The molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* and *Rickettsia* spp. in cat and dog fleas collected from companion animals. **Folia Parasitologica**, v. 66, p. 020, 2019.

PÉREZ-MACCHI, S., PEDROZO, R., BITTENCOURT, P., MÜLLER, A. Prevalence, molecular characterization and risk factor analysis of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in domestic dogs from Paraguay. **Comp. Immunol. Microbiol. Infec. Dis.**, v. 62, p. 31-39, 2019.

PÉREZ-OSORIO, C.E., ZAVALA-VELÁZQUEZ, J.E., ARIAS LEÓN, J.J., ZAVALA-CASTRO, J.E. *Rickettsia felis* as emergent global threat for humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1019-1023, 2008.

PECKLEA, M., LUZ, H.R., LABRUNA, M.B., SERPAC, M.C.A., LIMA S., MATURANOD, R., FACCINI, J.L.H., MCINTOSH, D. Multi-locus phylogenetic analysis groups the New World bacterium *Rickettsia* sp. strain ApPR with the Old World species *R. africae*; proposal of “*Candidatus Rickettsia paranaensis*”. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 10, 2019.

QUROLLO, B.A., ARCHER, N.R., SCHREEG, M.E., MARR, H.S., BIRKENHEUER, A.J., HANEY, K.N., THOMAS, B.S., BREITSCHWERDT, E.B. Improved molecular detection of *Babesia* infections in animals using a novel quantitative real-time PCR diagnostic assay targeting mitochondrial DNA. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, p. 128, 2017.

RAIZMAN, E.A., HOLLAND, J.D., SHUKLE, J.T. White-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) as a potential sentinel for human Lyme disease in Indiana. **Zoonoses Public Health**, v. 60, n. 3, p. 227-33, 2013.

RAOULT, D., FOUCAULT, C., BROUQUI, P. Infections in the homeless. **Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 77-84, 2001.

REYDON, B.P. O desmatamento da floresta amazônica: causas e soluções. **AMBIENTAL**, p. 143, 2011.

REZENDE., J.L., ALVES, F.A., BRUNO, F.C.G., MORENO, A.R., FONSECA, I.P.C., A.H. M.D., C OLIVEIRA, C.E. Detection of *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Mato Grosso Do Sul, Brazil. **SM Trop Med Res**, v. 1, n. 1, p. 1003, 2016.

RIOS. L., ALVAREZ, G., BLAIR, S. Serological and parasitological study and report of the first case of human babesiosis in Colombia. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 36, n. 4, p. 493-8, 2003.

RIZZOLI, A., SILAGHI, C., OBIEGALA, A., RUDOLF, I., HUBALEK, Z., FOLDVARI, G., PLANTARD, O., VAYSSIER-TAUSSAT, M., BONNET, S., SPITALSKA, E., KAZIMIROVA, M. *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. **Front Public Health**, v. 2, p. 251, 2014.

RICHTER, J., FOURNIER, P.E., PETRIDOU, J., HÄUSSINGER, D., RAOULT, D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. **Emerg Infect Dis**, 8:207–8, 2002.

SACCHI, A.B.V., DUARTE, JM.B., ANDRÉ, M.R., MACHADO, R.Z. Prevalence and molecular characterization of Anaplasmatataceae agents in free-ranging Brazilian marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 35, n. 4, p. 325-334, 2012.

SAITO, T.B., CUNHA, N.A., PACHECO, R.C., FERREIRA, F., PAPPEN, F.G., FARIAS, N.A.R., LARSSON, C.E., LABRUNA, M.B. Canine infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in southern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 79, n. 1, p. 102-108, 2008.

SAITO, T.B., WALKER, D.H. Ehrlichioses: An Important One Health Opportunity. **Veterinary sciences**, v. 3, n. 3, 2016.

SALLES, R., FONSECA, A., SCOFIELD, A., MADUREIRA, R., YOSHINARI, N. Sorologia para *Borrelia burgdorferi latu sensu* em eqüinos no estado do Rio de Janeiro. **A Hora Veterinária**, v. 22, n. 127, p. 46-49, 2002.

SANTOS, H.A.; THOMÉ, S.M.G, BALDANI, C.D, SILVA, C.B., PEIXOTO, M.P., PIRES, M.S., VITARI, G.L.V., COSTA, R.L., SANTOS, T.M.; ANGELO, I.C; SANTOS, L.A, FACCINI, J.L.H., MASSARD, C.L. Epidemiologia molecular do agente emergente da zoonose *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) em cães e carrapatos ixodídeos no Brasil. **Parasites & Vectors**, 6:348, 2013.

SANTOS, H.A., PIRES, M.S.; VILELA, J.A.R.; SANTOS, T.M.; FACCINI, J.L.H., BALDANI, C.D.; THOMÉ, S.M.G.; SANAVRIA, A.; MASSARD C.L. Detection of *Anaplasma phagocytophilum* in Brazilian dogs by real-time polymerase chain reaction. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 23(4) 770–774, 2011.

SCHNITTGER, L., RODRIGUEZ, A.E., FLORIN-CHRISTENSEN, M., MORRISON, D.A. *Babesia*: A world emerging. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 8, p. 1788-1809, 2012.

SOUSA, K.C.M., CALCHI, A.C., HERRERA, H.M., DUMLER, J.S., BARROS-BATTESTI, D.M., MACHADO, R.Z., ANDRÉ, M.R. Anaplasmatataceae agents among

wild mammals and ectoparasites in Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 145, n. 16, p. 3424-3437, 2017.

SOUSA, K.C.M., FERNANDES, M.P., HERRERA, H.M., FRESCHI, C.R., MACHADO, R.Z., ANDRÉ, M.R. Diversity of piroplasmids among wild and domestic mammals and ectoparasites in Pantanal wetland, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 2, p. 245-253, 2018.

SILVA, A.B., VIZZONI, V.F., COSTA, A.P., COSTA, F.B., MORAES-FILHO, J LABRUNA, M.B., GAZÊTA, G.S., DE MARIA SEABRA NOGUEIRA, R. First report of a *Rickettsia asemonensis* related infecting fleas in Brazil. **Acta Tropica**, v. 172, p. 44-49, 2017.

SILVEIRA, J. A. G., RABELO, E.M.L, LIMA, P.C.S., CHAVES, N.B., RIBEIRO, M.F.B. Post-mortem hemoparasite detection in free-living Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 206-215, 2013a.

SILVEIRA, J.A., RABELO, E.M., LACERDA, A.C., BORGES, P.A., TOMÁS, W.M., PELLEGRIN, A.O., TOMICH, R.G., RIBEIRO, M.F. Molecular detection and identification of hemoparasites in pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) from the Pantanal Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 4, n. 4, p. 341-345, 2013b.

SILVEIRA, J.A., SILVESTRE, B.T., BASTOS, C.V., RIBEIRO, M.F. Isolation and attempted cultivation of an *Anaplasma marginale* strain from Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fisher, 1814) in the tick cell line IDE8. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1102-1108, 2016.

SILVEIRA, J.A.G., RABELO, É.M.L., LIMA, P.C.S., CHAVES, B.N., RIBEIRO, M.F.B. Post-mortem hemoparasite detection in free-living Brazilian brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, p. 206-215, 2014.

SOARES, C., SCOFIELD, A., MANERA, G., ISHIKAWA, M., FONSECA, A., YOSHINARI, N. Ensaio imunoenzimático indireto para detecção de anticorpos homólogos da classe IgG contra *Borrelia burgdorferi latu sensu* em cães. **Revta Bras. Med. Vet**, v. 21, n. 4, p. 153-158, 1999.

- SOCOLOVSCHI, C., MEDIANNIKOV, O., RAOULT, D., PAROLA, P., UPDATE, O.N. Tick-borne bacterial diseases in Europe. **Parasite**, v. 16, n. 4, p. 259-273, 2009.
- SPOLIDORIO, M.G., LABRUNA, M.B., MANTOVANI, E., BRANDÃO, P.E., RICHTZENHAIN, L.J., YOSHINARI, N.H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521, 2010.
- SPOLIDORIO, M.G., MINERVINO, A.H.H., VALADAS, S.Y.O.B, SOARES, H.S., NEVES, K.A.L., LABRUNA, M.B., RIBEIRO, M.F.B., GENNARI, S.M. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 214-219, 2013.
- STEERE, A.C., COBURN, J., GLICKSTEIN, L. The emergence of Lyme disease. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n.8., p. 1093-1101, 2004.
- SZABÓ, M., NIERI-BASTOS, F., SPOLIDORIO, M., MARTINS, T., BARBIERI, A., LABRUNA, M. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 06, p. 719-728, 2013a.
- SZABÓ, M.P.J., PINTER, A., LABRUNA, M.B.. Ecology, biology and distribution of spotted- fever tick vectors in Brazil. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 4, 2013b.
- TATE, C.M., HOWERTH, E.W., MEAD, D.G., DUGAN, V.G., LUTTRELL, M.P., SAHORA, A.I., MUNDERLOH, U.G., DAVIDSON, W.R., YABSLEY, M.J. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1-2, p. 110-119, 2013.
- TAYLOR, M.A.L., CR R.L., W. **Taxonomia e morfologia parasitária. In: Parasitologia Veterinária**. 3^a. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.
- TORINA, A., BLANDA, V., ANTOCI, F., SCIMECA, S., D'AGOSTINO, R., SCARIANO, E., PIAZZA, A., GALLUZZO, P., GIUDICE, E., CARACAPPA, S. A molecular survey of *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., *Ehrlichia canis* and *Babesia microti* in foxes and fleas from Sicily. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 60, p. 125-130, 2013.
- TOLEDO, V.F., ACOSTA, I.C.L., MARTINS, T.F., MORAES, F.J.S., KRAWCZAK, F., BARBIERI, A.R.M., EGERT, L., FERNANDES, D.R., BRAGA, F.R., LABRUNA,

M.B. Tick-borne infections in dogs and horses in the state of Espírito Santo, Southeast Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 249, p. 43-48, 2018.

UILENBERG, G. Babesia: A historical overview. **Vet Parasitol**, v. 138, n. 1-2, p. 3-10, 5/31/ 2006.

VANNIER, E., KRAUSE, P.J. Human babesiosis. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 25, p. 2397-407, 2012.

VIEIRA, R.F.C., BIONDO, A.W., GUIMARÃES, A.M.S., SANTOS, A.P., SANTOS, R.P., DUTRA, L.H., DINIZ, P.P.V.P. MORAIS, H.A., MESSICK, J.B., LABRUNA, M.B. Ehrlichiosis in Brazil. **Rev. Brasil. Parasitol. Vet.**, v. 20, n. 1, p. 01-12, 2011.

WEINERT, L.A., WERREN, J.H., AEBI, A., STONE, G.N., JIGGINS, FM. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC BIOLOGY**, v. 7, n. 1, p. 1, 2009.

WERREN, J.H., BALDO, L., CLARK, M.E. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 10, p. 741-751, 2008.

WIDMER, C.E., AZEVEDO, F.C., ALMEIDA, AP FERREIRA, F LABRUNA, MB. Tick-borne bacteria in free-living jaguars (*Panthera onca*) in Pantanal, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 8, p. 1001-1005, 2011.

WOLF RW ARAGONA, M MUÑOZ-LEAL, S PINTO, LB MELO, ALT BRAGA, IA DOS SANTOS COSTA, J MARTINS, TF MARCILI, A DE CAMPOS PACHECO, R LABRUNA, MB AGUIAR, DM. Novel Babesia and Hepatozoon agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 449-456, 2016.

YABSLEY MJ SHOCK, BC. Natural history of Zoonotic Babesia: Role of wildlife reservoirs. **Int J Parasitol Parasites Wildl**, v. 2, p. 18-31, 2013.

YOSHINARI NH. Uma longa jornada para entender a *Borrelia burgdorferi* no Brasil. v. 49, n. 5, p. 483-486, 2009.

YPARRAGUIRRE, L.A., MACHADO-FERREIRA, E., ULLMANN, A.J., PIESMAN, J., ZEIDNER, N.S., SOARES, C.A.G. A hard tick relapsing fever group spirochete in a Brazilian *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vector-Borne Zoonotic Dis**, v. 7, n. 4, p. 717-721, 2007.

ZAVALA-VELAZQUEZ, J.E., RUIZ-SOSA, J.A., SANCHEZ-ELIAS, R.A., BECERRA-CARMONA, G., WALKER, D.H. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan. **Lancet**, v. 356, n. 9235, p. 1079-80, 2000.

World Wide Fund for Nature (WWF). Disponível em:<https://www.wwf.org.br/natureza_brasileira/questoes_ambientais/biomas> Acesso em: 04 de junho de 2020.