

UFRRJ

**INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

**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**

Ísis Daniele Alves Costa Santolin

2014



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

**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**

ÍISIS DANIELE ALVES COSTA SANTOLIN

Sob a Orientação do Professor
Douglas McIntosh

e Co-orientação da Professora
Kátia Maria Famadas

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Animal.

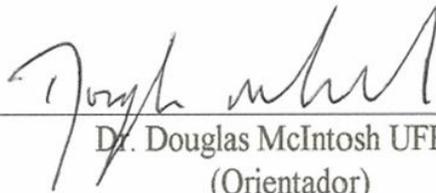
Seropédica, RJ
Setembro de 2014

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

ÍISIS DANIELE ALVES COSTA SANTOLIN

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**,
no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias área de Concentração em
Parasitologia Veterinária

TESE APROVADA EM 22/09/2014



Dr. Douglas McIntosh UFRRJ
(Orientador)



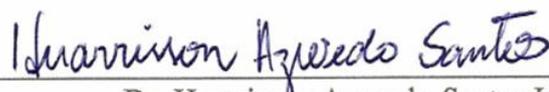
Dra. Maria Halina Ogrzewalska SUCEN



Dr. Matias Pablo Juan Szabó UFU



Dr. José Luis Luque UFRRJ



Dr. Huarrisson Azevedo Santos UFRRJ

636.50896

S237e

Santolin, Ísis Daniele Alves Costa,
1985-

T

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/
Ísis Daniele Alves Costa Santolin. - 2014.

143 f.: il.

Orientador: Douglas McIntosh.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 101-118.

1. Aves - Parasito - Teses. 2. Relação hospedeiro-parasito - Teses. 3. Carrapato - Identificação - Rio de Janeiro (Estado) - Teses. 4. Genética molecular - Teses. 5. *Rickettsia* - Teses. I. McIntosh, Douglas, 1964- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

Dedico esse trabalho à minha família e ao meu marido Alexandre. Obrigada por acreditarem em mim quando eu achei difícil acreditar em mim mesma.

“A mente que se abre a uma idéia, jamais
voltará ao seu tamanho original”
Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por mostrar-me que era muito mais forte e corajosa do que imaginava ser e por me fazer descobrir em muitos momentos, que a fé é a solução para muitos problemas humanamente insolúveis.

Agradeço a professor Douglas McIntosh pela oportunidade e dedicação que permitiram a conclusão deste trabalho.

À professora Kátia Maria Famadas pela amizade e conselhos.

Aos bolsistas do Laboratório de Biologia de Ixodídeos, Iwine Joyce Barbosa de Sá Húngaro, Michele da Costa Pinheiro por toda ajuda oferecida.

Aos colegas Gabriel Landulfo, Hermes Ribeiro Luz pela ajuda nas capturas das aves.

Aos queridos estagiários Camila Mathias, Bruna Barboza e Ramiro Melinski pelo auxílio nas capturas das aves e no processamento dos dados.

Ao Ivan que teve toda paciência e boa vontade em se disponibilizar, mesmo nos domingos, nos transportando, com alegria, ao local de coleta.

Às minhas queridas amigas Isabela Leite pela grande ajuda neste trabalho, mas principalmente pela imensa amizade que dedicou a mim, pondo honestidade e boas risadas em nossa convivência e Bruna Baêta pelos momentos que dividimos, pela confiança que construímos, pelos pensamentos que trocamos e por todo carinho que dedicou à nossa amizade.

Ao meu pai, Ednaldo, a quem devo tudo que sou e tudo que espero ser. Por seu amor, confiança e apoio, sempre feliz com minhas conquistas.

À minha mãe, Josélia, que com sua ternura sempre esteve ao meu lado confiando em meus passos.

Ao meu marido, Alexandre, pelo incondicional amor, dedicação e infinita compreensão com quem divido os melhores e maiores momentos da minha vida.

À minha querida irmã, Elis, pela amizade e companheirismo diários me ouvindo sempre que precisava.

À minha tia, Joélia, pelo incentivo, amor e plena confiança.

Aos meus amigos do curso de Ciências Biológicas Jocelino, Gisele, Gabriel e Luana com os quais comecei essa longa e especial jornada que se fizeram presentes mesmo quando ausentes.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

BIOGRAFIA

Ísis Daniele Alves Costa Santolin, filha de Ednaldo Vieira Costa e Josélia de Jesus Alves, nasceu em 03 de junho de 1985, na cidade de Cabo Frio, estado do Rio de Janeiro.

Concluiu o ensino fundamental no Colégio Apogeu Grupo de Ensino em 1999 e o ensino médio no Colégio Santa Rosa, concluído em dezembro de 2002, ambos localizados na cidade de Cabo Frio, Rio de Janeiro.

No ano de 2004, ingressou no curso de Ciências Biológicas da UFRRJ, colando grau e obtendo o título de Licenciada em Ciências Biológicas e Bacharel em Biologia Animal em agosto de 2008.

Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, participando de projetos de pesquisa no Departamento de Biologia Animal da UFRRJ, realizando publicações científicas e participando de em congressos e eventos científicos nacionais e internacionais.

Foi professora da disciplina de Parasitologia e Microbiologia do Curso Técnico de Enfermagem no Colégio Brigadeiro Newton Braga e ministrou diversas palestras na área de Parasitologia em encontros científicos.

Em março de 2009, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Parasitologia Animal, em nível de Mestrado, da UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES e obteve o título de Mestre em Ciências em fevereiro de 2011.

Em março de 2011, ingressou no doutorado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Parasitologia Animal, em nível de Doutorado, da UFRRJ, onde foi bolsista da CAPES até o presente momento.

Nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

RESUMO GERAL

COSTA-SANTOLIN, Ísis Daniele Alves. **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** 2014. 143p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Carrapatos parasitos de aves silvestres podem servir como vetores de agentes patogênicos de grande importância para a saúde silvestre e coletiva. Assim, o presente estudo analisou a prevalência e intensidade de infestação de carrapatos em aves silvestres capturadas em três regiões de Mata Atlântica, com diferentes níveis de antropização, situada em Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, Brasil, com o objetivo de avaliar a relação entre a prevalência de infestação e áreas preservadas na região. As capturas foram realizadas no período de maio de 2011 a abril de 2012 onde foram capturadas 625 aves representadas por 98 espécies divididas em 26 famílias e sete ordens, totalizando 14,2% da riqueza das espécies de aves do estado. O total de 17,44% (n=109; 109/625) das aves capturadas estavam parasitadas por 458 carrapatos, sendo 88,2% (n=404; 404/458) no estágio de larva (LL) e 11,8% (n=54; 54/458) no estágio de ninfa. Dentre os ixodídeos coletados, 99% (n=453) eram do gênero *Amblyomma*: *Amblyomma longirostre* (LL= 345; NN= 34), *Amblyomma nodosum* (NN= 13), *Amblyomma calcaratum* (NN= 3), *Amblyomma varium* (NN= 2); *Amblyomma coelebs* (NN=1), *Amblyomma naponense* (LL= 1), *Amblyomma ovale* (LL=1) e *Amblyomma* sp. (LL= 53). O gênero *Haemaphysalis* sp. foi representado por quatro larvas e uma única ninfa, correspondendo a 1% dos carrapatos coletados. Além disso, foram relatadas novas espécies de aves hospedeiras no Brasil, o caso inédito de superinfestação por *A. longirostre* em *Xiphorhynchus guttatus*. Análises moleculares (sequenciamento do gene mitocondrial 16S DNAr), permitiram a validação da identificação morfológica ao nível de espécie de larvas de *A. longirostre* sem a necessidade de aplicação de métodos de clarificação comumente utilizados. A detecção e identificação de agentes patogênicos e de seus hospedeiros carrapatos dependem cada vez mais de métodos moleculares, que tem por princípio a extração do DNA do carrapato e do microrganismo abrigado por ele. Na tentativa de standardização da extração do DNA de ixodídeos e de sua microbiota associada, o presente estudo comparou seis métodos de extração de DNA (Fervura em água estéril, InstaGene®, QIAamp® DNA Mini Kit, Fenol:clorofórmio, Terra de diatomácea e Hotshot modificado). Até o momento, amostras submetidas à extração com Kit e Fenol:clorofórmio apresentam melhores resultados (em termos de quantidade e qualidade do DNA extraído) quando comparado aos outros métodos. Análise *in silico* de sequências que codificam os genes *gltA*, *htrA* e *ompB* de carrapatos associados à espécies de rickettsias revelaram ser a base para um novo método de PCR-RFLP, que permitiu a identificação diferencial de espécies de *Rickettsia* encontradas no Brasil. O método foi avaliado utilizando larvas e ninfas de *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma varium* coletadas nas aves capturadas neste estudo. A bactéria “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” foi identificada em 100% (17/17) dos *A. longirostre* examinados, enquanto que as outras duas espécies de carrapatos foram universalmente PCR negativas. O método básico emprega as endonucleases de restrição *MspI* e *RsaI* e pode ser realizada no decurso de um único dia de trabalho. Este oferece um meio conveniente e rentável para executar a análise em grande escala de populações de carrapatos, e deve ser um benefício para os pesquisadores que não dispõem de recursos financeiros ou técnicos necessários para a identificação baseada no sequenciamento de nucleotídeos. Em

conclusão, este estudo amplia o conhecimento das relações ecológicas entre ixodídeos e a avifauna em um importante bioma da região Neotropical, com novas perspectivas no âmbito das técnicas moleculares aplicadas a inquéritos de parasitismo que envolve carrapatos parasitos de aves silvestres.

Palavras-chave: Aves silvestres, Carrapato, Método de extração de DNA, RFLP, *Rickettsia*.

GENERAL ABSTRACT

COSTA-SANTOLIN, Ísis Daniele Alves. **Study of ticks associated with birds in the vicinity of Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brazil; detecting *Rickettsia* spp., and the development of methods for the analysis of molecular interactions tick-microorganism.** [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]. 2014. 143p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Ticks parasites of wild birds may serve as vectors of pathogens of major importance for wildlife and public health. Thus, the present study examined the prevalence and intensity of infestation of ticks captured from wild birds in three regions of the Atlantic Forest, with different levels of human impact, located in Nova Iguaçu, State of Rio de Janeiro, Brazil, with the objective of highlighting the possible relationship between prevalence of infestation and preservation of forest areas in the region. Collections were conducted from May 2011 to April 2012, resulting in the capture of 625 birds represented by 98 species divided into 26 families and seven orders, which equated to 14.2% of the richness of bird species in the state. A total of 17.44% (n= 109, 109/625) of the captured birds were parasitized by 458 ticks, of which 88.2% (n = 404, 404/458) were in the larval stage (LL) and 11.8% (n= 54, 54/458) in the nymphal stage. Among the ticks collected, 99% (n = 453) were represented by the genus *Amblyomma*: *Amblyomma longirostre* (LL = 345; NN = 34), *Amblyomma nodosum* (NN = 13), *Amblyomma calcaratum* (NN = 3), *Amblyomma varium* (NN = 2); *Amblyomma coelebs* (NN = 1), *Amblyomma naponense* (LL = 1), *Amblyomma ovale* (LL = 1) and *Amblyomma* sp. (LL = 53). The genus *Haemaphysalis* was represented by four larvae and a single nymph, corresponding to 1% of the ticks collected. In addition, new species of host birds were reported in Brazil, along with an unprecedented case of super infestation with larvae of *A. longirostre* on *Xiphorhynchus guttatus*. Molecular analysis (sequencing of mitochondrial 16S rDNA), provided validation of morphological identification of larvae of *A. longirostre* at the species level without to need to apply methods of clarification commonly used. The detection and identification of pathogens and their tick hosts are increasingly dependent upon molecular biological methods, which have as their first step the extraction of DNA from the tick and the microorganisms contained therein. In an attempt to standardize the extraction of DNA from ticks and their associated microbiota, the present study compared six methods of DNA extraction (Boiling in sterile water, InstaGene®, QIAamp® DNA Mini Kit, Phenol:chloroform, Diatomaceous earth and modified Hotshot). To date, samples subjected to extraction with the kit and Phenol:chloroform have demonstrated superior results (in terms of quantity and quantity of extracted DNA), when compared to the other methods. *In silico* analysis of sequences encoding the *gltA*, *htrA* and *ompB* genes of tick associated rickettsial species provided the basis for a novel PCR-RFLP method which allowed differential identification of the *Rickettsia* species reported in Brazil. The method was evaluated using larvae and nymphs of *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma ovale* and *Amblyomma varium* collected from birds captured in this study. The bacterium "*Candidatus Rickettsia amblyommii*" was identified in 100% (17/17) of *A. longirostre* larvae examined, while the other two species of ticks were universally PCR negative. The basic method employs the restriction endonucleases *MspI* and *RsaI*, can be performed during a single working day. It offers a convenient and cost effective means to perform large scale analysis of tick populations, and should be of benefit to researchers who lack the financial or technical

resources necessary for nucleotide sequence based identification. In conclusion, this study expands the understanding of the ecological relationships between ticks and birds in a major biome of the Neotropics, with new perspectives in the context of molecular techniques applied to investigations of parasitism involving tick parasites of wild birds.

Keywords: wild birds, tick, DNA extraction method, RFLP, *Rickettsia*.

LISTA DE TABELAS

Capítulo I - Carrapatos parasitos de aves silvestres de três regiões de mata atlântica com diferentes níveis de antropização em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil

Tabela 1. Iniciadores, mistura para pcr e condições do ciclo da pcr utilizado para amplificação do 16S DNAr mitocondrial..... 25

Tabela 2. Carrapatos coletados em aves da família Dendrocolaptidae capturadas em Nova Iguaçu- RJ. 30

Tabela 3. Espécies de carrapatos parasitando aves silvestres capturadas na mata atlântica do Rio de Janeiro, Brasil. Período de maio de 2011 a abril de 2012. 32

Tabela 4. Abundância e prevalência das espécies de carrapatos coletadas em aves silvestres capturadas na mata atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. Período de maio de 2011 a abril de 2012. 35

Tabela 5. Relação de aves silvestres capturadas e não parasitadas em região de mata atlântica do Rio de Janeiro no período de maio de 2011 a abril de 2012. 38

Tabela 6. Comparação do parasitismo de aves silvestres capturadas em três áreas de estudo situadas na mata atlântica do estado do Rio de Janeiro. O teste de qui-quadrado utilizado para comparação das prevalências e kruskall-wallis para intensidade média de parasitismo (IMP) a 5% de significância. 41

Capítulo II - Detecção e identificação de *Rickettsia* spp. Por PCR-Polimorfismo de fragmentos de restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism” (PCR-RFLP) em carrapatos coletados de aves da família Dendrocolaptidae

Tabela7. Iniciadores, mistura para pcr e condições do ciclo da pcr utilizado para amplificação do dna de espécies de *Rickettsia*. 61

Tabela 8. Tamanhos dos fragmentos de PCR-RFLP previstos para a digestão com endonucleases de restrição gerados de 407 pares de bases do fragmento amplificado do gene htra e por um fragmento amplificado de 856 pares de bases do gene *ompb*..... 66

Capítulo III - Análise de métodos de extração de dna de microrganismos presentes em ixodídeos

Tabela 9. Iniciadores, mistura para pcr e condições do ciclo da pcr utilizado para amplificação do 16S DNAr procariota..... 90

Tabela 10. Avaliação da intensidade de amplificação dos seis protocolos de extração de dna utilizando os pares de iniciadores 515F-806R para 16s rnar procariota em ninfas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	91
Tabela 11. Avaliação da intensidade de amplificação dos seis protocolos de extração de dna utilizando os pares de iniciadores 357F-806R para 16S RNAr procariota em ninfas de <i>Rhipicephalus microplus</i>	92
Tabela 12. Avaliação da intensidade de amplificação dos três protocolos de extração de dna (instagene, kit, fenol:clorofórmio) utilizando os pares de iniciadores para 16s dnar mitocondrial para larvas e ninfas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Amblyomma parvum</i>	93
Tabela 13. Avaliação da intensidade de amplificação dos três protocolos de extração de dna (instagene, kit, fenol:clorofórmio) utilizando o par de iniciadores para 16s rnar procariota 357F-806R para larvas e ninfas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Amblyomma parvum</i>	94
Tabela 14. Avaliação da intensidade de amplificação dos três protocolos de extração de dna (instagene, kit, fenol:clorofórmio) utilizando o par de iniciador para 16s rnar procariota 515f-806r para larvas e ninfas de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Amblyomma parvum</i>	95
Tabela 15. Avaliação da intensidade de amplificação dos protocolos de extração de dna que utilizam kit e fenol:clorofórmio utilizando os pares de iniciadores para 16s dnar mitocondrial e 16s rnar procariota (357F-806Re 515F-806R) para larvas de <i>Amblyomma longirostre</i> (1 a 8) coletadas em aves silvestres da família Dendrocolaptidae.....	96

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I - Carrapatos parasitos de aves silvestres de três regiões de Mata Atlântica com diferentes níveis de antropização em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil

Figura 1. Área da indústria (p01) de coleta. A: foto do ponto de coleta 01. Mudanças do entorno da mata ciliar com cerca de 1 ano e seis meses de plantio. Ao fundo parte das obras devido à implantação da fábrica no decorrer do período de capturas. B: imagem de satélite do ponto de coleta 01 (p01). Marcador laranja mostra o ponto de captura. Próximo a ele pode-se ver as obras provenientes da implantação da fábrica. Fonte: GoogleEarth..... 13

Figura 2. Mapa indicativo da abrangência da reserva da biosfera da mata atlântica – RBMA onde está inserida a reserva biológica do tinguá no estado do Rio de Janeiro, local escolhido como ponto 02 de captura das aves silvestres. Fonte: plano de manejo Rebio-Tinguá, 2006. 15

Figura 3. Ponto 02 de captura dentro da Rebio-Tinguá. A: trilha onde as redes de neblina eram armadas, demonstrada em C. B: córrego afluente do rio tinguá próximo ao local de captura. 16

Figura 4. A: foto do ponto de coleta p03 situado na região agrícola. B: imagem de satélite do ponto de captura p03 indicado com o ícone laranja. Fonte GoogleEarth..... 17

Figura 5. Mapas indicativos da localização dos pontos de captura demonstrando a distância entre eles e a ausência de barreira geográfica que impedia o deslocamento voluntário das aves silvestres encontradas no local. 18

Figura 6. Ave capturada com rede-de-neblina sendo removida cuidadosamente de modo a minimizar qualquer estresse sofrido pelo espécime capturado. A: *Sporophila caerulea*. B: *Ramphodon naevius*..... 19

Figura 7. A: tubo contendo rna later utilizado para o armazenamento dos carrapatos coletados em campo nas aves silvestres. B: cada carrapato coletado armazenado individualmente em tubos de tampa com rosca, acondicionados em caixas próprias para o transporte da ave capturada da rede-de-neblina até o local de inspeção do possível parasitismo. C: saco de algodão utilizado para o acondicionamento da ave capturada até o momento de sua análise..... 20

Figura 8. Marcação feita nas aves. A: corte da segunda rêmige primária feita nas aves capturadas. Ave fêmea de *Geothlypis aequinoctialis*. B: esquema mostrando a

nomenclatura utilizada para diferenciação das penas que recobrem a asa de uma ave. Setas vermelhas indicam a segunda rêmige primária. Fonte da figura 8 b: imagem de José Claro da Fonseca Neto obtida em <http://www.cem.ufpr.br/litoralnotacem/guia/guiaaves.htm> acesso em março de 2014. 21

Figura 9. Número de aves pertencentes às famílias da ordem passeriformes capturadas no período de maio de 2011 a abril de 2012 em região de mata atlântica do estado do rio de janeiro. 27

Figura 10. *Xiphorhynchus guttatus* (Passeriformes: Dendrocolaptidae) capturada na área da rebio-tinguá, região de mata atlântica situada no estado do rio de janeiro. Ave encontrada parasitada por 99 carrapatos onde alguns desses estão demonstrados pela seta branca. 31

Figura 11. Larvas de *Amblyomma longirostre*. Superfície dorsal do idiossoma. A e b: espécimes clarificados com ácido láctico. Setas pretas mostram os dois “sensillum” campaniformes dorsais (scd1, scd2). C e d: larvas não tratadas observadas em microscópio estereoscópico. As setas brancas mostram os dois “sensillum” campaniformes dorsais. Scd1 em c e scd2 em d. Abreviações: gn, gnatossoma; an, ânus; sc, escudo; scd, “sensillum” campaniformes dorsais (1 e 2); fs, primeiro festão. Barra de escala: a, b = 0,05 mm; c, d = 0,2 mm. 36

Figura 12. Distribuição dos carrapatos coletados ao longo do ano de captura para larvas (a) e ninfas (b) de *Amblyomma longirostre* parasitando aves silvestres em região de mata atlântica do estado do rio de janeiro. Os carrapatos foram coletados no período de um ano, tendo início em maio de 2011 até abril de 2012. 37

Capítulo II- detecção e identificação de *Rickettsia* spp. Por PCR-polimorfismo de fragmentos de restrição/“restriction fragment length polymorphism” (PCR-RFLP) em carrapatos coletados de aves da família dendrocolaptidae

Figura 13. Gel de agarose (2%) corado em brometo de etídeo. Análise dos padrões de bandas de pcr-rflp produzidos por digestão do amplicon *ompb* gerado pelas endonucleases *Mspi* e *rsai* de quatro larvas de *Amblyomma longirostre* utilizando o par de iniciadores 120-m59 e 120-807. Colunas 1, 2, 3 e 4 = padrões de amostras obtidos através do dna de carrapatos de aves silvestres; coluna 5 = “*Candidatus rickettsia amblyommii*” (cepa Aranha), coluna 6 = *Rickettsia felis*, coluna 7 = *Rickettsia parkeri* (cepa NOD) digeridos com a endonuclease de restrição *Mspi*. Coluna M = marcador de tamanho de DNA (Thermo Scientific Generuler; 50 bp DNA ladder). Colunas 8, 9, 10 e 11 = padrões de amostras obtidos através do DNA de carrapatos de aves silvestres, coluna 12 = “*Candidatus rickettsia amblyommii*” (cepa Aranha), coluna 13 = *Rickettsia*

felis, coluna 14 = *Rickettsia parkeri* (cepa NOD), digeridos com a endonuclease de restrição *RsaI*. Tamanhos da banda são indicados em pares de bases (pb). 68

Capítulo III - Análise de métodos de extração de dna de microrganismos presentes em ixodídeos

Figura 14. Resina quelante - ácido iminodiacético (Garg et al. 1999). 80

Figura 15. O silicone fornece um meio universal para a imobilização de moléculas de ácido nucléico. Na presença de água e sais caotrópicos as moléculas interagem ionicamente com íons de sódio e os grupos fosfato do ácido nucléico. Após a ligação, os contaminantes podem ser removidos por lavagem e centrifugação. 82

Figura 16. Gel de agarose (1,5%) corado em brometo de etídeo. Análise representativa das bandas visualizadas nas colunas 1, 2 e 3 classificadas como +++: bandas com intensidade alta (12 ng) coluna 1; ++: bandas com intensidade média (5 ng) coluna 2; +: bandas com intensidade fraca (1 ng) coluna 3. 88

Figura 17. Gel de agarose (1,5%) corado em brometo de etídeo. Análise representativa da tabela 10 dos padrões de bandas de pcr produzidos amplificação do amplicon 16S RNAr procariota gerado por ninfas de *Rhipicephalus microplus* extraídas com seis protocolos. As tríades entre parênteses representam cada amostra utilizada para a pcr onde se encontram amostras sem diluição (A) e diluídas serialmente 10 vezes (B) e diluídas 100 vezes (C) de cada protocolo de extração sendo 1-fervura em água estéril; 2- instagene; 3- kit qiagen; 4- fenol:clorofórmio; 5- mud e 6- hotshot modificado utilizando o par de iniciadores 515F-806R. A intensidade das bandas revela a eficiência dos protocolos onde +++ são bandas com intensidade alta (12 ng); ++ bandas com intensidade média (5 ng) e + bandas com intensidade fraca (1 ng). Protocolo 1: amostras a, b e c negativas. Protocolo 2: amostras a +++, b ++ e c +. Protocolo 3: a +++, b ++ e c ++. Protocolo 4: a +++, b +++ e c ++. Protocolo 5: a ++, b + e c negativo. Protocolo 6: a ++, b + e c negativo. Coluna m = marcador de tamanho de DNA (Thermo Scientific Generuler; 100 bp dna ladder). 92

LISTAS DE ABREVIÇÕES

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

16S DNAr – 16S (S- Svedberg) dos ribossomas mitocondriais

RNA – Ácido Ribonucleico

16S RNAr - 16S (S- Svedberg) do RNA ribossômico é um componente da pequena subunidade 30S dos ribossomas procariontes

pb – pares de bases

ng – Categoria de unidade de medição de massa. Nanograma ($1\text{ng}=0,000000001\text{g}$ ou $1,0\times 10^{-9}$ grama [g])

pg – Categoria de unidade de medição de massa. Picograma ($1\text{pg}= 0,0000000000001\text{g}$ ou $1,0\times 10^{-12}$ grama [g])

μL – Categoria de unidade de medição de volume. Microlitro ($1\mu\text{L}= 0,0000001$ ou 10^{-6} litro [L])

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

PCR–RFLP – Reação em cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Fragmentos de Restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism”

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL.....	1
CAPÍTULO I: CARRAPATOS PARASITOS DE AVES SILVESTRES DE TRÊS REGIÕES DE MATA ATLÂNTICA COM DIFERENTES NÍVEIS DE ANTROPIZAÇÃO EM NOVA IGUAÇU, RIO DE JANEIRO, BRASIL.....	3
RESUMO	4
ABSTRACT	5
1 INTRODUÇÃO.....	6
1.1 Carrapatos	6
1.2 Carrapatos parasitos de aves silvestres	8
2 MATERIAIS E MÉTODOS	12
2.1 Áreas de estudo	12
2.2 Captura das aves silvestres	18
2.3 Coleta dos Carrapatos	22
2.4 Identificação molecular de carrapatos	23
2.5 Sequenciamento.....	23
2.6 Análise dos Dados	26
3 RESULTADOS	27
3.1 Aves Capturadas	27
3.2 Carrapatos Coletados em Aves Silvestres	29
4 DISCUSSÃO	42
CAPÍTULO II: DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RICKETTSIA SPP. POR PCR-POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO/ “RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM” (PCR-RFLP) EM CARRAPATOS COLETADOS DE AVES DA FAMÍLIA DENDROCOLAPTIDAE.....	53

RESUMO	54
ABSTRACT	55
1 INTRODUÇÃO.....	56
2 MATERIAL E MÉTODOS	59
2.1 Amostras de Carrapatos Coletados da Família Dendrocolaptidae	59
2.1.1 PCR diagnóstico para o gênero <i>Rickettsia</i>	59
2.1.2 Análise <i>in silico</i> de digestão com endonucleases de restrição para identificação diferencial das espécies de <i>Rickettsia</i>	63
2.1.3 PCR- Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism” – (PCR- RFLP)	63
2.2 Sequenciamento do DNA.....	64
3 RESULTADOS	65
4 DISCUSSÃO	69
CAPÍTULO III: ANÁLISE DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE MICRORGANISMOS PRESENTES EM IXODÍDEOS	72
RESUMO	73
ABSTRACT	74
1.1 Técnicas de Extração de DNA Genômico	75
1.2 Métodos Baseados na Não Afinidade	77
1.2.1 Extração com fenol:clorofórmio (método orgânico).....	77
1.2.2 “Salting-out”	78
1.2.3 Fase de precipitação/purificação do DNA.....	79
1.2.4 Fervura em resina quelante InstaGene Matrix® (BioRad)	79
1.2.5.Extração à base de Fervura em Água Estéril	81
1.3 Métodos de Afinidade	81

1.3.1 Extração à base de sílica.....	81
1.4 Utilização do 16S DNAr	82
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1 Extração do DNA dos Carrapatos.....	84
2.1.1 Aquisição dos carrapatos utilizados na padronização da extração de DNA.....	84
2.2 Protocolos de Extração	84
2.2.1 Protocolo 1: Fervura em água estéril	84
2.2.2 Protocolo 2: Extração à base da resina “Chelex®-100” – InstaGene® Matrix (BioRad)	85
2.2.3 Protocolo 3: Extração com kit QIAamp® DNA Mini Kit	85
2.2.4 Protocolo 4: Fenol:clorofórmio	85
2.2.5 Protocolo 5: Terra de Diatomácea (MUD)	86
2.2.6 Protocolo 6: HotShot Modificado	87
2.3 Reação em Cadeia da Polimerase “Polymerase Chain Reaction” (PCR)	88
2.3.1 PCR para 16S DNAr mitocondrial de ixodídeos	88
2.3.2 PCR 16S DNAr procariota.....	88
3 RESULTADOS	91
3.1 Padronização do Protocolo de Extração de DNA de Ixodídeos	91
4 DISCUSSÃO	97
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXO I AUTORIZAÇÃO PARA ATIVIDADES CIENTÍFICAS – SISBIO	119
ANEXO II	122

COSTA-SANTOLIN I DA; FAMADAS K M; MCINTOSH D. DETECTION AND IDENTIFICATION OF RICKETTSIA AGENTS IN TICKS COLLECTED FROM WILD BIRDS IN BRAZIL BY POLYMERASE CHAIN REACTION-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (PCR-RFLP) ANALYSIS. REVISTA BRASILEIRA DE MEDICINA VETERINÁRIA, V. 35 (SUPL.2), P. 68-73, 2013..... 122

1 INTRODUÇÃO GERAL

Com uma avifauna de 1901 espécies, o Brasil é um dos países mais ricos em espécies de aves no mundo, junto de Colômbia e Peru (CBRO, 2014). Dentre os sete biomas terrestres existentes no território brasileiro, o bioma da Mata Atlântica com apenas 12,5% de remanescentes florestais de sua extensão original, abriga 891 espécies de aves, representando 45% de todas as espécies encontradas em terras nacionais sendo, destas, 213 espécies ou, 24% de espécies de aves endêmicas (LIMA, 2014). Considerada um “Hotspot” mundial, ou seja, uma das áreas mais ricas em biodiversidade e mais ameaçadas do planeta, foi decretada Reserva da Biosfera pela Unesco e Patrimônio Nacional, na Constituição Federal de 1988 (www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/#.dpuf).

Estudos envolvendo o parasitismo por carrapatos em aves silvestres tem despertado grande interesse para saúde animal e pública, principalmente pela possibilidade de dispersão que estes hospedeiros oferecem e pelo fato das regiões de Mata Atlântica abrigarem 62% da população brasileira. Para aves da Mata Atlântica são registrados três gêneros de carrapatos, *Ixodes*, *Haemaphysalis* e *Amblyomma* reunindo neste último o maior número de espécies. Entre as espécies encontradas estão *A. longirostre*, *A. parkeri*, *A. nodosum*, *A. aureolatum*, *A. cajennense*, *A. ovale*, *A. coelebs*, *A. naponense*, *A. calcaratum*, *A. oblongoguttatum*, *A. parvum*, *I. fuscipes*, *I. auritulus*, *I. paranaensis*, *H. leporispalustris*, *H. juxtakochi*.

No Brasil as investigações de microrganismos com possível ação patogênica têm sido cada vez mais frequentes em carrapatos coletados de animais silvestres. Neste contexto, investigar a diversidade de carrapatos que parasitam aves silvestres da Mata Atlântica, além de acrescentar informações a respeito das relações ecológicas existentes, reforça a importância da avifauna no ciclo destes ectoparasitos e de microrganismos carreados por eles em um importante bioma da região Neotropical. Além disso, fornece subsídios para o desenvolvimento de pesquisas epidemiológicas quanto às possíveis doenças que podem emergir e/ou reemergir através da transmissão de patógenos carreados por estes ixodídeos. Para tal, a classificação específica tanto do vetor quanto do patógeno são os passos primordiais em estudos de parasitismo que envolve carrapatos, sendo uma problemática no Brasil já que não existem chaves de identificação morfológica para larvas de ixodídeos, principal fase encontrada parasitando aves silvestres. Avanços significativos na compreensão da biologia, ecologia e epidemiologia dos microrganismos associados a carrapatos depende do desempenho de levantamentos em grande escala de populações de carrapatos utilizando a detecção molecular e métodos de identificação. Assim, técnicas moleculares são cada vez mais utilizadas no diagnóstico de larvas de carrapatos e agentes patogênicos que utilizam estes artrópodes como vetores. Contudo, a identificação molecular de carrapatos e a detecção de microrganismos presentes nestes, exige a extração do DNA como uma importante etapa que muitas vezes se torna problemática pela ausência de padronização. A extração do DNA do carrapato enfrenta limitações como a presença de exoesqueleto quitinoso rígido, suscetibilidade à degradação com o decorrer de tempo da amostra extraída e presença possíveis inibidores que dificultam o alcance do material genético. Além disso, o método utilizado para a extração do DNA de carrapatos nem sempre é o método mais eficaz para a extração dos baixos níveis de DNA dos patógenos abrigados pelo ixodídeo que comumente estão juntos ao DNA vindo do sangue do hospedeiro. Estes fatores podem desempenhar um papel na diminuição da eficiência de amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase que também podem influir sobre as taxas de infecção de patógenos relatada nos estudos existentes. Associado a isto, poucos

estudos fogem à técnica de sequenciamento, principalmente para o diagnóstico de patógenos, o que aumenta significativamente os custos e alto nível de habilidade técnica necessária para realizar com competência análises em um grande número de amostras, se tornando muitas vezes impraticável para muitos laboratórios.

Assim, o Capítulo I teve por objetivo analisar as possíveis espécies de carrapatos que parasitam aves silvestres em três regiões com diferentes níveis de regeneração da Mata Atlântica, na cidade de Nova Iguaçu, estado do Rio de Janeiro, Brasil. Além disso, este capítulo amplia conhecimento das associações ecológicas existentes entre aves silvestres e carrapatos, relacionando estas ao ecossistema onde o parasito e o hospedeiro foi encontrado. No Capítulo II, com os carrapatos coletados nas aves silvestres e, baseado em dados de bioinformática, objetivou-se o desenvolvimento e aplicação de técnicas mais rentáveis e robustas para diagnóstico de microrganismos possivelmente carregados por esses ixodídeos, visando sua aplicabilidade em grandes amostras ambientais. Por último, o Capítulo III com o objetivo de resolver a ausência de estudos que visem à padronização de técnicas de extração de DNA em estudos de ixodídeos, fez uma análise comparativa de seis técnicas de extração genômica analisando sua eficiência tanto para o estudo do carrapato quanto para os possíveis microrganismos albergados por estes artrópodes.

CAPÍTULO I

CARRAPATOS PARASITOS DE AVES SILVESTRES DE TRÊS REGIÕES DE MATA ATLÂNTICA COM DIFERENTES NÍVEIS DE ANTROPIZAÇÃO EM NOVA IGUAÇU, RIO DE JANEIRO, BRASIL

RESUMO

COSTA-SANTOLIN, Ísis Daniele Alves. **Capítulo I: Carrapatos parasitos de aves silvestres de três regiões de Mata Atlântica com diferentes níveis de antropização em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil.** 2014. 49p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A Mata Atlântica, bioma de floresta tropical, abrange a costa leste, sudeste e sul do Brasil, o leste do Paraguai e a província de Misiones, na Argentina, sendo considerada um dos “Hotspots” de biodiversidade do planeta. Apesar de sua grande riqueza em espécies de aves, ainda são escassos os estudos que visam às relações ecológicas existentes entre a avifauna e outros organismos. O parasitismo por carrapatos é comum em aves silvestres, contudo pouco se é estudado no Rio de Janeiro. Assim, este capítulo objetivou analisar as espécies de carrapatos que parasitam aves silvestres bem como, a prevalência e intensidade de infestação destes ixodídeos em três regiões de Mata Atlântica, com diferentes níveis de antropização, em Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro, Brasil. As capturas foram realizadas no período de maio de 2011 a abril de 2012 com auxílio de redes-de-neblina. Foi capturado um total de 625 aves representadas por 98 espécies divididas em 26 famílias e sete ordens que representou 11% da avifauna deste bioma e 14,2% das aves registradas no estado. Dentre as aves capturadas, 17,44% (109/625) estavam parasitadas, e 458 carrapatos foram coletados, sendo 88,2% (404/458) no estágio de larva (LL) e 11,8% (54/458) no estágio de ninfa (NN). A maioria dos carrapatos, 99,8% (457/458), foi coletada em aves Passeriformes, sendo somente um carrapato coletado em *Leptotila verreauxi* que pertence à ordem Columbiformes. As espécies de ixodídeos coletados foram identificadas com auxílio de caracteres morfológicos e/ou através do sequenciamento (466 pares de bases do 16S DNAr mitocondrial) sendo classificadas como *Amblyomma longirostre* (LL= 345; NN= 34), *Amblyomma nodosum* (NN= 13), *Amblyomma calcaratum* (NN= 3), *Amblyomma coelebs* (NN= 1), *Amblyomma naponense* (LL= 1), *Amblyomma ovale* (LL=1), *Amblyomma varium* (NN= 2), *Amblyomma* sp. (LL= 53) e *Haemaphysalis* sp. (LL= 4; NN= 1). Inferências de novas espécies de aves hospedeiras para a Mata Atlântica do Rio de Janeiro foram registradas assim como o caso de superparasitismo de 99 larvas de *A. longirostre* em *Xiphorhynchus guttatus* (Aves: Dendrocolaptidae). Além disso, a associação entre as espécies de carrapatos coletadas e a presença de seus hospedeiros principais (mamíferos) e intermediários (aves) foi suposta baseada na relação entre *A. longirostre* e Dendrocolaptidae. Assim este capítulo ampliou o conhecimento das relações ecológicas entre ixodídeos e a avifauna em um importante bioma da região Neotropical.

Palavras chave: Aves, carrapatos, Mata Atlântica.

ABSTRACT

COSTA-SANTOLIN, Ísis Daniele Alves. **Chapter I: Ticks parasites of wild birds in three regions of Atlantic Forest with different levels of human disturbance in Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brazil.** [Capítulo I: Carrapatos parasitos de aves silvestres de três regiões de Mata Atlântica com diferentes níveis de antropização em Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil.] 2014. 49p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The Atlantic Forest biome of tropical rainforest, covers east, southeast and south of Brazil, eastern Paraguay and the province of Misiones, Argentina, considered one of the "hotspots" of biodiversity. Despite its large number of species of birds, there are still few studies aimed at existing ecological relationships between birds and other organisms. The parasitism by ticks is common in wild birds, yet this topic has received limited attention in the state of Rio de Janeiro. Thus, this chapter aimed to analyze the tick species that parasitize wild birds as well as to determine the prevalence and intensity of infection of these ticks in three regions of the Atlantic Forest, with different levels of human disturbance, in Nova Iguaçu, in the state of Rio de Janeiro, Brazil. Captures were conducted from May 2011 to April 2012 with the aid of mist-nets. A total of 625 birds represented by 98 species divided into 26 families and seven orders which represented 11% of the avifauna of this biome and 14.2% of the birds recorded in the state were captured. 17.44% (n = 109, 109/625) of the birds were found to be parasitized, from which 458 ticks were collected, with 88.2% (n = 404, 404/458) in the larval stage (LL) and 11.8% (n = 54, 54/458) in the nymph stage (NN). Most ticks, 99.8% (n = 457, 457/458), were collected from Passeriformes birds, with only a single tick collected from *Leptotila verreauxi*, order Columbiformes. The species of ticks collected were identified using morphological characters and by sequencing (16S rDNA) and were classified as *Amblyomma longirostre* (LL = 345; NN = 34), *Amblyomma nodosum* (NN = 13), *Amblyomma calcaratum* (NN = 3), *Amblyomma coelebs* (NN = 1), *Amblyomma naponense* (LL = 1), *Amblyomma ovale* (LL = 1), *Amblyomma varium* (NN = 2), *Amblyomma* sp. (LL = 53) and *Haemaphysalis* sp. (LL = 4, = NN 1). Inferences of new host species for the Atlantic Forest of Rio de Janeiro birds were recorded as well as the case of superparasitism by 99 larvae of *A. longirostre* in *Xiphorhynchus guttatus* (Aves: Dendrocolaptidae). In addition, the association between the collected tick species and the presence of their primary hosts (mammals) and intermediate hosts (birds) was discussed leading to the identification of a strong association between *A. longirostre* and Dendrocolaptidae. The findings of this chapter expand the knowledge of ecological relationships between ticks and birds in a major biome in the Neotropics.

Keywords: Birds, ticks, Atlantic Forest.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carrapatos

Carrapatos participam de interações ecológicas importantes que permitem o controle de suas populações no meio ambiente. Artrópodes como aranhas, besouros, ácaros, barbeiros, mariposas, moscas e formigas são tidos como seus grandes predadores, atacando carrapatos principalmente em fases ingurgitadas, que é quando têm menor mobilidade no campo (SAMISH, ALEKSEEV, 2001). Contudo, as observações no meio natural envolvendo a relação predador-presa, são muito esporádicas sendo difícil estimar o efeito real desses predadores sobre populações de carrapatos (SAMISH, ALEKSEEV, 2001; SAMISH et al. 2004). Também, organismos menores, como parasitoides da espécie *Ixodiphagus hookeri* são potenciais predadores naturais de carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil, sendo encontrados emergindo de ninfas ingurgitadas destes ixodídeos (LOPES et al. 2012). Animais vertebrados também participam da teia alimentar do qual um exemplo comum é o da garça-vaqueira (*Bubulcus ibis*), que exerce uma relação de protocooperação, pois costumam preda os ixodídeos quando estes estão infestando mamíferos como capivaras, bovinos, cervídeos no meio ambiente (KAUR, DHANJU, 2013).

Carrapatos pertencem ao filo Arthropoda, classe Arachnida, subclasse Acari. Dentro da ordem Ixodida existem três famílias descritas: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae. Nestas três famílias, são registrados 703 ixodídeos também chamados de carrapatos duros (GUGLIELMONE et al. 2010; 2014), 200 Argasídeos, popularmente conhecidos como carrapatos moles (NAVA et al., 2009; GUGLIELMONE et al., 2010; DANTAS-TORRES et al., 2012a; VENZAL et al., 2013) e o gênero monotípico incluindo apenas a espécie *Nuttalliella namaqua* dentro de Nuttalliellidae. De acordo com os últimos achados de Nava et al. (2013) o número de carrapatos descritos até hoje aumentou de 896 espécies de carrapatos válidos, proposto por Guglielmone et al. (2010) para 901 carrapatos em todo o mundo. Contudo os estudos constantes que envolvem novas descrições e redescritões torna discutível o número exato de espécies válidas de carrapatos no mundo (GUGLIELMONE et al. 2014).

Com a característica de parasitos obrigatórios, carrapatos têm distribuição global onde são encontrados parasitando diversas classes de vertebrados entre eles aves, répteis anfíbios, e mamíferos, incluindo o homem (HOOGSTRAAL, 1985; DANTAS-TORRES et al. 2006; BARROS-BATTESTI et al. 2006; 2011; 2012; RIVAS et al., 2012). As famílias destes ectoparasitos possuem diferenças morfológicas marcantes, além de variações nos ciclos de vida e nos habitats ocupados.

Argasídeos são conhecidos como carrapatos moles, “soft ticks”, justamente pela característica marcante da ausência do escudo dorsal na maioria das espécies. A exceção ocorre em *Nothoaspis* Keirans e Clifford, 1975 onde existe a presença de um tegumento coriáceo, liso chamado pseudoescudo por fazer menção ao escudo dos ixodídeos. Como argasídeos são carrapatos que realizam vários repastos sanguíneos de curtos períodos durante a mesma fase de desenvolvimento, normalmente têm como habitat locais próximos aos ambientes de repouso de seus hospedeiros, sendo estes ninhos, cavernas, estábulos, galinheiros dentre outros. Assim, podem se alimentar diversas vezes do mesmo hospedeiro ou de diferentes hospedeiros da mesma espécie, que compartilhem os mesmos locais de estada. São carrapatos onde seus ciclos de vida são marcados por uma fase de larva, dois ou mais estágios de ninfa, macho e fêmea, com discreto

dimorfismo sexual (SONENSHINE, 1993; GUIMARÃES et al., 2001; LOROSA et al., 2007; VIAL, 2009) e o acasalamento ocorre fora do hospedeiro, onde a fêmea ovipõe centenas de ovos. Ocupam geralmente habitats áridos ou semi-áridos (VENZAL et al., 2006) sendo contudo, também registrados em ambientes úmidos parasitando anfíbios (LUZ, FACCINI, 2013b).

Ixodídeos possuem a maior representação em número de espécies e têm a característica marcante da presença de um escudo coriáceo em seu idiossoma em todos os estágios, diferenciando-os drasticamente dos argasídeos. Diferente de argasídeos, ixodídeos possuem três fases de desenvolvimento, sendo larva, uma única fase de ninfa e adultos com grande dimorfismo sexual, com fêmeas caracterizadas pela presença de escudo recobrimdo cerca de um terço do idiossoma e em machos recobrimdo todo o idiossoma (BARROS-BATESTTI et al., 2006). Estes carrapatos têm ampla distribuição geográfica podendo ser deslocados junto a seus hospedeiros por quilômetros do ambiente de origem principalmente pelo fato de seu repasto sanguíneo durar dias ou até semanas, o que explica o fato da maioria das espécies copularem sobre o hospedeiro, com exceção de algumas espécies de *Ixodes*. A oviposição e ecdise ocorrem no ambiente, e uma fêmeas ovipõe milhares de ovos no solo, vegetação, ocos de árvores e cavernas (FACCINI; BARROS-BATTESTI, 2006). Algumas espécies ainda, como *Rhipicephalus microplus* (CANESTRINI, 1887) possuem a característica de não se desprenderem de seus hospedeiros realizando a ecdise sobre os mesmos durante todo seu ciclo de vida parasitário (SONENSHINE, 1993).

A maioria das espécies possui baixa especificidade parasitária principalmente em fases imaturas e por isso, ao longo do desenvolvimento de seu ciclo parasitam até três hospedeiros de espécies ou até classes diferentes ao mudar de estágio (KLOMPEN et al., 1996; NAVA, GUGLIELMONE, 2013). Essa baixa especificidade é comum em larvas e ninfas que frequentemente utilizam como hospedeiros animais de pequeno porte, ao contrário de ixodídeos adultos que possuem hospedeiros preferenciais ou mesmo exclusivos de médio e grande porte (RANDOLPH, 2004). Assim, o grupo dos ixodídeos pertencentes a esta família é, em linhas gerais, o que possui maior número de espécies de importância para a saúde pública e veterinária (DANTAS-TORRES et al. 2012b).

A fauna de carrapatos na Região Neotropical é composta por 202 espécies de carrapatos e está distribuída entre as famílias Argasidae (85 espécies) (VENZAL et al. 2012, KLOMPEN, NAVA et al., 2013) e Ixodidae (117 espécies) (ONOFRIO et al. 2006). No Brasil, a fauna de carrapatos é composta por 63 espécies com quatro gêneros em Argasidae: *Argas* (1 sp.), *Antricola* (3 spp.), *Nothoaspis* (1 spp.), *Ornithodoros* (16 spp.) (DANTAS-TORRES et al. 2009; LABRUNA, VENZAL 2009; NAVA et al. 2009; 2010a; DANTAS-TORRES et al. 2012a) e cinco gêneros em Ixodidae: *Amblyomma* (30 spp.), *Dermacentor* (1 sp.), *Haemaphysalis* (3 spp.), *Ixodes* (8 spp.) e *Rhipicephalus* (2 spp.) que são consideradas endêmicas ou estabelecidas no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2009). Contudo é importante salientar que novos estudos baseados em caracteres morfológicos e moleculares tem ampliado o número de espécies existente no Brasil e na região Neotropical, como ocorreu com a reavaliação do status taxonômico de *Amblyomma cajennense* que resultou na validação de *A. mixtum* e *A. sculptum*, além da definição de três novas espécies, *A. tonelliae* n. sp., *A. interandinum* n. sp., e *A. patinoi* n. sp. (NAVA et al. 2014).

O gênero *Amblyomma* tem distribuição geográfica em todos os continentes, exceto na Antártica. É o gênero mais abundante no território brasileiro com grande importância para saúde pública por conter espécies vetores de agentes patogênicos incluindo *A. cajennense* e *A. aureolatum* (LABRUNA et al. 2009; SZABÓ et al. 2013).

Sua importância pode ser relacionada ao seu ciclo biológico trioxeno da maioria das espécies o que faz com que a abrangência de hospedeiros parasitados seja maior do que quando comparado a um carrapato de ciclo monoxeno (FONSECA, MARTINS, 2007; NAVA et al. 2013). Além disso, a baixa especificidade principalmente nos estágios de larva e ninfa faz com que muitas espécies de *Amblyomma* incluam em seu ciclo diferentes classes de animais e o homem como hospedeiro (RAMOS et al. 2010). Segundo Faccini e Battesti (2006), o comportamento de busca pelo hospedeiro pode influenciar a especificidade parasitária do carrapato que de acordo com Sonenshine (1993) são descritos em dois tipos, carrapatos com comportamento de busca ativo e passivo. São passivas aquelas espécies que aguardam o hospedeiro “invadir” o ambiente onde o carrapato se encontra (= “ambush strategy” – estratégia de emboscada). Ativas são as espécies de carrapatos que saem em busca do hospedeiro percorrendo o solo, escalando folhas de grama, facilitando seu encontro com o hospedeiro (= “questing pose” estratégia de busca). Dentro deste último grupo de carrapatos existem aqueles que ou percorrendo o ambiente ou através de outros hospedeiros intermediários buscam estratégias que o levem ao habitat de seu hospedeiro preferencial sendo então chamados de “hunter” (= caçador) (SONENSHINE, 1993; ALLAN, 2010). Ainda existem aqueles carrapatos de hábito nidícola, que desenvolvem todas as suas fases de vida livre nas habitações ou locais de repouso de seu hospedeiro. Seus hábitos nidícolas favorecem o desenvolvimento de todas as fases subsequentes do ciclo de vida onde, esses ixodídeos tendem a se desprender dos hospedeiros, ao final do repasto sanguíneo, quando este se encontra no interior do abrigo. Desta maneira permite, então, que as demais fases não encontrem dificuldades em encontrar seu hospedeiro (LABRUNA, 2004). Assim, o encontro do carrapato com o hospedeiro ocorrerá devido à percepção, pelo carrapato, de estímulos liberados pelos hospedeiros (caimônios) através do sistema sensorial na superfície dorsal dos tarsos I, chamado órgão de Haller, que está presente em membros da família Ixodidae. Cerdas internas da cápsula do órgão de Haller estão relacionadas com a captação de estímulos hormonais e também à capacidade quimiorreceptora dos carrapatos (SONENSHINE, 1993; ALLAN, 2010) exercendo, então, importante papel na busca e na detecção pelo sítio de fixação no hospedeiro preferencial (FACCINI, BARROS-BATTESTI, 2006; ALLAN, 2010).

O ambiente exerce importante influência na relação de especificidade do carrapato e seu hospedeiro. Sendo assim, como carrapatos são adaptados a habitats específicos, o encontro com seus hospedeiros normalmente se dá em vertebrados adaptados ao mesmo habitat. Com isso, pode-se estender a existência de uma associação entre a distribuição geográfica ocupada pelos carrapatos e a distribuição geográfica ocupada pela fauna de hospedeiros (KLOMPEN et al. 1996; ESTRADA-PEÑA, et al. 2013; NAVA, GUGLIELMONE, 2013).

1.2 Carrapatos parasitos de aves silvestres

Aves silvestres têm sido reportadas como hospedeiras de carrapatos nos mais variados ambientes no Brasil e no mundo (HAMER et al. 2012; LUZ, FACCINI, 2013a; SANDOR et al. 2014). A avifauna silvestre participa como hospedeira de diversas fases do ciclo de carrapatos e é reportada frequentemente carregando fases imaturas de uma variedade de espécies de ixodídeos, contudo registros da presença de carrapatos adultos não são incomuns (SANTOS-SILVA et al., 2006; LABRUNA et al., 2007; JORDAN et al., 2009; OGRZEWALSKA et al., 2009; TOLESANO-PASCOLI et al., 2010;

OGRZEWALSKA et al., 2011; LUZ et al. 2012; PACHECO et al., 2012; PASCOAL et al., 2012; SANCHES et al., 2013).

A exceção da família Argasidae e do gênero *Dermacentor*, todos os demais gêneros de Ixodidae têm registros em aves silvestres (ARZUA et al., 2003, 2005; BARROS-BATTESTI et al., 2003; LUZ et al., 2012; OGRZEWALSKA et al., 2012). Dentre eles, *Amblyomma* é o gênero mais frequente em inquéritos da acarofauna presente em diversos ecossistemas, demonstrando sua ampla distribuição e manutenção de ciclos no meio silvestre por todo território brasileiro (LABRUNA et al., 2007; TOLESANO-PASCOLI et al., 2010; LUZ et al., 2012; PACHECO et al., 2012; PASCOAL et al., 2012; COSTA-SANTOLIN et al., 2012; OGRZEWALSKA et al., 2009, 2010, 2011, 2012, 2013; SANCHES et al., 2013).

Dentro de *Amblyomma*, a espécie que apresenta maior ocorrência em aves silvestres no Brasil é *Amblyomma longirostre* Koch, 1844, onde são principalmente coletados nas fases de larva e ninfa (OGRZEWALSKA et al. 2008; LUZ, FACCINI 2013). *Amblyomma longirostre* é um carrapato duro possuindo principalmente distribuição Neotropical. Registro desse carrapato já foi anteriormente feito na Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Venezuela, Guiana Francesa, sul do México, Panamá, Trinidad e Tobago e com relatos de estágios imaturos na região Neártica (BARROS-BATTESTI et al. 2006), Estados Unidos (MUKHERJEE et al. 2014), Uruguai (VENZAL et al. 2005) e Peru (NAVA et al. 2010). No Brasil, *A. longirostre* encontra-se distribuído por quase todo o território. Na região sul do país é encontrado nos estados do Paraná (ARZUA et al. 2005), Santa Catarina (MEDEIROS et al., 2011) e Rio Grande do Sul (SOARES et al., 2009). Na região Sudeste existem registros nos estados de Minas Gerais (GUIMARÃES et al., 2001), Rio de Janeiro (STORNI et al. 2005) e São Paulo (LABRUNA et al., 2007); na região Nordeste no estado de Pernambuco; Centro-Oeste no estado de Goiás; e região Norte nos estados do Acre, Amazonas e Pará (GUIMARÃES et al., 2001). A ordem Passeriformes é a mais parasitada por esta espécie de ixodídeo em suas fases imaturas (VENZAL et al. 2005; NAVA et al. 2010; OGRZEWALSKA et al. 2008; OGRZEWALSKA, et al. 2012), com registro em 18 famílias das 33 registradas no Brasil (LUZ, FACCINI, 2013). As aves registradas como sendo mais parasitadas por este carrapato são *Tachyphonus coronatus* (Vieillot) pertencente à Thraupidae e *Turdus rufiventris* Vieillot de Turdidae (LUZ, FACCINI, 2013). Aves migratórias também tem desempenhado importante papel na disseminação desta espécie de ixodídeo pelo continente americano. É o caso da ave *Setophaga ruticila* que tem ocorrência no Norte do Brasil (Roraima e Amazonas) (SIGRIST, 2009) e foi encontrada em Illinois, Chicago, EUA parasitada por uma ninfa de *A. longirostre* (HAMER et al. 2012). A presença deste carrapato em aves silvestres é tão frequente que ficou conhecido vulgarmente como "carrapato do passarinho" ou "brinco de passarinho" que se deve ao fato deste ixodídeo ser frequentemente encontrado em aves e próximo ao ouvido das mesmas lembrando propriamente um brinco (GUIMARÃES et al., 2001). Sua intensa ocorrência permitiu ainda que Labruna et al. (2007) inferissem que o ciclo de *A. longirostre* estaria relacionado a ambientes arborícolas, fato que explicaria a ocorrência de *A. longirostre* em aves e mamíferos arborícolas, principalmente *Coendou* spp., hospedeiros da fase adulta do carrapato, que raramente visitam o chão (SILVEIRA et al. 2008).

A segunda e a terceira espécie de carrapato mais frequentemente associada com aves no Brasil são *Amblyomma nodosum*, encontrada em 13 famílias e *Amblyomma aureolatum*, presente em nove famílias. A ave *Turdus amaurochalinus*, que tem hábito migratório e *Conopophaga lineata* da família Conopophagidae são reportadas como hospedeiras de *A. nodosum*. Enquanto as espécies de aves mais parasitadas por *A.*

aureolatum estão *T. rufiventris* e *Troglodytes musculus* (LUZ, FACCINI, 2013). Outras espécies de carrapatos relatados em associação a aves no Brasil são *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma coelebs*, *Amblyomma parkeri*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma naponense*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma geayi*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma pseudoconcolor*, *Amblyomma pacaе*, *Amblyomma tigrinum* (LUZ, FACCINI, 2013).

Nos outros gêneros de Ixodidae, três espécies de *Ixodes* foram registradas em aves silvestres, sendo elas *I. auritulus*, *I. paranaensis* e *I. fuscipes* na Mata Atlântica do Paraná, duas de *Haemaphysalis*, *H. juxtakochi*, e *H. leporispalustris* na Floresta Amazônica de Rondônia e Mata Atlântica de São Paulo e uma *Rhipicephalus*, *R. sanguineus* no Cerrado de Minas Gerais (LUZ, FACCINI, 2013).

A ordem Passeriformes, além de concentrar o maior número de espécies de aves no Brasil e no mundo, (SICK, 1997; CBRO, 2014; AVIBASE) possui a maioria dos registros de parasitismo no Brasil. A revisão realizada por Luz e Faccini (2013) reportou 1205 espécies de aves parasitadas onde Thamnophilidae, Tyrannidae, Furnariidae e Thraupidae são as famílias que apresentam maior número de espécies parasitadas. As espécies dessa ordem estão distribuídas por todos os biomas brasileiros dando a estas, o importante papel na dispersão de ixodídeos.

As demais ordens de aves comumente agrupadas como não Passeriformes também apresentam registros de parasitismo por carrapatos. São registradas 16 ordens não Passeriformes onde Columbidae pertencente à ordem Columbiformes e Trochilidae e Apodidae agrupadas na ordem Apodiformes são as mais parasitadas. No Brasil, carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Ixodes* foram coletados em aves não Passeriformes onde se inclui *A. longirostre*, *A. cajennense*, *A. pacaе*, *A. parkeri* e *A. parvum* (LUZ, FACCINI, 2013). Assim como em Passeriformes, *A. longirostre* também é o ixodídeo com maior prevalência dentro do grupo, registrado em beija-flores das espécies *Eupetomena macroura*, *Chlorostilbon lucidus* e *Thalurania glaucopis* da ordem Apodiformes e *Malacoptila striata* pertencente a Galbuliformes são as espécies mais parasitadas (LUZ, FACCINI, 2013). Aves não Passeriformes como Apodiformes são hospedeiras potenciais de *I. paranaensis* (BARROS-BATTESTI, et al., 2003) e *A. calcaratum* em Columbiformes (OGRZEWALSKA et al., 2009). Aves identificadas como *Vanellus chilensis* pertencente à Charadriiformes de hábitos terrícola foram capturados parasitados por *Amblyomma cajennense* (COSTA-SANTOLIN et al. 2012) que também ocupam locais de pastos e campos abertos (LABRUNA et al. 2003).

A importância do estudo do parasitismo em aves silvestres reside também no fato da capacidade que esses hospedeiros têm de transportar carrapatos por longas distâncias atravessando barreiras geográficas. Aves de hábitos migratórios já foram registradas parasitadas por ixodídeos de importância sanitária a exemplo do *I. scapularis* e *H. leporispalustris* coletados infectados por *B. burgdorferi* nos EUA, (HAMER et al. 2012) sendo também registradas em aves migratórias no Canadá (OGDEN et al. 2008); fazendo intercâmbio entre diferentes locais na Rússia carreando espécies como *I. ricinus* infectados com *Babesia spp.* e Rickettsias do grupo de febre maculosa (GFM) (MOVILA et al., 2011) ou no Delta Danúbio uma importante reserva da biosfera situado na Romênia (SANDOR et al 2014). O transporte de *I. lividus* através da andorinha, *Riparia riparia*, foi considerado importante para a compreensão do ciclo de dispersão de espécies de *Rickettsia spp.* do GFM no Reino Unido (GRAHAM, et al., 2010). Algumas aves também recebem o mérito pela possível introdução de espécies de carrapatos, antes sem registro de ocorrência em determinadas regiões geográficas, como é o caso da Noruega, onde anteriormente, não possuía registro de infestação por

espécies de *Dermacentor* que passaram a ser registradas após inspeções da avifauna migratória (HASLE, et al., 2009).

Diante do importante papel da avifauna como dispersora de carrapatos que podem carrear microrganismos patogênicos, este capítulo objetivou analisar as espécies de ixodídeos parasitos de aves silvestres de três regiões de Mata Atlântica com diferentes influências antrópicas, situada no município de Nova Iguaçu, no estado do Rio de Janeiro. Além disso, buscou ampliar o conhecimento das relações ecológicas existentes entre os carrapatos e seus hospedeiros naturais e ainda verificar a correlação entre a prevalência de carrapatos e o grau de antropização das áreas analisadas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

O estudo foi desenvolvido no município de Nova Iguaçu do estado do Rio de Janeiro, situado na Região Metropolitana da cidade do Rio de Janeiro. As capturas das aves ocorreram no entorno do bairro do Tinguá no período de maio de 2011 a abril de 2012 em três pontos.

O bairro do Tinguá, segundo o Decreto Municipal de Nova Iguaçu 6629 de 2003, tem suas delimitações definidas a começar no encontro do Rio Ana Felícia com o antigo leito da Estrada de Ferro sub-ramal Cava-Tinguá. O limite segue pelo antigo leito da Estrada de Ferro sub-ramal Cava-Tinguá até o Rio Iguaçu, segue pelo leito deste rio, à montante, até o Rio Paiol, segue pelo leito deste rio, à montante, até a Avenida Muniz Barreto, segue por esta até a Avenida Olinda, segue por esta até o Aqueduto da Cachoeira, segue pelo eixo deste aqueduto até o Rio Iguaçu, segue pelo leito deste rio, à montante, até o limite legal da Reserva Biológica do Tinguá (Decreto Federal n.º 97.780, de 23 de maio de 1989), segue por este limite até o Rio Boa Esperança, segue pelo leito deste rio, à jusante, até o Rio Utum, segue pelo leito deste rio, à jusante, até o Rio Tinguá, segue pelo leito deste rio, à jusante, até o Rio Ana Felícia, segue pelo leito deste, à montante, até o ponto inicial desta descrição.

O clima é classificado como tropical úmido do tipo Am (clima de monção segundo Koeppen) tendo os meses de julho e agosto a estação seca e a média anual de 21,6°C e o mês de janeiro como o mês mais quente atingindo temperaturas de até 40,0°C que coincide junto ao mês de dezembro como os meses mais chuvosos (LIMA, 2002). O clima nas regiões montanhosas é classificado como mesotérmico de altitude. Registros da precipitação na região da Reserva Biológica do Tinguá enumeram média de 2.000 mm ao ano, sendo, contudo os meses do intervalo entre abril e agosto com a precipitação média é de 80 mm por mês (IBAMA, 2006).

O Ponto P01 (22°36' 57" S 43°24' 50" W) de captura das aves, chamado de Indústria, foi caracterizado por uma área de reflorestamento de mata ciliar do entorno do rio Ana Felícia. As coletas se iniciaram enquanto o reflorestamento se encontrava em estágio primário de regeneração onde as mudas avistadas mediam em torno de 50 cm de altura no entorno do rio. No período dos meses de coleta foi observado a crescente pressão antrópica que o ambiente sofreu e devido à implantação de uma fábrica na margem norte do rio Ana Felícia. A influência consistia em pressão sonora devido às obras na fábrica, perda de área natural para a instalação da mesma, além do intenso fluxo de pessoas nas proximidades do local de coleta. Na margem sul no local onde antes havia um pequeno morro, era possível avistar a crescente retirada de sedimento do mesmo no decorrer do ano de captura. Sendo assim, após observações no decorrer do período de execução deste trabalho, o P01 foi considerado com uma área com características de intensa antropização devido à expansão urbana ao redor (Figura 1).



Figura 1. Área da Indústria (P01) de coleta. A: Foto do ponto de coleta 01. Mudanças do entorno da mata ciliar com cerca de 1 ano e seis meses de plantio. Ao fundo parte das obras devido à implantação da fábrica no decorrer do período de capturas. B: Imagem de satélite do ponto de coleta 01 (P01). Marcador laranja mostra o ponto de captura. Próximo a ele pode-se ver as obras provenientes da implantação da fábrica. Fonte: GoogleEarth.

O Ponto P02 (22° 45' S 43° 05' 40" W) foi situado dentro da Reserva Biológica do Tinguá (Rebio-Tinguá). A Rebio do Tinguá é uma Unidade de Conservação Federal sendo classificada como área de proteção máxima, por ser Unidade de Proteção Integral segundo o Art. 10 da Lei do Snuc nº 9.985, de 18 de julho de 2000, que impõe

restrições à interferência humana (BRASIL, 2000). Está sob jurisdição do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA. Criada através do Decreto nº 97.780 de 23 de maio de 1989, abrange uma área de 26.260 ha com perímetro de cerca de 119 km. Está localizada no estado do Rio de Janeiro, nos municípios de Nova Iguaçu, Duque de Caxias, Petrópolis e Miguel Pereira (IBAMA, 1989). Inserida no bioma Mata Atlântica, a região contém variedades estruturais devido à declividade onde, de acordo com LIMA (2002), pode ser dividida em formações vegetais do tipo Floresta Aluvial ocorrendo em áreas de baixada próximo a planícies aluviais; Floresta Ombrófila Densa Sub-Montana presentes em áreas próximas as elevações possuindo uma variação entre 50 e 500 m. Floresta Ombrófila Densa Montana presente em encostas acima de 500 m sendo a principal formação abrangente da Reserva estando visivelmente preservada principalmente por situar as nascentes dos rios que abastecem a Baixada Fluminense. Floresta Ombrófila Densa Altomontana formação arbórea presente entre 1300 e 1500 m de altitude. Por último a formação de Campos de Altitude caracterizada com fisionomia não florestal dominadas por gramíneas, ciperáceas, orquídeas e bromélias e pequenos arbustos, nos cumes das serras, acima dos limites das florestas altomontanas (LIMA 2002).

A Rebio-Tinguá está inscrita pela UNESCO, desde março de 1991, como Reserva da Biosfera da Mata Atlântica – RBMA do qual foi a primeira unidade da Rede Mundial de Reservas da Biosfera declarada no Brasil sendo, além disso, uma das primeiras Unidades de Conservação (UCs) incluídas neste sistema de proteção de áreas naturais e uma das mais importantes, já que é a maior reserva da biosfera em área florestada do planeta, abrangendo áreas de 15 dos 17 estados brasileiros onde ocorre a Mata Atlântica (Figura 2) (IBAMA, 2006).

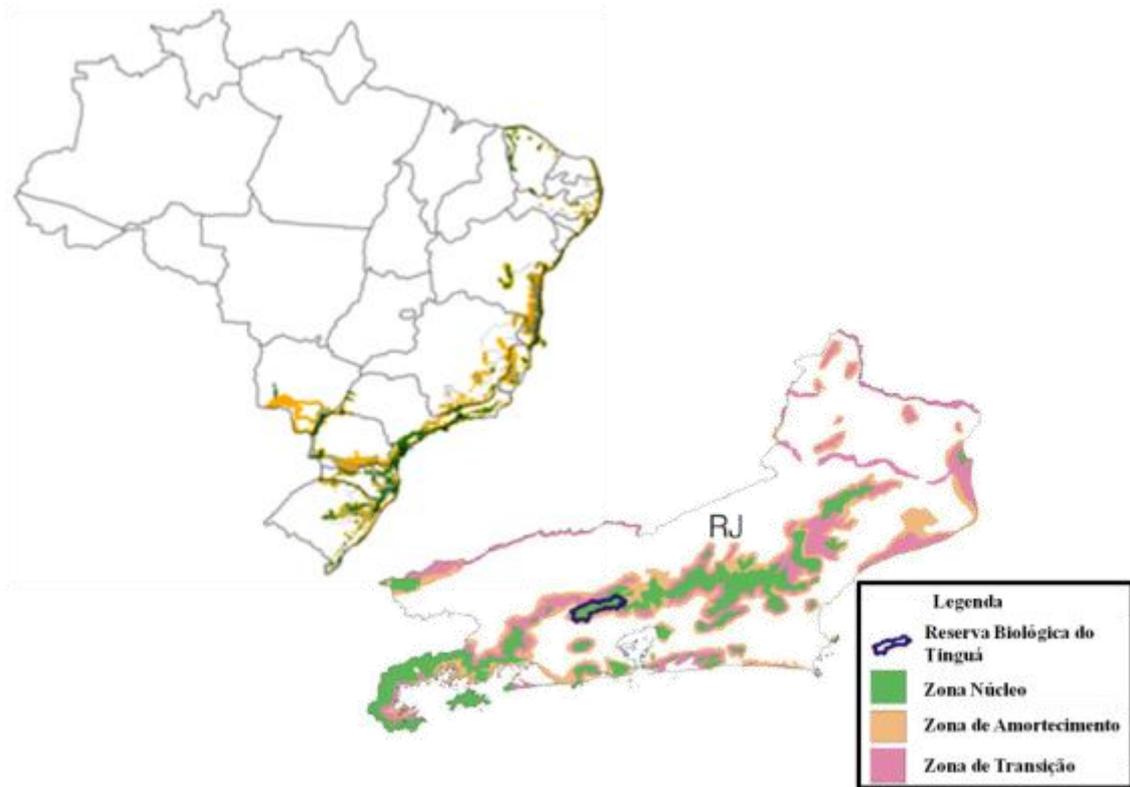


Figura 2. Mapa indicativo da abrangência da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica – RBMA onde está inserida a Reserva Biológica do Tinguá no estado do Rio de Janeiro, local escolhido como ponto 02 de captura das aves silvestres. Fonte: Plano de Manejo Rebio-Tinguá, 2006.

O local escolhido para as capturas situava-se em trilha que tangenciava a encosta próximo a Caixa de Honório Bicalho que recebe captação do rio Macuco estando sob jurisdição da Companhia Estadual de Águas e Esgotos do Rio de Janeiro (CEDAE) (Figura 3). Comparado aos demais locais de capturas, a Rebio-Tinguá foi considerada a menos antropizada das três áreas.



Figura 3. Ponto 02 de captura dentro da Rebio-Tingüá. A: trilha onde as redes de neblina eram armadas, demonstrada em C. B: Córrego afluente do rio Tingüá próximo ao local de captura.

O Ponto P03 (22°35'16.46" S 043° 24'13.76" W), também chamada de região Agrícola, possuía uma área com plantações de pupunheiras (*Bactris gasipaes*), jambeiros (*Syzygium jambos*), goiabeiras (*Psidium guajava* L.) e mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) onde parte da região do entorno fluvial do rio Boa Esperança foi destinado ao reflorestamento da mata ciliar, que nos períodos de coleta estavam em estágio primário de regeneração. Alguns animais possuíam livre acesso aos locais onde eram realizadas as capturas como cachorros (*Canis lupus familiaris* Linnaeus 1758), galinhas (*Gallus gallus domesticus* (Linnaeus 1758)) e bovinos (*Bos taurus* Linnaeus 1758). As redes de neblina foram armadas margeando o rio próximo a mata ciliar reflorestada à margem sul do rio Boa Esperança (Figura 4). Como a região se tratava de um local de laboro possuíam livre circulação de pessoas nos horários de coletas sendo considerado um local de intensa influência antrópica.



Figura 4. A: Foto do ponto de coleta P03 situado na região Agrícola. B: Imagem de satélite do ponto de captura P03 indicado com o ícone laranja. Fonte GoogleEarth.

Os pontos se distanciavam em média 3 Km um do outro, não havendo qualquer barreira geográfica entre os mesmos indicando que a avifauna tinha acesso livre entre as áreas utilizadas para captura das aves silvestres (Figura 5).

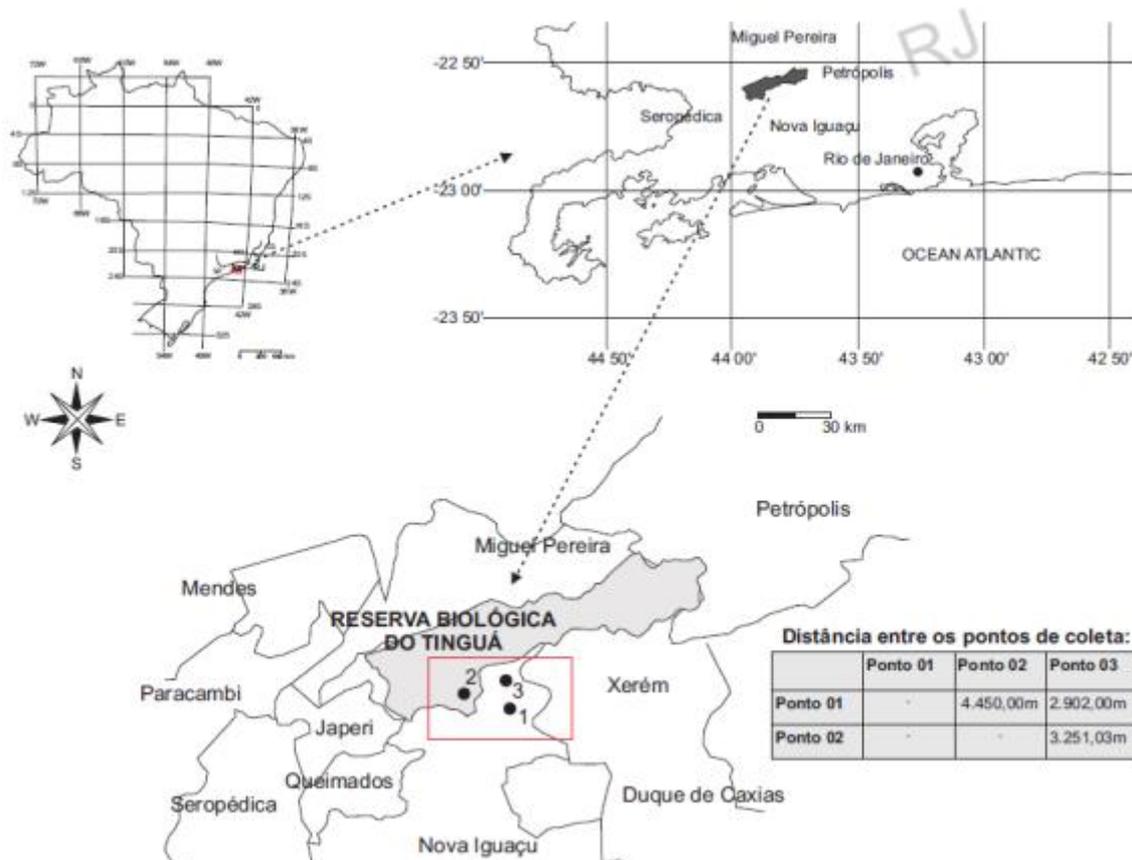


Figura 5. Mapas indicativos da localização dos pontos de captura demonstrando a distância entre eles e a ausência de barreira geográfica que impessa o deslocamento voluntário das aves silvestres encontradas no local.

2.2 Captura das aves silvestres

As capturas das aves silvestres foram realizadas mensalmente, entre maio de 2011 a abril de 2012, nos três pontos previamente escolhidos. As aves foram capturadas com redes-de-neblina de 12 x 2,5 m com malha de 36x36 mm, isto é em redes de nylon, com fios finos, pouco visíveis e muito leves, normalmente usadas para capturar aves e morcegos em ambientes abertos. O tempo de coleta era de três dias consecutivos (um dia para cada ponto). Foram utilizadas 15 redes-de-neblina por coleta onde as mesmas foram abertas ao nascer do sol, variando entre 5h30min e 6h30min conforme as estações do ano, e fechadas ao pôr do sol, entre 17h00min. e 18h00min.

Mesmo a rede-de-neblina não sendo capaz de oferecer qualquer perigo à integridade física do animal capturado, durante as capturas as redes eram vistórias em intervalos de 30 minutos, de modo a minimizar o estresse sofrido pela ave (Figura 6).



Figura 6. Ave capturada com rede-de-neblina sendo removida cuidadosamente de modo a minimizar qualquer estresse sofrido pelo espécime capturado. A: *Sporophila caerulea*. B: *Ramphodon naevius*.

A contenção da ave capturada foi feita manualmente utilizando-se luvas como equipamento de proteção individual (EPI). Após a retirada da rede-de-neblina a ave foi então acondicionada em sacos de algodão limpos com a finalidade de minimizar o estresse sofrido pelo animal, já que a área limitada pelo saco de algodão impede que a mesma se movimente excessivamente correndo o risco de sofrer algum dano físico durante a captura (Figura 7C). Além disso, os sacos de algodão individuais impedem que os ectoparasitos que eventualmente se desprendam da ave no momento da sua captura entre em contato com outra ave capturada simultaneamente, causando uma falha na análise de associação do hospedeiro com seu respectivo parasito.

Todas as aves capturadas parasitadas ou não foram fotografadas como ferramenta de auxílio de identificação.

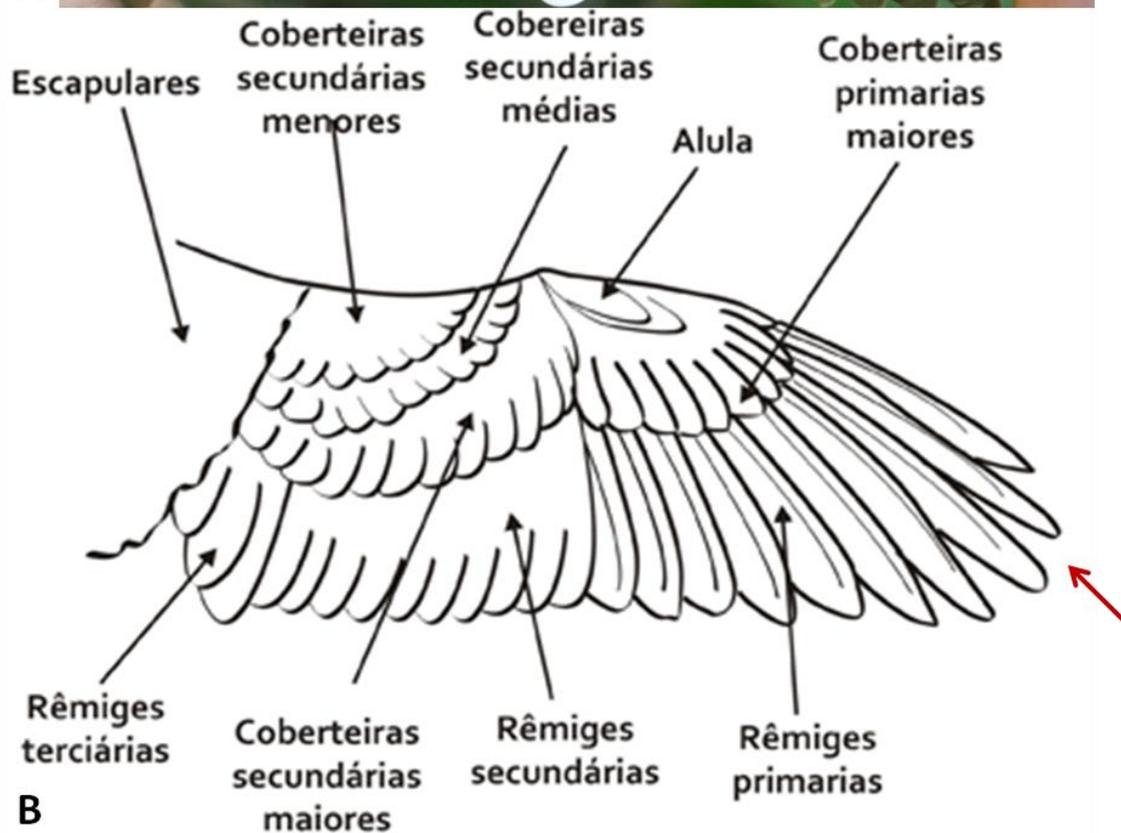


Figura 7. A: tubo contendo RNA Later utilizado para o armazenamento dos carrapatos coletados em campo nas aves silvestres. B: Cada carrapato coletado armazenado individualmente em tubos de tampa com rosca, acondicionados em caixas próprias para o transporte da ave capturada da rede-de-neblina até o local de inspeção do possível parasitismo. C: saco de algodão utilizado para o acondicionamento da ave capturada até o momento de sua análise.

As aves capturadas foram marcadas de maneira indolor cortando-se a segunda rêmige primária (Figura 8), de modo que esta metodologia tinha por finalidade somente a verificação de recaptura da ave no mesmo dia de estudo.



A



B

Figura 8. Marcação feita nas aves. A: Corte da segunda rêmige primária feita nas aves capturadas. Ave fêmea de *Geothlypis aequinoctialis*. B: Esquema mostrando a nomenclatura utilizada para diferenciação das penas que recobrem a asa de uma ave. Setas vermelhas indicam a segunda rêmige primária. Fonte da figura 8 B: Imagem de José Claro da Fonseca Neto obtida em <http://www.cem.ufpr.br/litoralnotacem/guia/guiaaves.htm> Acesso em março de 2014.

A inspeção quanto à presença do possível parasitismo por carrapatos foi efetuada soprando-se a plumagem da ave de modo que a pele da mesma fosse exposta e os

ixodídeos presentes visualizados. A inspeção foi executada em menor tempo possível sendo que a ave dificilmente foi liberada em tempo superior a 10 minutos. Foram respeitados os respectivos locais de captura de modo que coincidissem com os locais de soltura, sendo realizada vagarosamente e logo após a marcação da ave.

Todos os procedimentos de manuseio efetuados estão de acordo com a Instrução Normativa nº 27, de 23 de dezembro de 2002 e realizados com permissão do IBAMA, de acordo com processo 27967-2 (Anexo 1).

O esforço amostral foi obtido através do número de horas em que a rede ficou aberta multiplicada pelo número de redes utilizadas. Em cada área o esforço amostral foi de 2182h totalizando 6547h de esforço amostral na região do Tinguá.

A identificação e classificação dos espécimes capturados foi realizada de acordo com Develey e Endrigo (2004), Sigrist (2007), Ferreira et al. (2010) e com o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (2014).

2.3 Coleta dos Carrapatos

Todos os carrapatos foram retirados manualmente ou com pinças, armazenados individualmente em tubos com tampa de rosca contendo 500µL de RNAlater® (Ambion). Os tubos foram etiquetados com o nome do hospedeiro, a área e a data da coleta e mantidos a temperatura ambiente em caixas próprias, até que fossem levados ao laboratório. No laboratório os tubos contendo carrapatos foram alocados a 4°C até que fossem identificados morfológicamente. Após a identificação da espécie do ixodídeo, os carrapatos foram então submetidos ao congelamento a temperatura de -20°C (Figura 7 A, B).

Os carrapatos coletados na fase de ninfa foram identificados através da chave dicotômica para o gênero *Amblyomma* de Martins et al. (2010). Após o início das identificações, 34 ninfas foram classificadas como pertencentes à espécie *A. longirostre*. Assim, foi considerada a possibilidade de que as larvas coletadas nas aves também pertenceriam a esta espécie. Foi iniciada então, a identificação através da descrição da fase larval deste ixodídeo a nível específico, aonde se chegou a conclusão que através dos caracteres morfológicos, a maioria das larvas coletadas também se tratava de *A. longirostre*. Os caracteres utilizados para a identificação a nível específico das larvas além das características morfológicas, foram o par suplementar de “sensillum” campaniformes na região dorsal do idiossoma, sendo o primeiro localizado abaixo do escudo e o segundo logo acima do primeiro festão, que são únicos para a espécie segundo Barros-Battesti, et al (2005). Para a confirmação da posição dos caracteres mencionados por Barros-Battesti, et al (2005), alguns exemplares foram clarificados e confirmados como *A. longirostre*.

As amostras foram submetidas à clarificação através da adição de 30µL de ácido láctico 90%, colocados em lâminas escavadas e aquecidas em estufa a temperatura de 56°C. O material foi inspecionado periodicamente e permaneceu neste meio por sete dias até a diafanização que possibilitasse a visualização dos caracteres morfológicos (FLECHTMAN, 1975). Larvas em estado de ingurgitamento avançado não permitiram uma visualização confiável dos caracteres determinantes para a espécie *A. longirostre*, assim como larvas de outras espécies que foram identificadas somente até o nível de gênero. Esta metodologia foi utilizada haja vista que não existe uma chave completa para larvas de espécies brasileiras do gênero *Amblyomma*. Todos os ixodídeos foram analisados com auxílio do microscópio estereoscópio marca Olympus modelo

SZX2-ILLB com câmera UC30 e projetada na tela através do programa CELL (Imaging software for life sciences microscopy).

Exemplares dos carrapatos coletados neste estudo e identificados como *A. longirostre* foram depositados na Coleção Acarológica do Instituto Butantan (IBSP), São Paulo, estado de São Paulo - curadora Dra. D. M. Barros-Battesti (registros: 10.940; 10.941; 10.942).

2.4 Identificação molecular de carrapatos

Carrapatos que não puderam ser identificados morfológicamente foram submetidos à identificação molecular. O DNA dos ixodídeos foi extraído seguindo o protocolo fenol:clorofórmio (descrito detalhadamente no capítulo 3) e em seguida ampliações através do protocolo “Hot Start-Touch-up” PCR, de um fragmento do gene codificador do 16S DNAr mitocondrial dos carrapatos foram realizados. Os iniciadores utilizados para tal reação da PCR gerou um produto de aproximadamente 460 pb (Tabela 1).

Em todos os ensaios, três controles positivos foram utilizados para garantir a eficiência da PCR sendo estes provenientes do DNA extraído de *R. microplus* que foi diluído para conter as seguintes concentrações (1ng/μL), (100 pg/μL) e (10 pg/μL) e dois controles negativos. O primeiro controle negativo compreendia uma amostra em que o DNA de teste foi substituído pela mesma quantidade de água para biologia molecular, que foi adicionada ao tubo antes destes serem retirados do ambiente (livres de DNA) no qual as misturas para a reação da PCR foram preparadas e distribuídas para os tubos de reação individuais. Este controle, denominado água dentro, serviu para confirmar que os componentes da mistura da reação estavam livres de DNA contaminante. O segundo controle negativo denominado água fora, também foi composto de um tubo pelo qual o DNA foi substituído por um volume equivalente de água para biologia molecular. No entanto, este tubo controle foi mantido no ambiente (potencialmente contaminado por DNA), durante o período em que o DNA teste foi adicionado aos tubos individuais, contendo alíquotas da mistura principal para PCR. Este foi sempre o último tubo a ser preparado. Deste modo, o controle que foi intitulado água fora, serviu para determinar se havia ocorrido contaminação durante o processo de adição de amostras de DNA teste nos tubos individuais de reação. Uma reação positiva em qualquer controle negativo invalidava todas e quaisquer reações positivas registradas com o DNA teste das amostras.

2.5 Sequenciamento

Os produtos das PCR foram então purificados com Exo-SAP-IT (*GE Healthcare Life Sciences*) e submetidos ao sequenciamento através do “BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit” Applied Biosystems. Os “amplicons” foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores utilizados na PCR, e a reação de “cycle sequencing” foi realizada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 60 segundos, seguidos de 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, cinco segundos a 50°C para o anelamento e quatro minutos à 60°C para a extensão. Após a reação, a remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita através de precipitação com EDTA/etanol seguido por ressuspensão em 10 μL de formamida (Applied Biosystems). Todo o sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador de DNA automático (modelo 3500 Applied

Biosystems), localizado no Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ. Alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Sequencher® (Versão 5.1; Genecodes Corporation), e as sequências obtidas foram identificadas usando o programa BlastN, junto ao banco de dados GenBank.

Tabela 1. Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do 16S DNAr mitocondrial.

Alvo	Iniciadores	Mistura para PCR para volume final de 12,5µL	Tamanho do produto	Condições da PCR	Referências
16S DNAr mitocondrial	LB Forward 5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T-3' LB Reverse 5'- GCT CAA TGA TTT TTT AAA TTG CTG T-3'	1x tampão 1,5mM MgCl ₂ 0,2mM dNTPs 10mM de cada iniciador 0,5 unidades de Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brasil) 1mL do DNA	460bp	Ativação da <i>Taq</i> Polimerase durante 5 minutos a 94°C. Sete ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos para o anelamento e 45 segundos para a extensão a 72°C. A temperatura de anelamento nos primeiros sete ciclos é aumentada 0,3°C a cada segundo, começando em 47°C indo até 48,8°C. 33 ciclos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C, 45 segundos para a extensão a 72°C. A extensão final ocorre em 5 minutos a 72°C.	Mangold et al. (1998)

2.6 Análise dos Dados

As prevalências de infestação (PI) foram calculadas através da razão entre o número de aves infestadas e o número de aves examinadas, multiplicado por 100. A intensidade média de infestação (IMP) foi definida pelo número de carrapatos obtidos, dividido pelo total de aves infestadas e a abundância, foi registrada pelo número de carrapatos em uma única ave (BUSH et al. 1997). Para verificar se o conjunto amostral seguia uma tem distribuição Normal foi utilizado o teste Shapiro-Wilk. Utilizou-se os testes não paramétricos do χ^2 para comparar as PIs e Kruskal-Wallis para comparar as IMPs entre os pontos amostrados aplicando o teste *post hoc* de Dunn no caso de probabilidades (p) menores que 0,05 (ZAR, 1999) através do programa BIOSTAT 5.0 (AYRES et al. 2007).

Foi elaborada uma curva de rarefação, usando o número de espécies coletadas correlacionada com o número de indivíduos de cada espécie (SOBERÓ, LLORENTE 1993; MORENO, HALFFTER 2000), de modo que fosse possível analisar se a área foi satisfatoriamente amostrada. Para analisar as diferenças em relação à riqueza de espécies nas três áreas, foram realizadas curvas de rarefação de espécies com o programa PAST (Paleontological STatistic, disponível em <http://folk.uio.no/ohammer/past/>). A curva de rarefação é realizada a partir da permutação de todos os indivíduos, aleatoriamente. Cada ponto da curva representa a média dessas permutações (1000). A rarefação gera o número esperado de espécies para a correspondente curva de acumulação, que é a curva confeccionada com o total de espécies reveladas durante a coleta dos dados (GOTELLI; COLWELL, 2001). A rarefação é uma técnica que permite a comparação de riqueza de espécies de comunidades, pois reduz os dados amostrais para o mesmo número de indivíduos (MAGURRAN, 2004).

A riqueza esperada de espécies de aves foi estimada empregando-se o Índice de Chao-1 (CHAO, 1984; COLWEL, CODDINGTON, 1994), obtido através da fórmula: $S_{Chao} = Sobs + (a^2/2b)$, onde Sobs é o número de espécies observadas (capturadas), a é o número de espécies capturadas uma única vez e b é o número de espécies representadas por duas capturas. A partir do cálculo desse índice, foi possível estimar o percentual de quão completamente amostradas foram as áreas de estudo, através do número total de espécies esperadas para cada localidade (HAMMER et al., 2001).

Para medir a diversidade de aves capturadas, foi calculado para a amostragem total, o Índice de Diversidade de Shannon-Winner, dado pela fórmula $H' = - \sum p_i \ln p_i$, onde p_i é a proporção entre o número de indivíduos de cada espécie e o número total de indivíduos capturados (n/N) e a comparação dos índices de diversidade obtidos foi realizado pelo test t (MAGURRAN, 1988). Para avaliar a uniformidade na distribuição das espécies foi calculada equitabilidade de Pielou (J'). A equitabilidade varia entre 0 e 1, e é considerada alta quando maior que 0,5. Um baixo valor de equitabilidade significa que existe a dominância de uma ou mais espécies na comunidade estudada, enquanto equitabilidade alta significa distribuição uniforme entre as espécies na amostra (MARTINS, SANTOS, 1999). Para calcular o índice de diversidade e a equitabilidade foi usado o software PAST versão 1.74 (HAMMER et al., 2001). A riqueza foi considerada como o número de espécies capturadas nas três áreas.

Gráficos da distribuição de larvas e ninfas de *Amblyomma longirostre* foram feitos a fim de verificar a dinâmica da amostra coletada ao longo dos meses durante o período de captura (EXCEL 14.0, OFFICE 2010).

3 RESULTADOS

3.1 Aves Capturadas

Durante o período de captura, 625 aves representadas por 98 espécies divididas em 26 famílias e sete ordens, não considerando as aves recapturadas no mesmo dia de campanha. Dentre as 891 espécies que ocorrem na Mata Atlântica (LIMA, 2014), 690 aves foram registradas no estado do Rio de Janeiro (SICK, 1997; FERREIRA et al, 2010), conferindo a este estudo uma representatividade de 11% (98/891) da avifauna deste bioma e 14,2% (98/690) das aves registradas no estado.

A ordem com maior número de espécimes capturados foi Passeriformes com 78,08% (n=488) das aves. Nesta ordem foram coletadas 19 famílias, dentre as quais a mais abundante foi Thraupidae com 154 aves coletadas que também agrupou a espécie de ave mais capturada, *Volatinia jacarina* (n=44) e as menos abundantes com somente um indivíduo foram Parulidae com *Geothlypis aequinoctialis* e Tityridae com *Pachyramphus viridis* (Figura 9).

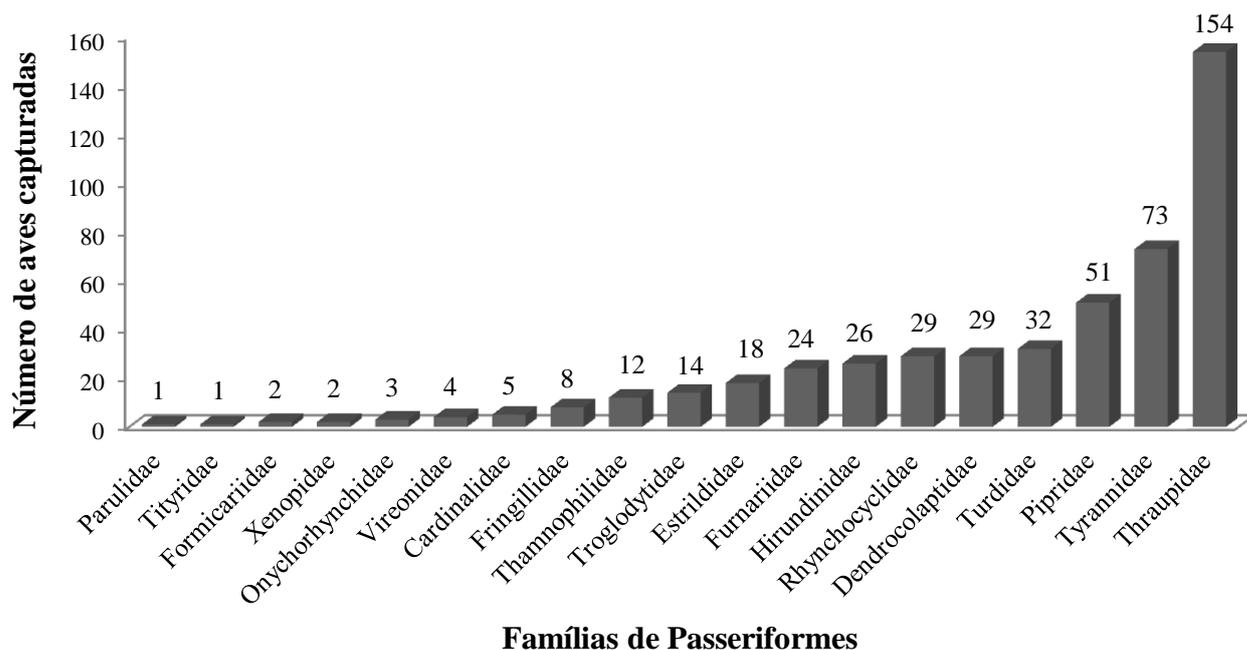


Figura 9. Número de aves pertencentes às famílias da ordem Passeriformes capturadas no período de maio de 2011 a abril de 2012 em região de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro.

Outros Passeriformes foram capturados em número elevado de espécimes como *Manacus manacus* (n= 39), *Stelgidopteryx ruficollis* (n= 23), *Tangara sayaca* (n= 21) e *Elaenia flavogaster* (n= 21).

A prevalência de aves não Passeriformes capturadas foi de 21,92% (137/625) sendo representadas pelas ordens Apodiformes, Columbiformes, Cuculiformes, Galbuliformes, Piciformes e Trogoniformes. A ordem Apodiformes foi uma das ordens mais abundantes dentre as aves não Passeriformes com 51,82% (n=71/137), sendo representada somente pela

família Trochilidae, onde 42% das aves capturadas (30/71) pertenciam à *Ramphodon naevius* e 35,2% (25/71) a *Thalurania glaucopsis*. Columbiformes foi a segunda ordem mais abundante com 41,6% (57/137) onde *Columbina talpacoti* foi a espécie mais representativa com 94,7% (54/57) das capturas.

Com relação aos diferentes pontos de coleta, a área referente à Indústria (P01) foi a que apresentou maior abundância de aves silvestres, representada por 45,44% (284/625) do total de aves do estudo. Destas, 20,08% (57/284) foram representadas por ordens não Passeriformes e 79,92% (227/284) por aves Passeriformes. Entre as famílias da ordem Passeriformes membros de Thraupidae (n= 92) foram as mais capturadas onde *Volatinia jacarina* (n= 25) foi a mais abundante. A segunda mais capturada foi Tyrannidae (n= 43) com maior número de indivíduos classificados como *Elaenia flavogaster* (n= 17). Em terceiro lugar estiveram Estrildidae, somente com *Estrilda astrild* (n= 18) e Pipridae também com uma única espécie *Manacus manacus* (n= 18). Dentre as aves não Passeriformes, Columbiformes representada por 77,19% (44/57), teve maior abundância entre as aves capturadas, com *Columbina talpacoti* (n=42) que foi a espécie com maior número de indivíduos e *Leptotila verreauxi* (n=2).

Na área da Rebio-Tinguá (P02) foram coletadas 27,36% (171/625) de todas as aves do estudo, onde 73,1% (125/171) pertenceram a Passeriformes e 26,9% (46/171) foram representadas por ordens não Passeriformes. A família mais representativa dentro de não Passeriformes foi Trochilidae (Apodiformes) com 89,13% (41/46) sendo as espécies mais abundantes *Ramphodon naevius* (n=21) e *Thalurania glaucopsis* (n=17). Entre as aves Passeriformes, Dendrocolaptidae, além de ser a família mais prevalente com 23,2% (29/125), só foi coletada nesta área de estudo, onde *Dendrocincla turdina* (14 indivíduos) foi a espécie mais abundante.

Na área Agrícola (P03) foram capturadas 27,20% (170/625) das aves presentes no estudo, com 80,12% (137/171) de Passeriformes, e 19,88% (34/171) de aves não Passeriformes. *Volatinia jacarina* (n=19; Thraupidae n=56), assim como na área da Indústria, e *Thalurania glaucopsis* (n=8; Trochilidae n=20), foram as espécies mais abundantes em Passeriformes e não Passeriformes, respectivamente.

Quanto às riquezas estimadas para cada área amostrada, o índice de Chao-1 foi de 77 espécies para a Indústria (P01), e indicou que o inventário para esta área está 62,33% (48/77) completo. Para a Rebio-Tinguá (P02), o índice de Chao-1 foi de 66 espécies, e está 72,72% (48/66) concluídos e a área Agrícola (P03), que foi a área que apresentou dados da maior parte da riqueza amostrada, se apresentou 79,66% (47/59) completa, das 59 espécies estimadas (índice de Chao-1) para este ponto de captura.

O valor da equitabilidade de Pielou (J') da comunidade de aves capturadas no P01 foi de $J' = 0,83$, para o P02 $J' = 0,86$ e para o P03 $J' = 0,90$ demonstrando uma quase que uniformidade na comunidade de aves capturadas, não havendo assim, espécies dominantes nos ambientes amostrados. Quando a riqueza das aves coletadas foi comparada entre os três pontos de captura, observou-se para a Indústria o índice de diversidade de Shannon-Winner de $H' = 3,23$ (48 spp, n= 284), para a Rebio-Tinguá de $H' = 3,34$ (48 spp, n= 171) e finalmente para a área Agrícola de $H' = 3,49$ (47 spp, n=170). Quanto à comparação entre os índices de diversidade, o teste t mostrou diferença significativa entre as áreas da Indústria (P01) e Agrícola (P03) (t= 2,28; p=0,022), indicando que a área de captura P03 teve maior diversidade do que a P01. Entre as áreas da Indústria e da Rebio-Tinguá (P02) não houve diferença significativa quanto à riqueza de aves amostradas (t= -0,60; p= 0,545) assim como entre a Rebio-Tinguá e a área Agrícola (t= -1,41; p=0,158).

3.2 Carrapatos Coletados em Aves Silvestres

A ocorrência de aves parasitadas foi de 17,44% (109/625) onde foram coletados 458 carrapatos, sendo 88,2% (404/458) no estágio de larva (LL) e 11,8% (54/458) no estágio de ninfa. A maioria dos carrapatos, 99,8% (457/458), foi coletada em aves Passeriformes, sendo somente um carrapato coletado em *Leptotila verreauxi* da ordem Columbiformes.

Em Passeriformes, Dendrocolaptide (representada por seis espécies) foi a família que apresentou a maior abundância de carrapatos coletados, representando 49,12% (225/458) de carrapatos coletados no estudo. A prevalência de parasitismo nessa família foi de 62,06% (18/29) resultando assim, em uma IMP de 12,5 (225/18) carrapatos/ave, identificados como *A. longirostre*, *A. varium*, *A. ovale* e *A. naponense* (Tabela 2).

Tabela 2. Carrapatos coletados em aves da família Dendrocolaptidae capturadas em Nova Iguaçu- RJ.

Espécie	No Infestadas/N o capturadas	Prevalência (%)	Intensidade Média de Parasitismo	Carrapatos Larvas/Ninfas (<i>Amblyomma</i>)			
				<i>A. longirostre</i>	<i>A. varium</i>	<i>A. naponense</i>	<i>A. ovale</i>
<i>Dendrocincla turdina</i>	11/14	78,6	5,4	54/5	0/0	0/0	1/0
<i>Xiphorhynchus fuscus</i>	3/6	50	13,6	39/0	0/2	0/0	0/0
<i>Xiphorhynchus guttatus</i>	2/2	100	60,0	119/0	0/0	1/0	0/0
<i>Sittasomus griseicapillus</i>	2/3	66,6	2,0	3/1	0/0	0/0	0/0
Total	18/25	72	12,5	215/6	0/2	1/0	1/0

Amblyomma longirostre foi visivelmente dominante nas infestações encontradas nas aves coletadas pertencentes à Dendrocolaptidae. *Dendrocincla turdina* apresentou 78,6% (11/14) de prevalência de parasitismo e, considerando o relativo número de aves parasitadas desta família (n=18), esta espécie teve grande representatividade dentro das aves parasitadas. *Xiphorhynchus guttatus* (n=2) apresentou maior abundância de carrapatos e intensidade de infestação no presente estudo (n=120, IMP= 60), contudo esses carrapatos foram coletados em apenas dois espécimes capturados, sendo um deles encontrado com 99 carrapatos. Este dado eleva o valor da IMP desta espécie que por consequência influencia no valor de IMP desta família. Assim, retirando os 99 carrapatos do conjunto de dados, a IMP para *X. guttatus* e para Dendrocolaptidae, respectivamente, é 21 e 7,41 (126/17) de carrapatos/ave (Figura 10).



Figura 10. *Xiphorhynchus guttatus* (Passeriformes: Dendrocolaptidae) capturada na área da Rebio-Tinguá, região de Mata Atlântica situada no estado do Rio de Janeiro. Aves encontradas parasitadas por 99 carrapatos onde alguns desses estão demonstrados pela seta branca.

Xiphorhynchus fuscus foi a segunda ave com maior intensidade média de parasitismo (IMP de 13,66) parasitadas por *A. longirostre* onde um dos três indivíduos capturados parasitados apresentava uma alta infestação com 35 carrapatos.

A menor IMP registrada para Dendrocolaptidae foi para *S. griseicapillus* com 2 carrapatos/ave, coletada parasitada por *A. longirostre*.

Thraupidae (n= 154) foi a segunda família em abundância de carrapatos (n=65), e apresentou uma prevalência de parasitismo de 14,93% (23/154) dentre as aves capturadas, IMP de 2,82 (65/23) carrapatos/ave parasitada e 14,19% (65/458) dos carrapatos coletados no estudo identificados como *A. longirostre*, *A. nodosum* *Amblyomma* sp. e *Haemaphysalis* sp.

Nesta família, a espécie *Tachyphonus coronatus* foi a que apresentou maior IMP (10,66 (32/3)) dentre as espécies capturadas onde foram identificados *A. longirostre* e *Amblyomma* sp.

Outras espécies capturadas que compartilham os mesmos hábitos de *T. coronatus* como *Lanio melanops*, *Tangara sayaca*, *Saltator similis*, *Dacnis cayana* e *Tangara ornata* também foram encontradas parasitadas por *A. longirostre*. Isso reforça a possível utilização deste ambiente também por este ixodídeo.

Volatinia jacarina, espécie mais abundante em Thraupidae (n= 44), teve IMP de um carrapato por ave (6/6) identificados como *A. longirostre* e *Haemaphysalis* sp. e somente um indivíduo de *Tiaris fuliginosus* foi capturado e nele foi coletada uma ninfa de *A. nodosum*.

Pipridae (n= 51) foi a terceira família com maior abundância de carrapatos (n= 56), com uma prevalência de 45,1% (23/51) de aves parasitadas, IMP de 2,43 (56/23) carrapatos/ave e, 12,22% (56/458) dos carrapatos coletados. Os carrapatos coletados foram identificados como *A. longirostre* (LL= 34, NN= 9), *A. nodosum* (NN= 5), *Amblyomma* sp. (LL= 8).

No presente inquérito, *Manacus manacus* foi a espécie mais parasitada de Pipridae e apresentou 56,4% (22/39) de parasitismo onde foram coletados 55 (12%) carrapatos sendo 42 identificados como *A. longirostre* assim, atingiu uma IMP de 2,5 (55/22) carrapatos por ave parasitada. Detalhes do parasitismo estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3. Espécies de carrapatos parasitando aves silvestres capturadas na Mata Atlântica do Rio de Janeiro, Brasil. Período de maio de 2011 a abril de 2012.

Ordem, Família	Espécie	Nº infestadas/ Nº capturadas	P (%)	IMP	Nº carrapatos	Carrapatos
Columbiformes						
Columbidae	<i>Leptotila verreauxi</i> Bonaparte, 1855	1/2	50,0	1,0	1	L: Alo*
Passeriformes						
Cardinalidae	<i>Habia rubica</i> (Vieillot, 1817)	3/5	60,0	1,0	3	L: Alo
Dendrocolaptidae	<i>Xiphorhynchus</i> <i>guttatus</i> (Lichtenstein, 1820)	2/2	100,0	60,0	120	L: Alo, Ana*
	<i>Xiphorhynchus</i> <i>fuscus</i> (Vieillot, 1818)	3/6	50,0	13,6	41	L: Alo, Asp N: Ava*
	<i>Dendrocincla</i> <i>turdina</i> (Lichtenstein, 1820)	11/14	78,6	5,4	60	L: Alo, Aov N: Alo
	<i>Sittasomus</i> <i>griseicapillus</i> (Vieillot, 1818)	2/3	66,6	2,0	4	L: Alo
Formicariidae	<i>Formicarius colma</i> Boddaert, 1783	1/2	50,0	1,0	1	N: Aca*
Furnariidae	<i>Phacellodomus</i> <i>rufifrons</i> (Wied, 1821)	1/7	100,0	2,0	2	N: Aca*, Hsp*
	<i>Philydor</i> <i>atricapillus</i> (Wied, 1821)	2/6	33,3	3,0	6	L:Alo*, Asp*

	<i>Automolus leucophthalmus</i> (Wied, 1821)	1/2	50,0	8,0	8	L: Alo
Fringillidae	<i>Euphonia xanthogaster</i> Sundevall, 1834	1/1	100,0	2,0	2	L: Alo
Hirundinidae	<i>Stelgidopteryx ruficollis</i> (Vieillot, 1817)	1/23	4,3	1,0	1	N: Alo N: Alo*
Pipridae	<i>Manacus manacus</i> (Linnaeus, 1766)	22/39	56,4	2,5	55	L: Alo, Asp N: Alo, Ano
Rhynchocyclidae	<i>Dixiphia pipra</i> (Linnaeus, 1758)	1/2	50,0	1,0	1	N: Alo
	<i>Mionectes oleagineus</i> (Lichtenstein, 1823)	3/7	42,8	7,3	22	L: Alo
	<i>Mionectes rufiventris</i> Cabanis, 1846	2/7	28,6	2,0	4	L: Asp
	<i>Todirostrum cinereum</i> (Linnaeus, 1766)	1/1	100,0	1,0	1	L: Alo*
	<i>Leptopogon amaurocephalus</i> Tschudi, 1846	2/5	40,0	2,0	4	L: Alo, Asp
Tityridae	<i>Pachyramphus viridis</i> (Vieillot, 1816)	1/1	100,0	2,0	2	L: Asp*
Thamnophilidae	<i>Thamnophilus palliatus</i> (Lichtenstein, 1823)	5/11	45,5	2,8	14	L: Alo*, Asp
	<i>Dysithamnus stictothorax</i> (Temminck, 1823)	1/1	100,0	4,0	4	N: Alo, Ano*, Aca L: Alo*
Thraupidae	<i>Tachyphonus coronatus</i> (Vieillot, 1822)	3/3	100,0	10,6	32	L: Alo, Asp
	<i>Tangara sayaca</i> (Linnaeus, 1766)	2/21	9,5	1,0	2	L: Alo N: Alo
	<i>Saltator maximus</i> (Statius Muller, 1776)	1/2	50,0	3,0	3	L: Alo N: Alo*
	<i>Dacnis cayana</i> (Linnaeus, 1766)	1/9	11,1	1,0	1	L: Alo
	<i>Saltator similis</i> d'Orbigny & Lafresnaye, 1837	2/5	40,0	2,5	5	L: Alo, Asp
	<i>Tangara palmarum</i> (Wied, 1823)	1/4	25,0	1,0	1	L: Asp
	<i>Tangara ornata</i> (Sparrman, 1789)	1/1	100,0	1,0	1	N: Alo*
	<i>Lanio melanops</i> (Vieillot, 1818)	2/2	100,0	3,0	6	L: Alo, Asp

	<i>Sporophila caerulescens</i> (Vieillot, 1823)	2/20	10,0	3,0	6	L: Asp N: Alo
	<i>Volatinia jacarina</i> (Linnaeus, 1766)	6/44	13,6	1,0	6	L: Alo*, Asp, Hsp* N: Alo
	<i>Tiaris fuliginosus</i> (Wied, 1830)	1/1	100,0	1,0	1	N: Ano*
	<i>Haplospiza unicolor</i> Cabanis, 1851	1/2	50,0	1,0	1	L: Alo
Troglodytidae	<i>Troglodytes musculus</i> Naumann, 1823	1/14	7,1	1,0	1	L: Hsp*
Turdidae	<i>Turdus rufiventris</i> Vieillot, 1818	1/8	12,5	1,0	1	L: Asp
	<i>Turdus albicollis</i> Vieillot, 1818	2/18	11,1	2,0	4	L: Alo, Asp N: Alo
	<i>Turdus amaurochalinus</i> Cabanis, 1850	1/2	50,0	1,0	1	N: Alo
	<i>Turdus leucomelas</i> Vieillot, 1818	1/2	50,0	1,0	1	L: Alo
Tyrannidae	<i>Myiarchus ferox</i> (Gmelin, 1789)	1/5	20,0	1,0	1	N: Alo
	<i>Pitangus sulphuratus</i> (Linnaeus, 1766)	1/14	7,1	1,0	1	L: Alo
	<i>Elaenia flavogaster</i> (Thunberg, 1822)	2/21	9,5	1,0	2	N: Alo
	<i>Fluvicola nengeta</i> (Linnaeus, 1766)	1/3	33,3	1,0	1	L: Hsp*
	<i>Camptostoma obsoletum</i> (Temminck, 1824)	1/1	100,0	1,0	1	N: Alo*
	<i>Myiozetetes similis</i> (Spix, 1825)	1/3	33,3	3,0	3	L: Alo, Asp
	<i>Attila rufus</i> (Vieillot, 1819)	2/6	33,3	6,5	13	L: Alo*, Asp
Vireonidae	<i>Hylophilus thoracicus</i> Temminck, 1822	1/4	25,0	1,0	1	L: Alo*
Xenopidae	<i>Xenops minutus</i> (Sparrman, 1788)	1/1	100,0	3,0	3	L: Alo N: Alo
Piciformes						
Picidae	<i>Picumnus cirratus</i> Temminck, 1825	1/3	33,3	2,0	2	L: Alo*
Trogoniformes						
Trogonidae	<i>Trogon rufus</i> Gmelin, 1788	1/1	100,0	1,0	1	N: Aco*

P(%): prevalência de parasitismo; IMP: Intensidade média de parasitismo; L, larva; N, ninfa; Aca, *Amblyomma calcaratum*; Aco, *Amblyomma coelebs*; Alo, *Amblyomma longirostre*; Ano, *Amblyomma nodosum*; Ava, *Amblyomma varium*; Ana, *Amblyomma naponense*; Aov, *Amblyomma ovale*; Asp, *Amblyomma* sp.; Hsp, *Haemaphysalis* sp. * Novos registros de hospedeiros para a Mata Atlântica.

Somente fases imaturas (larvas e ninfas) foram encontradas, onde 99% (n=453) eram do gênero *Amblyomma*: *Amblyomma longirostre* (LL= 345; NN= 34), *Amblyomma nodosum* (NN= 13), *Amblyomma calcaratum* (NN= 3), *Amblyomma varium* (NN= 2); *Amblyomma coelebs* (NN=1), *Amblyomma naponense* (LL= 1), *Amblyomma ovale* (LL=1) e *Amblyomma* sp. (LL= 53). O gênero *Haemaphysalis* sp. foi representado por uma ninfa e quatro larvas, correspondendo a 1% dos carrapatos coletados (Tabela 4).

Novos hospedeiros de carrapatos parasitos de aves silvestres na Mata Atlântica foram observados para *A. longirostre*: *L. verreauxi*, *V. jacarina*, *P. atricapillus*, *S. ruficollis*, *T. cinereum*, *T. palliatus*, *D. stictothorax*, *S. maximus*, *T. ornata*, *C. obsoletum*, *A. rufus*, *H. thoracicus* e *P. cirratus*; para *A. nodosum*: *T. fuliginosus* e *T. palliatus*; para *A. calcaratum*: *P. rufifrons*, *F. nengeta* e *F. colma*; para *A. coelebs*: *T. rufus*; para *A. varium*: *X. fuscus*; *A. naponense*: *X. guttatus*; para *Haemaphysalis* sp: *V. jacarina*, *P. rufifrons* e *T. musculus* (Tabela 3).

Tabela 4. Abundância e prevalência das espécies de carrapatos coletadas em aves silvestres capturadas na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. Período de maio de 2011 a abril de 2012.

Espécies de carrapatos	Abundância	Larvas/Ninfas	Prevalência (%)
<i>A. longirostre</i>	379	345/34	82,75
<i>A. nodosum</i>	13	0/13	2,84
<i>A. calcaratum</i>	3	0/3	0,65
<i>A. coelebs</i>	1	0/1	0,22
<i>A. naponense</i>	1	1/0	0,22
<i>A. ovale</i>	1	1/0	0,22
<i>A. varium</i>	2	0/2	0,44
<i>Amblyomma</i> sp.	53	53/0	11,57
<i>Haemaphysalis</i> sp	5	4/1	1,09
Total	458	404/54	100

Amblyomma longirostre foi a espécie mais frequente, sendo encontrada em 79,6% (39/49) das espécies parasitadas, 70,64% (77/109) dos indivíduos parasitados e IMP de 4,9 (379/77) carrapatos por ave parasitada, sendo assim o ixodídeo mais abundante (n=379).

Larvas pouco ingurgitadas permitiam a visualização de caracteres inerentes à espécie *A. longirostre* que puderam ser identificadas com base nas características morfológicas da presença do par suplementar de “sensillum” campaniformes situados no dorso do idiossoma (Figura 11) que segundo Barros-Battesti et al (2005) permitem a diferenciação desta espécie das demais larvas do gênero *Amblyomma* que possuem descrição até o momento. É importante notar que as identificações geradas foram realizadas com estereomicroscópio com base no exame de características morfológicas, sem clarificação dos carrapatos. Isso foi necessário, uma vez que os carrapatos serão submetidos à análise molecular em uma data posterior, com o objetivo de avaliar suas microbiotas. Além disso, no momento da identificação, a técnica de extração de DNA microbiano não havia sido definida (ver abaixo).

No entanto, a fim de validar a técnica utilizada para identificação, foi tomada a decisão de extrair o DNA, utilizando o protocolo fenol:clorofórmio (Capítulo III), a partir de um subconjunto (106) de carrapatos identificados morfologicamente como larvas de *A. longirostre*. Análises do sequenciamento identificaram todas as amostras com 100% de similaridade com *A. longirostre* e serviu para validar totalmente as identificações morfológicas. As sequencias foram depositadas no GenBank.

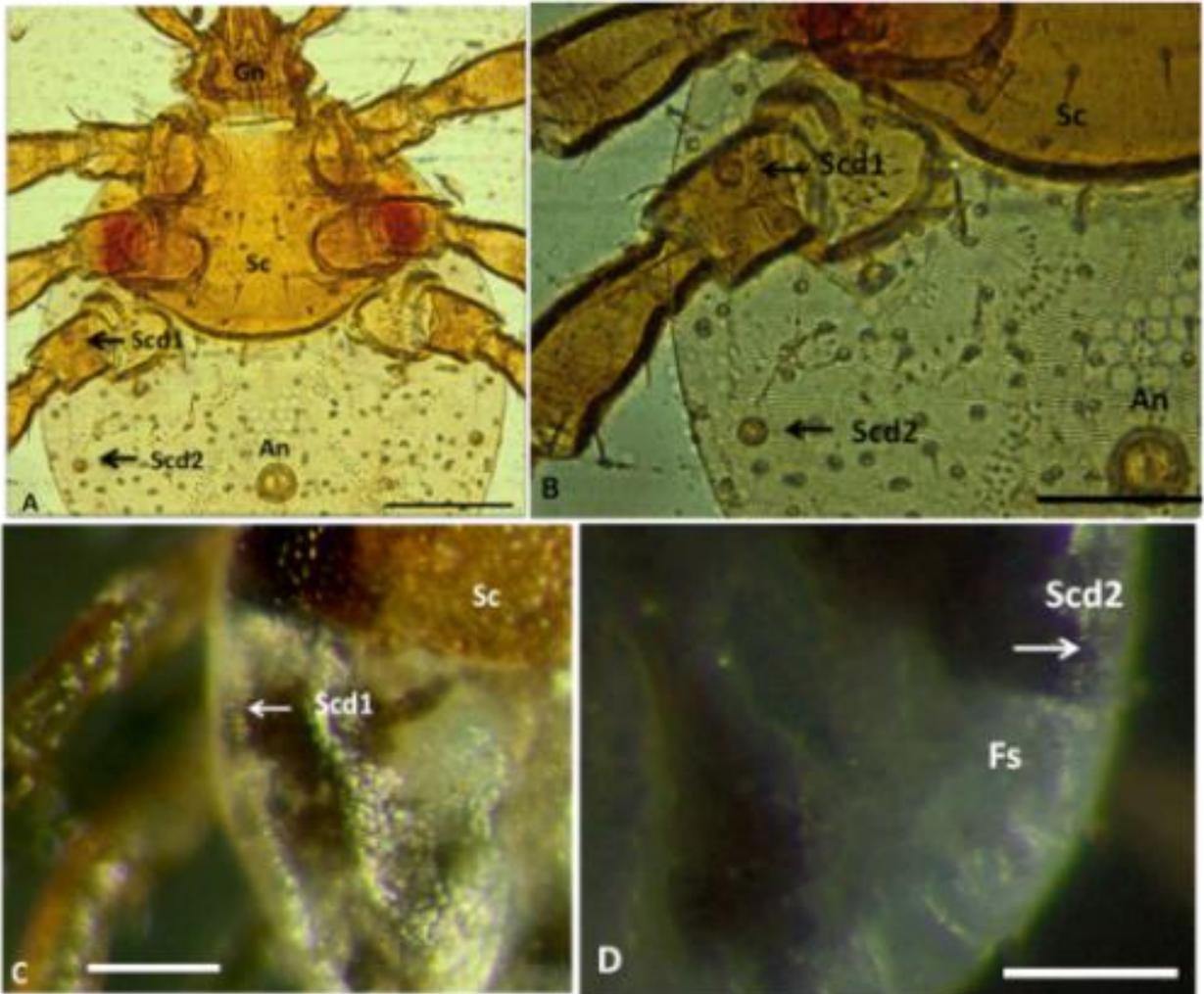


Figura 11. Larvas de *Amblyomma longirostre*. Superfície dorsal do idiossoma. A e B: Espécimes clarificados com ácido láctico. Setas pretas mostram os dois “sensillum” campaniformes dorsais (Scd1, Scd2). C e D: larvas não tratadas observadas em microscópio estereoscópico. As setas brancas mostram os dois “sensillum” campaniformes dorsais. Scd1 em C e Scd2 em D. Abreviações: Gn, gnatossoma; An, ânus; Sc, escudo; SCd, “sensillum” campaniformes dorsais (1 e 2); Fs, primeiro festão. Barra de escala: A, B = 0,05 mm; C, D = 0,2 mm.

Outro aspecto relevante do presente estudo foi com relação à distribuição das formas imaturas de *A. longirostre* ao longo do ano de coleta. Apesar das coletas terem sido realizadas durante um ano e da ausência de dados relativos à presença de adultos, foi possível observar a

distribuição neste período de larvas e ninfas. Larvas foram claramente dominantes nos meses mais quentes e úmidos (dezembro a abril), contudo mesmo seu pico tendo ocorrido no mês de janeiro foi possível coletar larvas até julho (Figura 12 A). Já a ocorrência de ninfas foi baixa ao longo do ano com dois pequenos picos um em junho e outro em outubro (Figura 12 B).

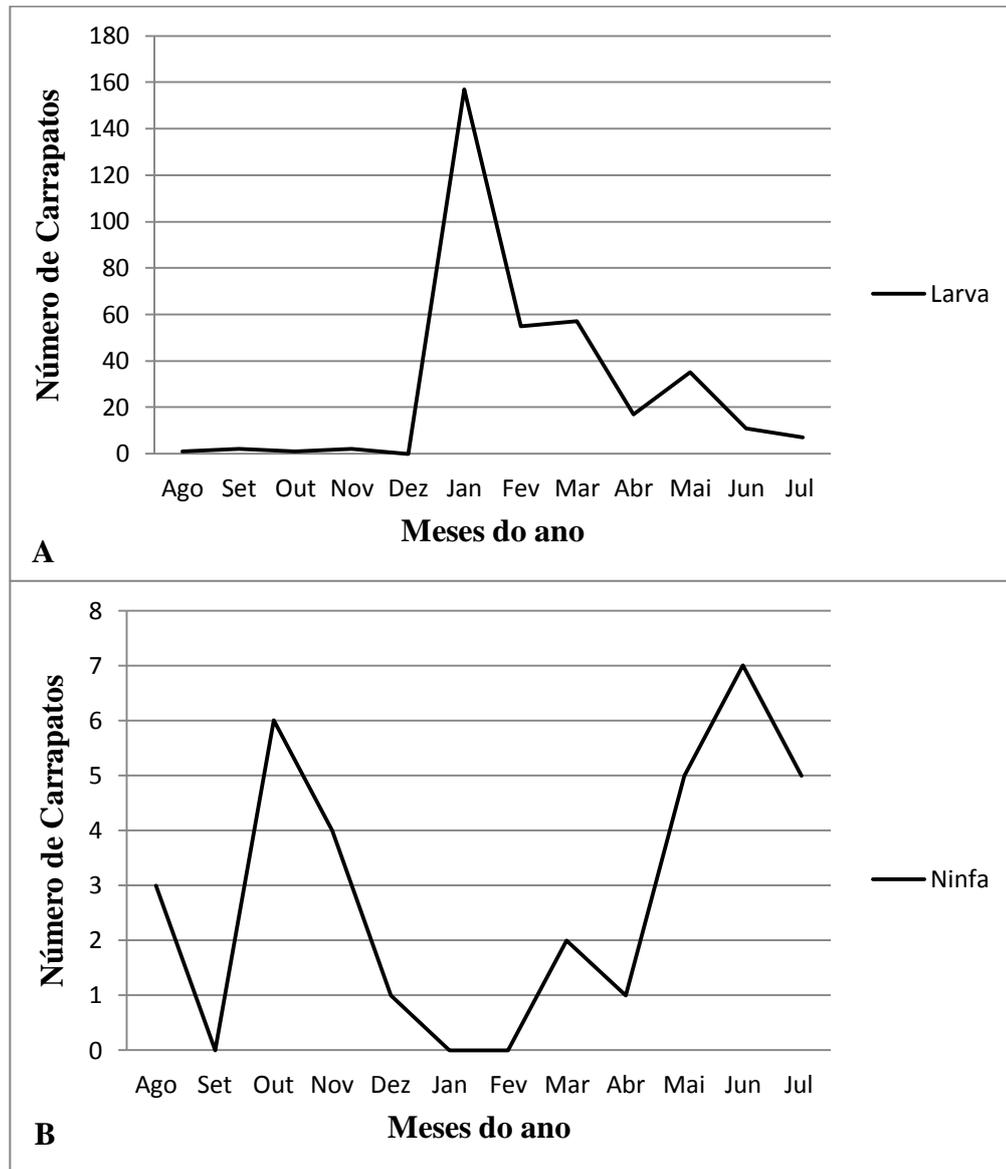


Figura 12. Distribuição dos carrapatos coletados ao longo do ano de captura para larvas (A) e ninfas (B) de *Amblyomma longirostre* parasitando aves silvestres em região de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro. Os carrapatos foram coletados no período de um ano, tendo início em maio de 2011 até abril de 2012.

Amblyomma nodosum foi a segunda espécie mais abundante parasitando aves no presente estudo (Tabela 4). Esta espécie foi coletada em *M. manacus* (NN=5), *T. fuliginosus* (NN=1) e *T. palliatus* (NN=7) com uma IMP de 4,33 carrapatos por ave parasitada. Este é o primeiro relato do parasitismo de ninfas de *A. nodosum* em *Tiaris fuliginosus* e *Thamnophilus palliatus* na Mata Atlântica.

Amblyomma varium (NN=2) coletado parasitando *X. fuscus*, assim como *A. coelebs* (NN=1) coletado em *T. rufus* foram as únicas espécies de ixodídeos encontradas nestes indivíduos com uma prevalência de parasitismo de 0,43% e 0,22%, respectivamente. Diferente do parasitismo registrado de *A. naponense* (LL=1) em *X. guttatus* e *A. ovale* (LL=1) em *D. turdina*, ambos com prevalência de 0,22%, encontrados em infestação mista com *A. longirostre* nestas aves. Uma ninfa de *A. calcaratum* também foi coletada em infestação mista com *Haemaphysalis sp.* (NN=1) em *P. rufifrons*. Em *T. palliatus* foi coletado *A. calcaratum* (NN=1) e uma larva identificada como *Amblyomma sp.*, entretanto, informações da possível infestação mista nesta ave só serão possíveis após a identificação desta larva a nível específico. Somente na ave *F. colma*, *A. calcaratum* (NN=1), foi coletado isoladamente, assim como os demais ixodídeos identificados como larvas de *Haemaphysalis sp.* que foram coletados nas aves *V. jacarina* (LL=2), *F. nengeta* (LL=1) e *T. musculus* (LL=1).

A ausência de chave para identificação de fases imaturas do gênero *Haemaphysalis* e para larvas de *Amblyomma* impossibilitou a classificação destes ixodídeos através de dados morfológicos. Além disso, as larvas identificadas como *Amblyomma sp.* (LL=53) não puderam ser classificadas a nível específico, pois foram coletadas em um estágio de ingurgitamento tão avançado, que impossibilitou a visualização dos caracteres utilizados para identificação de larvas de *A. longirostre*.

Dentre as 98 espécies de aves capturadas, 49 (n=109 indivíduos) foram encontradas parasitadas por pelo menos um carrapato. A IMP total de carrapatos nas aves parasitadas foi de 4,2 (458/109), quando a amostra com 99 carrapatos encontrados em *X. guttatus* foi incluída e de 3,3 (359/108) quando esta ave é retirada das análises dos dados. É importante mencionar que dentro dos grupos de aves capturadas que não apresentaram parasitismo por carrapatos, Passeriforme foi a que apresentou maior abundância (n=126). Outras três ordens, também, não apresentaram parasitismo por carrapatos: Apodiformes, Cuculiformes e Galbuliformes. Em Apodiformes, Trochilidae foi a família com maior abundância de aves capturadas e não parasitadas com 71 espécimes. (Tabela 5).

Tabela 5. Relação de aves silvestres capturadas e não parasitadas em região de Mata Atlântica do Rio de Janeiro no período de maio de 2011 a abril de 2012.

Ordem	Família	Espécies	Abundância
Apodiformes	Trochilidae	<i>Thalurania glaucopis</i> (Gmelin, 1788)	25
		<i>Glaucis hirsutus</i> (Gmelin, 1788)	5
		<i>Ramphodon naevius</i> (Dumont, 1818)	30
		<i>Eupetomena macroura</i> (Gmelin, 1788)	9
		<i>Phaethornis pretrei</i> (Lesson & Delattre, 1839)	1
		<i>Phaethornis eurynome</i> (Lesson, 1832)	1

Columbiformes	Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i> (Temminck, 1811)	54
		<i>Geotrygon montana</i> (Linnaeus, 1758)	1
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga ani</i> Linnaeus, 1758	2
		<i>Guira guira</i> (Gmelin, 1788)	1
Galbuliformes	Galbulidae	<i>Galbula ruficauda</i> Cuvier, 1816	1
Passeriformes	Estrildidae	<i>Estrilda astrild</i> (Linnaeus, 1758)	18
	Thraupidae	<i>Coereba flaveola</i> Cabanis, 1847	13
		<i>Conirostrum speciosum</i> (Temminck, 1824)	1
		<i>Hemithraupis flavicollis</i> (Vieillot, 1818)	2
		<i>Lanio cristatus</i> (Linnaeus, 1766)	2
		<i>Sicalis flaveola</i> (Linnaeus, 1766)	7
		<i>Sporophila angolensis</i> (Linnaeus, 1766)	1
		<i>Sporophila collaris</i> (Boddaert, 1783)	1
		<i>Sporophila frontalis</i> (Verreaux, 1869)	1
		<i>Sporophila nigricollis</i> (Vieillot, 1823)	2
		<i>Sporophila sp</i>	8
		<i>Tangara seledon</i> (Statius Muller, 1776)	1
		<i>Thlypopsis sordida</i> (d'Orbigny & Lafresnaye, 1837)	1
	Fringillidae	<i>Euphonia violacea</i> (Linnaeus, 1758)	5
		<i>Euphonia chlorotica</i> (Linnaeus, 1766)	2
		<i>Certhiaxis cinnamomeus</i> (Gmelin, 1788)	2
	Furnariidae	<i>Furnarius rufus</i> (Gmelin, 1788)	3
		<i>Furnarius figulus</i> (Lichtenstein, 1823)	4
		<i>Xenops rutilans</i> Temminck, 1821	1
	Xenopidae	<i>Pygochelidon cyanoleuca</i> (Vieillot, 1817)	3
	Hirundinidae	<i>Geothlypis aequinoctialis</i> (Gmelin, 1789)	1
	Parulidae	<i>Chiroxiphia caudata</i> (Shaw & Nodder, 1793)	10
	Pipridae	<i>Hemitriccus nidipendulus</i> (Wied, 1831)	1
	Rhynchocyclidae	<i>Corythopsis delalandi</i> (Lesson, 1830)	1

		<i>Hemitriccus orbitatus</i> (Wied, 1831)	2
		<i>Hemitriccus sp.</i>	1
		<i>Tolmomyias sulphurescens</i> (Spix, 1825)	2
	Onychorhynchidae	<i>Myiobius barbatus</i> (Gmelin, 1789)	3
	Turdidae	<i>Turdus flavipes</i> Vieillot, 1818	2
	Tyrannidae	<i>Myiophobus fasciatus</i> (Statius Muller, 1776)	12
		<i>Capsiempis flaveola</i> (Lichtenstein, 1823)	2
		<i>Tyrannus melancholicus</i> Vieillot, 1819	4
		<i>Elaenia chiriquensis</i> Lawrence, 1865	1
		<i>Tyrannus albogularis</i> Burmeister, 1856	1
	Dendrocolaptidae	<i>Lepidocolaptes angustirostris</i> (Vieillot, 1818)	2
		<i>Xiphocolaptes albicollis</i> (Vieillot, 1818)	2
		<i>Ramphastos vitellinus</i> Lichtenstein, 1823	1
Piciformes	Ramphastidae		1
Total			256

Ao se comparar o parasitismo nas três áreas estudadas foi observada uma relação positiva para a P(%) de parasitismo para a Rebio-Tinguá (P02), porém, não houve diferença para IMP de carrapatos parasitando aves silvestres entre esta área e a área da Indústria (P01). Contudo, as áreas P01 e P02 foram diferentes quanto a IMP da região Agrícola (P03) mostrando que a média de parasitismo destes dois pontos de coleta (P01 e P02) foi realmente maior. Ainda, com relação à infestação elevada encontrada na Rebio-Tinguá, de modo a evitar que os dados de *X. guttatus* mascarassem a estatística da comparação aplicada entre as prevalências (P) e intensidades média de parasitismo (IMP) das áreas de coleta, foi decidido também trabalhar os dados retirando esta ave com seus carrapatos da amostragem (P02²). Entretanto, os resultados se mantiveram como quando esta ave com 99 carrapatos estava inclusa (Tabela 6).

Tabela 6. Comparação do parasitismo de aves silvestres capturadas em três áreas de estudo situadas na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro. O teste de qui-quadrado utilizado para comparação das Prevalências e Kruskal-Wallis para intensidade média de parasitismo (IMP) a 5% de significância.

Local	Coordenadas	Hospedeiros				
		EX	NC	PAR	P(%)	IMP
P01	22°36 S 43°25'15" W	284	85	42	14.8a	2,0a (1-16)
P02¹	22° 45' S 43° 05' 40" W	171	351	54	31,5b	6,5a (1-99)
P02²	22° 45' S 43° 05' 40" W	170	252	53	31,1b	4,7 a (1-35)
P03	22°35' S 43° 24' W	170	22	13	7.6c	1,7b (1-7)

EX: Número de aves examinadas; NC: número de carrapatos coletados; PAR: Número de aves parasitadas; P(%) prevalência de parasitismo; IMP: intensidade média de parasitismo. Valores seguidos de mesma letra não diferem estatisticamente a 5% de significância.

4 DISCUSSÃO

4.1 Aves Capturadas

Estudos anteriores envolvendo capturas de aves na Mata Atlântica e outros biomas também registram a ordem Passeriformes como a mais abundante (LOURES-RIBEIRO et al. 2011, COPATTI et al. 2014). Esta ordem abriga a maioria das espécies do mundo, representando cerca de 60% das aves viventes (SICK, 1997), e apesar de bem adaptadas aos diversos ecossistemas, dominando os ambientes terrestres, é um grupo relativamente recente na escala evolutiva com seus primeiros registros fósseis datando do fim do Cretáceo (145 milhões e 65 milhões e 500 mil anos atrás) (ERICSON et al. 2002).

As aves *Manacus manacus*, *Stelgidopteryx ruficollis*, *Tangara sayaca* e *Elaenia flavogaster* assim como a mais coletada, *Volatinia jacarina*, compartilham características como a ampla distribuição geográfica, com registro em todo o território brasileiro, onde a maior concentração se encontra no leste do país, em regiões de Mata Atlântica sendo adaptadas à regiões de borda de mata e ambiente abertos (SICK, 1997). Não é incomum a visualização destas aves em bandos da mesma espécie, sendo *Tangara sayaca* avistada também em bandos mistos junto com outra espécie de sua família, como *Tangara palmarum* (sanhaçu-do-coqueiro) (SICK, 1997) também capturada neste estudo. *Stelgidopteryx ruficollis* (andorinha-serradoura) tem hábitos migratórios em grupos que ocorrem no sul do Brasil, contudo na região sudeste, onde este estudo foi realizado, são tidas como residentes (SICK, 1997).

Ordens não Passeriformes também foram capturadas em estudos da avifauna em região de Mata Atlântica de São Paulo, contudo Apodiformes e Columbiformes também foram as mais registradas (OGRZEWALSKA et al. 2011, 2012, 2013; SANCHES et al. 2013). Mesmo a ordem Columbiformes sendo representada nos demais estudos, *Columbina talpacoti* não é uma espécie frequentemente capturada, e quando capturada não apresenta uma grande abundância de indivíduos (COPATTI et al. 2013). Possivelmente isto se deve ao fato destas aves serem adaptadas a ambientes antropizados, sendo mais comum nas grandes cidades brasileiras, principalmente aquelas situadas no sudeste (SICK, 1997).

Rolinha-roxa (*C. talpacoti*), ave não Passeriforme mais coletada na área P01 não é uma espécie tipicamente florestal sendo encontrada em bordas de capoeiras. Contudo é muito frequente em centros urbanos onde é bem adaptada à presença humana (SICK, 1997). Sua abundância elevada neste ponto de captura se explica devido à fitofisionomia do ambiente tipicamente antropizado pela proximidade do local de implantação da indústria. Vasconcelos et al. (2007) também relacionou a presença desta ave, em suas capturas no Pará, ao tipo de ambiente estudado, que no caso se tratava também de uma área industrial. Isto é possível, pois ambientes degradados beneficiam espécies de aves, como *C. talpacoti*, que possuem maior flexibilidade em encontrar alimentos, assim, podendo forragear em ambientes urbanos (BRUMMELHAUS et al. 2012).

Dendrocolaptidae, família mais prevalente na área P02, tem distribuição restrita ao Neotrópico, onde é típica das florestas do Novo Mundo. No Brasil são registradas 43 espécies (CBRO, 2014) do qual *D. turdina* ocorre em toda extensão da Mata Atlântica, onde habitam o interior de matas primárias e secundárias, característica da área da Rebio-Tinguá (P02), apesar de também serem vistas em bordas e clareiras quando estão forrageando (SICK, 1997, IBAMA, 2006). Esta família é recorrente em estudos de parasitismo da avifauna capturada em região de Mata Atlântica de São Paulo (OGRZEWALSKA et al. 2011; 2012). Porém, *D.*

turdina não é uma espécie com registro de captura, em estudos desta natureza, neste bioma. Possivelmente isto é devido ao fato de *D. turdina* selecionar requisitos ecológicos mais específicos, não compartilhados com as demais espécies da família, como locais de floresta com uma estratificação vertical bem definida e um sub-bosque espaçado, comum em áreas menos antropizadas (POLETTO et al. 2004). O comportamento de forrageamento desta espécie limita sua abrangência em fragmentos florestais menores, sendo predominante a captura de insetos em voo e em substratos, assim como é característico da espécie o comportamento de seguir colunas de formigas de correição (WILLIS 1983, SICK, 1997; LOURES-RIBEIRO et al. 2011). Formigas de correição são sensíveis à fragmentação das florestas que habitam, pois necessitam de grandes áreas para estabelecerem seu nicho ecológico (GOMES et al. 2010), assim as aves que possuem o comportamento de seguir esses himenópteros, em ambientes afetados pelo desmatamento, são as primeiras espécies a desaparecerem desses locais (HARPER et al. 1989; WILLIS et al. 2008). Poletto et al. (2004) analisando populações de *D. turdina* em ambientes fragmentados concluíram que esta espécie de arapaçu é a menos propensa a persistir em fragmentos florestais na Mata Atlântica por serem sensíveis aos efeitos de borda, característico de fragmentos florestais. Estes fatores, intrínsecos à ecologia deste dendrocoláptídeo, explicam o porquê dos demais levantamentos que tiveram como local de estudo áreas de fragmentação, como aqueles realizados por Ogrzewalska et al. (2011; 2012); Sanches et al. (2013), Labruna et al. (2007) não apresentaram ambiente satisfatório ao estabelecimento de populações de *D. turdina*, ao contrário da área amostrada pela Rebio-Tinguá do presente estudo.

Aves pertencentes a Trochilidae, abundante na área P03, também foram registradas em outros estudos que capturaram aves silvestres em regiões de Mata Atlântica (OGRZEWALSKA et al. 2011; SANCHES et al. 2013). Beija-flores (Aves: Trochilidae), restritos ao novo mundo, são aves que desempenham importante papel ecológico na polinização de angiospermas devido ao seu hábito nectarívoro (MENDONÇA, ANJOS 2003). Sua captura é mais frequente em ambientes com pouca influência antrópica, pois são mais sensíveis às modificações física e biótica do hábitat que alteram a composição faunística e florística tendo nesta última o principal recurso alimentar deste grupo de aves (SICK, 1997; BUZATO et al. 2000). Assim a presença humana e a de outros animais incomuns ao habitat dos beija-flores (BUZATO et al. 2000), pode ser decisivo à sua presença em determinado ambiente, explicando a sua presença na Rebio-Tinguá e na área Agrícola que apesar de ser uma região com influencia antrópica possuía uma fitofisionomia favorável à estas aves.

Volatinia jacarina foi o passeriforme mais capturado nas áreas com influência antrópica (Indústria e Agrícola). Esta ave é comum em habitats abertos, capinzais altos e próximos a habitações (SICK, 1997), assim são frequentes suas capturas quando os locais estudados condizem com o habitat preferencial para esta ave, como o caso de seu registro em área de pasto em uma região originalmente de Mata Atlântica no estudo realizado por Ogrzewalska (2011) que analisou o efeito da fragmentação de habitats na composição da avifauna; e Sanches et al. (2013) em área de Mata Atlântica reflorestada.

A fragmentação de habitats tem consequência direta na riqueza da avifauna, alterando a composição de comunidade de aves, favorecendo a abundância de espécies mais adaptadas às mudanças ambientais, como a antropização (ONEAL; ROTENBERRY, 2009). A riqueza de aves da comunidade analisada da região Agrícola é explicada pela fitofisionomia local que, apesar de ter sido caracterizada como um ambiente modificado para atividade agrícola possuía atrativos para a avifauna. A presença de diferentes árvores frutíferas cultivadas aumentou a disponibilidade de recursos alimentares neste ambiente e associado à proximidade de fonte de água (as redes de neblina foram armadas às margens do rio Boa Esperança) e a um fragmento de mata mais preservado, possibilitou que este fosse um bom local para forrageamento de diversas espécies de aves. Brummelhaus, et al., (2012) associa a presença

destes fatores citados ao favorecimento da presença de espécies de aves de hábito frugívoro como *Turdus rufiventris*, *Tachyphonus coronatus* e *Tangara sayaca* que se tornam abundantes em ambientes alterados. A região da Indústria, ao contrário, foi mais abundante em espécies de aves que são mais generalistas na busca por alimentos. A antropização em áreas de mata ciliar estreita, também pode ser responsável pelo elevado número de aves em detrimento de sua riqueza favorecendo a frequência de espécies colonizadoras, como *C. talpacoti* (BORNSCHEIN et al. 2000; CHACE; WALSH, 2006; LUTHER et al., 2008).

Algumas espécies não foram restritas a somente uma área de captura, onde mesmo apresentando diferenças quanto à abundância em cada ponto estudado, foi capturada nas três áreas. As espécies *Myiarchus ferox*, *Turdus albicollis*, *Saltator similis*, *Tachyphonus coronatus*, *Manacus manacus*, *Stelgidopteryx ruficollis* e *Ramphodon naevius* estiveram presentes em todos os pontos amostrados. Dentre as espécies encontradas somente nas regiões da Indústria e Agrícola estão *Eupetomena macroura*, *Columbina talpacoti*, *Coereba flaveola*, *Sicalis flaveola*, *Sporophila caerulescens*, *Volatinia jacarina*, *Phacellodomus rufifrons*, *Furnarius rufus*, *Thamnophilus palliatus*, *Tangara sayaca*, *Saltator maximus*, *Dacnis cayana*, *Troglodytes musculus*, *Turdus rufiventris*, *Turdus flavipes*, *Turdus amaurochalinus*, *Pitangus sulphuratus*, *Myiophobus fasciatus*, *Elaenia flavogaster*, *Tyrannus melancholicus* e *Hylophilus thoracicus*. Estas espécies possuem características comuns como, a menor exigência na busca de recursos alimentares e adaptação à áreas abertas (SICK,1997). *Myiophobus fasciatus*, por exemplo, não penetram o interior de ambientes florestados, sendo comum em áreas alteradas, especialmente nos primeiros estágios de recuperação quando a capoeira está presente (SICK,1997). Além disso, estas aves são frequentes em fragmentos menores de mata ciliar, adaptadas aos “efeitos de borda” como, alterações microclimáticas, principalmente pelo aumento da luminosidade e a diminuição da umidade, que se seguem ao processo de fragmentação e se intensificam quanto menor for a área de cobertura vegetal (RODRIGUES et al. 2006). Com relação à área da Rebio-Tinguá, a maioria das espécies amostradas foi capturada somente neste ponto, pois era o mais distinto quanto fitofisionomia local. Assim, a ornitofauna coletada, também foi composta por espécies adaptadas a ambientes mais preservados. Com exceção das espécies *Euphonia violácea*, *Chiroxiphia caudata* e *Lanio cristatus* encontradas nas áreas da Rebio-Tinguá e Agrícola e *Picumnus cirratus* capturadas tanto na Rebio-Tinguá quanto na região da Indústria.

4.2 Carrapatos Coletados em Aves Silvestres

Em estudos de parasitismo por carrapatos na avifauna, são poucas as aves não Passeriformes capturadas parasitadas na Mata Atlântica e em outros biomas brasileiros (SOARES et al. 2009; OGRZEWALSKA et al. 2008; 2009; 2010; 2011a; COSTA-SANTOLIN et al. 2012; LUZ et al. 2012) que ratifica o único registro de ave não Passeriforme coletada parasitada deste estudo. Estudos prévios em regiões de Mata Atlântica também tiveram a maior ocorrência de parasitismo em aves Passeriformes (OGRZEWALSKA et al. 2008; 2009; 2011a) assim como no Cerrado (TOLESANO-PASCOLI et al. 2010; LUZ et al. 2012; PASCOAL et al. 2013; TORGA et al. 2013) e Amazônia (OGRZEWALSKA et al. 2010) sem considerar modificações naturais ou antrópicas. Levantamentos adicionais realizados em áreas antropizadas e originais da Mata Atlântica realizados por Ogrzewalska et al. (2011b) e em áreas reflorestadas por Sanches et al. (2013), ambos em São Paulo, também apontam os Passeriformes como a ordem mais parasitada. Este domínio de parasitismo em Passeriformes de diferentes biomas e em

diferentes níveis de preservação do local analisado pode ser explicado pelo fato desta ordem deter a maioria das espécies de aves nos biomas citados (SICK, 1997), além disso, a metodologia utilizada neste estudo, com rede de neblina (“mist net”), por ser armada próxima ao solo, seleciona aves que tem hábitos de sub-bosque que na sua maioria se encontra classificada como Passeriformes (HENRIQUES et al. 2008).

As poucas aves capturadas de outras ordens como os exemplares de Apodiformes, Columbiformes, Cuculiformes, Galbuliformes, Piciformes e Trogoniformes possuíam hábitos de sub-bosque, com exceção do tucano-de-bico-preto, *Ramphastos vitellinus ariel* (Piciformes), que apesar de habitar o dossel de florestas úmidas, tanto em seu interior quanto nas bordas, e em capoeiras altas (SICK, 1997) foi capturado, pois as redes-de-neblina estavam armadas em uma trilha na encosta de uma serra que nivelava essas redes com o dossel das árvores situadas mais abaixo. Assim, a coleta de aves não Passeriformes que permita uma melhor análise do parasitismo deve ter a metodologia de coleta seletiva ao tipo de habitat ocupado pela ave. Costa-Santolin et al. (2012) obteve numa área altamente antropizada *Vanellus chilensis* (Charadriiformes) como a espécie mais parasitada em seu estudo, justamente por ter associado a metodologia de coleta com redes “mist nest” à coleta seletiva para este caradriiforme, que ampliou seus dados de abundância e de parasitismo.

Dendrocincla turdina que teve maioria de seus espécimes coletados parasitados por *A. longirostre*, também foi registrada parasitada por este ixodídeo no levantamento de Arzua et al. (2005) e por *Amblyomma* sp. registrada por Ogrzewalska et al. (2011), contudo a captura deste dendrocolaptídeo nas demais investigações realizadas em regiões de Mata Atlântica não são corriqueiras. Já com relação à *X. guttatus*, coletado com um elevado número de larvas de *A. longirostre*, somente no trabalho de Ogrzewalska et al. (2011) foi relatado um indivíduo desta espécie de ave parasitada por *A. longirostre*, porém com infestação muito baixa sendo coletado somente 1 carrapato. Outros estudos não registraram a captura de *X. guttatus* em regiões de Mata Atlântica, tão pouco, aves altamente infestadas pertencentes à Dendrocolaptidae ou a outra família, como relatado neste indivíduo. Quanto a espécie *X. fuscus* que foi a segunda ave com maior intensidade média de parasitismo, também foi capturada por Labruna et al. (2007) onde dois estavam parasitados, contudo com uma intensidade de infestação de 3,5 carrapatos distribuídas entre as espécies *Amblyomma nodosum*, *A. longirostre* e *Amblyomma* sp. *S. griseicapillus*, ave com menor IMP encontrada, tem esse resultado corroborado por outros levantamentos parasitológicos na Mata Atlântica que coletaram esta ave com intensidade de parasitismo semelhante à encontrada aqui (LABRUNA et al. 2007; OGRZEWALSKA et al. 2009; 2012; SANCHES et al. 2013).

Mesmo capturando espécies diferentes de Dendrocolaptidae, das encontradas neste estudo, *A. longirostre* foi frequentemente coletado parasitando essa família, contudo, poucos carrapatos são coletados por ave, sendo que o número de ixodídeos dificilmente foi superior a um carrapato por ave capturada (ARZUA et al. 2005; 2007; LABRUNA et al., 2007; OGRZEWALSKA 2009; 2010; 2011; SANCHES et al. 2013).

Estas aves possuem hábito essencialmente insetívoro, além de adaptações morfológicas favoráveis à vida arborícola como tendões ossificados, pernas resistentes com garras extremamente fortes, cauda com penas semirrígidas com pequenos ganchos nos ápices funcionando como apoio que auxiliam a escalada de troncos. Seu nicho ecológico fica basicamente restrito às árvores onde além de seu forrageamento, são utilizadas durante sua nidificação aproveitando as cavidades deixadas nas mesmas por outras aves como pica-paus (SICK, 1997). Labruna et al. (2007) também relacionou o ciclo de *A. longirostre* à habitats arborícolas parasitando principalmente espécies de aves que tem seus nichos em árvores. Sendo assim, este ixodídeo desenvolveria todo seu ciclo biológico no alto das árvores onde o encontro com seus potenciais hospedeiros (mamíferos) se daria principalmente em animais de

hábitos arborícolas através dos quais se dispersariam. Isso é plausível, pois, carrapatos são artrópodes desprovidos de capacidade própria de locomoção a grandes distâncias, sendo as maiores distâncias alcançadas por estágios adultos de alguns ixodídeos se limitaria a um diâmetro de no máximo 10 m, sendo este valor reduzido a poucos centímetros quando se trata de estágios imaturos (PERRET et al. 2003; CROOKS, RANDOLPH, 2006; HERRMANN, GERN 2012). Assim, a dispersão através de seus hospedeiros permitiu a este ixodídeo ampla distribuição Neotropical sendo frequentemente encontrado em fases imaturas em aves silvestres e adultos em mamíferos hospedeiros da família Erethizontidae (Mammalia: Rodentia), do gênero *Coendou*, *Chaetomys* e *Sphiggurus* conhecidos popularmente como porco-espinho da árvore (ARAGÃO 1936; LABRUNA et al. 2007; SILVEIRA et al. 2008; NAVA et al. 2010; OGRZEWALSKA et al. 2010; TOLESANO-PASCOLI et al. 2010, LUZ et al. 2012). No presente estudo não foi analisado o parasitismo de mamíferos, contudo, a presença de *Sphiggurus villosus* (ourico-cacheiro) na região da REBIO Tinguá pode ser inferida com alta probabilidade de certeza, pois estes mamíferos são frequentemente atropelados na rodovia Rio de Janeiro-Juiz de Fora (BR-040) que atravessa a Rebio-Tinguá (BUENO, ALMEIDA, 2010).

Diante das altas infestações encontradas em indivíduos da família Dendrocolaptidae, é possível que devido às adaptações específicas à vida arborícola desenvolvida por esta família, tenha tornado-a ao longo da coevolução entre estes organismos, uma hospedeira favorável à infestação por *A. longirostre* devido à interposição de seus habitats. É claro que diversas espécies da avifauna se utilizam de nichos arborícolas, no entanto poucas restringem seu ciclo de desenvolvimento às árvores, como algumas espécies de aves da família Dendrocolaptidae (SICK, 1997).

Até o momento não existem relatos na literatura de uma alta infestação por *A. longirostre* em aves da família Dendrocolaptidae, porém sua ocorrência corriqueira em inquéritos parasitários, envolvendo aves silvestres, atesta a preferência de suas fases de larvas e ninfas como parasitos de uma gama de aves dentre Passeriformes e não Passeriformes (LABRUNA et al. 2007; OGRZEWALSKA et al. 2008, 2009, 2010, 2011a, 2012; TOLESANO-PASCOLI, et al. 2010; LUZ et al. 2012; PASCOAL et al. 2013).

Membros de Thraupidae infestados por carrapatos são frequentes em estudos de parasitismo da avifauna (LUZ, FACCINI, 2013). Esta família foi a segunda mais parasitada por *A. longirostre* e *A. nodosum* no Cerrado de Minas Gerais (TOLESANO-PASCOLI et al. 2010). Já Ogrzewalska et al. (2012) encontrou outras espécies de ixodídeos parasitando aves pertencentes à Thraupidae identificadas como *A.aureolatum*, *A.longirostre*, *A.parkeri*, *Amblyomma* sp., *H. leporispalustris* e *Ixodes* sp na Mata Atlântica de São Paulo. Na Amazônia além de *A. longirostre*, *A. humerale* também foi coletado em *Tachyphonus surinamus*, única espécie coletada por Ogrzewalska et al. (2010). Em contrapartida, Ogrzewalska et al. (2011) não relatou parasitismo no único traupídeo (*Dacnis cayana*) coletado na Mata Atlântica de São Paulo. Thraupidae é a segunda família em número de espécies ficando atrás de Tyranidae e pela tamanha diversidade de espécies, estas exibem uma ampla gama de padrões de forrageamento e comportamentos, bem como preferências de habitat (BURNS et al. 2014). Essa variedade de habitats ocupada pelas diferentes espécies de aves faz com que também, dependendo do habitat, diferentes espécies de carrapatos possam parasita-las. Assim a análise de parasitismo em Thraupidae vai depender da espécie em questão.

Quanto aos carrapatos encontrados nessa família, também em região de Mata Atlântica, mas no estado de São Paulo, Labruna et al. (2007) e Ogrzewalska et al. 2012 encontraram uma IMP de 2,2 carrapatos por ave parasitadas por *A. longirostre* e *Amblyomma* sp. Entretanto, outros ixodídeos como *A. aureolatum* (GUGLIELMONE et al. 2003), *A. cajennense* (ARZUA et al. 2005) e *A. calcaratum* (PACHECO et al. 2012) assim como ausência de parasitismo (OGRZEWALSKA et al. 2011) foram relatadas. O tiê-preto (*T. coronatus*), capturado parasitado neste estudo, é uma ave arborícola que habita florestas da Mata Atlântica sendo comum em bordas de mata e capoeirões. Ao forragear frutos, sementes, flores e insetos, essas aves movimentam-se de modo agitado revirando folhagens de árvores e arbustos (SICK, 1997) que é quando, por ventura, podem se infestar com *A. longirostre* de hábito arborícola (LABRUNA et al. 2007) ou por outras espécies de ixodídeos que por ventura encontrem estes hospedeiros.

Outro membro de Thraupidae, *V. jacarina*, apesar de ter sido encontrada parasitada nesse estudo, não é comumente capturada com carrapatos, no Cerrado (TOLESANO-PASCOLI et al. 2010; OGRZEWALSKA et al. 2013) e na Mata Atlântica de São Paulo (OGRZEWALSKA et al. 2009). Contudo, o único registro de carrapato nesta ave, relatou parasitismo por *A. cajennense* em ambiente antropizado em região originalmente de Mata Atlântica no Rio de Janeiro (COSTA-SANTOLIN et al. 2012).

O traupídeo *Tiaris fuliginosus*, coletada com uma ninfa de *A. nodosum*, não aparece como hospedeira no levantamento de Luz e Faccini (2013). Porém, apesar de escassas observações de parasitismo, tanto em *T. fuliginosus* quanto *V. jacarina*, possuem estreita relação com habitats alterados, descampados onde são associados à beira de matas, brejos, jardins e capinzais (SICK, 1997). A baixa prevalência de parasitismo encontrado neste estudo e no de Costa-Santolin et al. (2012) permitiram poucas inferências a respeito da relação parasito-hospedeiro encontradas neste ambiente. Ainda assim, a abundância elevada de espécimes de *V. jacarina*, capturadas sem carrapatos, pode significar que o ambiente ocupado por essa ave e *T. fuliginosus*, não tenha sido preferencial ao parasitismo. Isso, porque outras aves capturadas no mesmo ambiente e que ocupam o mesmo habitat, como as espécies de *Sporophila*, *Sicalis flaveola*, *Coereba flaveola*, também não foram reportadas com parasitismo por carrapatos.

Aves pertencentes à família Pipridae em outros estudos também registraram carrapatos como *A. longirostre*, *A. nodosum* e *Amblyomma* em aves capturadas na Mata Atlântica de São Paulo (OGRZEWALSKA et al. 2008; 2012), do Paraná (PACHECO et al. 2012) e na Amazônia (OGRZEWALSKA et al. 2010). No Cerrado foi a família mais abundante (n=63) representada somente por *Antilophia galeata*, com maior número de aves parasitadas (n=38) e com um número expressivo de carrapatos (n= 191) identificados como *A. longirostre* e *Amblyomma* sp. (TOLESANO-PASCOLI et al. 2010). Ogrzewalska et al. (2011) registrou *M. manacus* como a ave com maior número de indivíduos parasitados (sete aves parasitadas de 26 capturadas) onde foram coletados nove carrapatos dentre eles *A. longirostre*, *A. calcaratum*, *A. parkeri* e *Amblyomma* sp. Labruna et al (2007) também capturaram esta ave parasitada por *A. longirostre* e *A. nodosum* e associou seu parasitismo ao hábito arborícola e ao ato de forragearem no solo.

De fato, o hábito das rendeiras (*M. manacus*) pode explicar seu parasitismo por *A. longirostre* e *A. nodosum*. Estas aves tem hábito frugívoro auxiliando na dispersão de sementes sendo mais abundantes em estratos baixos das florestas neotropicais com maior ocorrência em florestas de Mata Atlântica (SICK, 1997). Os piprídeos possuem uma característica em seu comportamento do qual a maioria das espécies possui um repertório de atuações, formando intrincados rituais (SICK, 1997). Alguns desses rituais incluem saltos de um graveto vertical a outro até que no penúltimo salto a ave vai ao solo e de lá sobe verticalmente, num arranco mais violento, misto de pular e voar no intuito de alcançar um poleiro mais alto. Nestes movimentos a corrente de ar formada pelos saltos varre o solo fazendo com que a rendeira carregue consigo gravetos e folhas secas (SICK, 1997; CESTARI et al. 2012). Esses movimentos variados, saltando entre os galhos das árvores e entrando em contato com o solo podem determinar a congruência entre os habitats ocupados pelo *M. manacus* e pelos carrapatos que o parasitam e, assim, elevar a abundância de aves parasitadas por *A. nodosum* e *A. longirostre*.

O fato da maioria dos carrapatos terem sido coletados na fase de larva pode ser devido às fases imaturas serem mais generalistas e por isso muitas espécies utilizam aves como hospedeiras de larvas e ninfas que aproveitam a mobilidade destes hospedeiros para sua difusão geográfica (RANDOLPH, 2004; NAVA, GUGLIELMONE, 2013). Além disso, as intensidades de infestação foram relativamente elevadas, no presente estudo, se considerado que a maioria das aves foi parasitada somente por *A. longirostre*. A alta infestação em aves por carrapatos foi relatada por Ogrzewalska et al (2011) para espécie *Arremon flavirostris* (Aves: Passerellidae) obtendo-se uma média de 66,8 carrapatos entre os nove espécimes parasitados, contudo a ave relatada não estava parasitada por *A. longirostre*, sendo os carrapatos identificados como *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma sp.* Esta ave vive no chão, em área baixa das matas ciliares dos rios e baías, além das matas secas, contudo não ocorrem no Rio de Janeiro. Nenhum membro de Passerellidae foi coletado no presente estudo, apesar de existirem espécies desta família como o *Zonotrichia capensis*, que ocorrem na Mata Atlântica do Rio de Janeiro.

A coinfestação por diferentes espécies de carrapatos na mesma ave pode ser decorrente da variedade de habitat que a ave utiliza. No entanto a maior prevalência de uma espécie de carrapato em detrimento das outras, pode ser atribuída ao fato do hospedeiro e ectoparasitos compartilharem o mesmo habitat (KLOMPEN et al., 1996; KLOMPEN, GUGLIELMONE, 2013). Esta hipótese é ratificada pelos resultados obtidos na Mata Atlântica de São Paulo por Ogrzewalska et al. (2009, 2011b) que, mesmo obtendo a maioria das aves parasitadas dentro da ordem Passeriformes, não encontrou *A. longirostre* como carrapato dominante em suas coletas, provavelmente porque na região estudada, não ocorrem espécies dos gêneros *Coendou*, *Sphiggurus*, e *Chaetomys* (PASCOAL et al. 2013).

Apesar de ninfas de *A. longirostre* terem como hospedeiros preferenciais aves Passeriformes (NAVA et al. 2010), poucas ninfas foram coletadas nas aves capturadas neste estudo que teve maior ocorrência de parasitismo por larvas deste ixodídeo.

O elevado número de larvas coletado pode ter uma explicação ecológica, visto que carrapatos são animais r-estrategistas e assim, produzem um elevado número de descendentes a cada ciclo reprodutivo. Isto ocorre, pois estes animais têm poucas chances individuais de sobreviver até à idade adulta, podendo assim, apresentar picos populacionais em fases

imaturas, principalmente na fase de larva, já que há uma redução populacional à medida que a fase evolutiva do carrapato avança (SONESHINE 1993; RICKLEFS, 2003). Com relação à dinâmica populacional, Labruna et al. (2009) analisou a distribuição de larvas e ninfas de *Amblyomma* spp. coletadas em aves silvestres em Taubaté, São Paulo. Este autor verificou que larvas ocorriam entre os meses de março e setembro com picos de maio a julho de modo que nesse último mês houve maior número de larvas coletadas. Quanto a dinâmica apresentada pelas ninfas coletadas também por Labruna et al. (2009), mostrou que sua distribuição ocorreu de agosto à dezembro com picos nos meses de setembro e novembro.

A maioria das aves parasitadas por larvas de ixodídeos, principalmente *A. longirostre*, foram capturadas entre os meses de janeiro e maio, sendo que as aves destacadas nesse estudo como altamente infestadas (*X. fuscus* e *X. guttatus*) foram coletadas no mês de janeiro.

Ambas as distribuições de larvas e ninfas encontradas por Labruna et al. (2009) diferiram das encontradas para *A. longirostre* no estudo corrente. Porém, o que se destaca no estudo de Labruna é o fato de nenhuma larva ou ninfa ter sido coletada em aves nos meses de janeiro e fevereiro. Com relação a esta diferença, o que se pode salientar em primeiro lugar é o fato de apesar de Labruna ter tido maior ocorrência em seus dados de *A. longirostre* nas aves analisadas, a distribuição das fases dos carrapatos ao longo do ano incluiu todas as espécies de *Amblyomma* coletadas na avifauna estudada (maioria das larvas identificadas como *Amblyomma* spp. e cinco ninfas de *Amblyomma calcaratum*). Além disso, apesar de tanto o presente estudo quanto o de Labruna terem sido realizados em áreas originalmente de Mata Atlântica, sabe-se que esse bioma possui diferentes tipos de formação que são influenciados, dentre alguns fatores, pelo clima, altitude, umidade, espécies vegetais e localização latitudinal (LIMA, 2002). Estes fatores associados aos hospedeiros preferenciais podem ser determinantes na modificação do ciclo de carrapatos (PINHEIRO et al. 2014; CHACÓN et al. 2003).

Amblyomma nodosum foi a segunda (nove ninfas na Mata Atlântica da Bahia) e terceira (17 larvas na Mata Atlântica de São Paulo) espécie mais frequente, respectivamente nos estudos de Ogrzewalska et al. (2011a) e (2012). No Cerrado, *A. nodosum* também foi a segunda espécie (TOLESANO-PASCOLI et al. 2010) e a terceira mais coletada por Luz et al. (2012), enquanto que no mesmo bioma Pascoal et al. (2013) e na Mata Atlântica de São Paulo, Ogrzewalska et al. (2011) registram esta espécie como a mais coletada. Importante ressaltar que no bioma Cerrado a presença de imaturos de *A. nodosum* em aves está relacionada com a presença de seus hospedeiros principais para os adultos, mamíferos Xenarthra (PASCOAL et al. 2013). Embora não se tenha visualizado nenhuma espécie de Xenarthra durante o período de coleta, representantes desta ordem de mamíferos, apesar de mais comuns em regiões de Cerrado, estão distribuídos em todo o território nacional. Ainda, segundo Rocha et al. (2004) existem registros na Mata Atlântica do Rio de Janeiro para as espécies *Myrmecophaga tridactyla* e *Tamandua tetradactyla*. Ademais, embora não existam relatos de *A. nodosum* em populações silvestres de tamanduás na região do Rio de Janeiro, a presença de *A. nodosum* nas aves coletadas pode supor a presença destes mamíferos no ambiente estudado (KLOMPEN et al. 1996; KLOMPEN, GUGLIELMONE, 2013).

As baixas prevalências das espécies *A. calcaratum*, *A. ovale*, *A. coelebs* e *Haemaphysalis* sp. estão de acordo outros trabalhos realizados na Mata Atlântica (LABRUNA et al, 2007a; OGRZEWSKA et al. 2009, 2010, 2011b e 2012). Assim como em *A. nodosum*, os adultos de *A. calcaratum* tem preferência por mamíferos Xenarthra e suas fases imaturas são encontradas em aves (JONES et al, 1972; LABRUNA et al 2007a). Novos registros verificados para este ixodídeo nas aves *Phacellodomus rufifrons*, *Fluvicola nengeta* e *Formicarius colma* corroboram a utilização da avifauna como potencial hospedeiro.

Adultos de *A. coelebs* tem registros em antas (*Tapirus* spp.) da ordem Perissodactyla, Tapiridae (LABRUNA et al. 2005a; BARROS-BATTESTI et al., 2006), contudo suas ninfas já foram encontradas em mamíferos como onças (*Panthera onca* e *Puma concolor* L.) da ordem Carnivora, Felidae, gambás (*Didelphis albiventris*) Didelphimorphia, Didelphidae e humanos (LABRUNA et al. 2005a, 2005b). Já as aves se configuram hospedeiras de larvas e ninfas de *A. coelebs* onde foram encontrados em Coraciformes, Columbiformes, Galbuliformes e Passeriformes (OGRZEWALSKA et al. 2009; 2010) e agora com novo registro em Trogoniformes (*Trogon rufus*).

A baixa frequência de *A. ovale* (uma larva encontrada em *D. turdina*) encontrada nas aves parasitadas pode ter como explicação o fato de roedores como *Didelphis aurita* e *Euryoryzomys russatus* serem considerados hospedeiros principais de formas imaturas deste ixodídeo (SZABÓ et al., 2013) apesar de aves Thamnophilidae, Tyrannidae, Troglodytidae, Turdidae, Passerellidae e Cardinalidae também já terem sido registradas parasitadas por este ixodídeo (LUZ, FACCINI, 2013). Carnívoros como *Puma concolor* e *Panthera onca* são ditos hospedeiros preferenciais para fase adulta (LABRUNA et al., 2005b). Ambos os gambás e onças utilizam árvores e o solo em seus nichos ecológicos (MARTINS et al. 2008) o que aproxima seu habitat ao das aves descritas como hospedeiras de fases imaturas. Ainda, *D. aurita*, nidifica em ocos de árvores (PREVEDELLO et al. 2010), ambiente também utilizado por Dendrocolaptidae, na qual a única ave parasitada por este ixodídeo foi encontrada.

O relato de *A. naponense* pode ser relacionado a uma coleta acidental já que somente uma larva foi encontrada, apesar de ter sido pela primeira vez relacionado à *X. gutattus* (Dendrocolaptidae).

Amblyomma varium foi registrado pela primeira vez no estágio de ninfa em aves coletadas na Mata Atlântica. Este ixodídeo é comumente conhecido no Brasil como carrapato-gigante-da-preguiça, por ser encontrado frequentemente em mamíferos Bradypodidae e Magalonychidae (Xenarthra: Pilosa) (MARQUES et al. 2002; DANTAS-TORRES et al. 2010), larvas deste ixodídeo foram somente relatadas em aves silvestres na Amazônia do Peru (OGRZEWALSKA et al. 2012). Apesar da escassa informação a respeito dos hospedeiros para fases imaturas de *A. varium*, a possibilidade das aves silvestres e pequenos mamíferos serem os hospedeiros foi cogitada (MARQUES et al. 2002). *Amblyomma varium* apresenta alta especificidade parasitária em sua fase adulta, e é provável que a ausência deste carrapato nos demais inquéritos envolvendo aves silvestres na Mata Atlântica seja devido a ausência de seus hospedeiros na área. No estado do Rio de Janeiro são registradas preguiças das espécies *Bradypus torquatus* (preguiça-de-coleira) e *B. variegatus* (preguiça-comum) que pertencem ao grupo das preguiças de “três dedos” (MODESTO et al. 2008; BOFFY et al. 2010). Estas espécies têm como habitat preferencial Floresta Atlântica com distribuição de Sergipe ao Rio de Janeiro para *B. torquatus* e com distribuição ampla pelo Brasil para *B. variegatus* (HIRSCH e CHIARELLO, 2012). Seus hábitos arborícolas, movimentos lentos, relacionados à baixa taxa metabólica, tornam a espécie particularmente susceptível à predação, captura e falta de recursos alimentares quando exposta a ambientes não florestados (CHIARELLO et al., 2004) características que contribuíram para o atual status de vulnerabilidade pela Lista Vermelha (CHIARELLO et al. 2008). Ainda assim, são carentes as informações sobre a ocorrência e distribuição da população de preguiças no estado do Rio de Janeiro e isso cria lacunas de conhecimento da relação parasito-hospedeiro, principalmente, com relação aos hospedeiros de fases imaturas de *A. varium*. Sendo assim, apesar do novo registro de ocorrência em *X. fuscus* ter sido relatado, estudos futuros serão necessários para a melhor compreensão da ecologia deste ixodídeo.

A diferença entre a abundância de carrapatos do presente resultado, mais comum na área preservada Rebio-Tinguá – P02 (Tabela 6) e o resultado obtido por Ogrzewalska et al (2009; 2011b), mais comum em uma área degradada e Sanches et al. (2013) em área reflorestada de Mata Atlântica, pode ser inferida pela abundância de diferentes espécies de carrapatos. *Amblyomma longirostre* foi a espécie mais abundante nesse levantamento, enquanto *A. nodosum* foi a mais abundante no levantamento de Ogrzewalska et al (2011b) e *A. calcaratum* mais abundante na avifauna analisada por Sanches. Embora outros fatores como metodologia de coleta, diferentes espécies de aves capturadas e de ambiente para citar algumas, não possam ser descartadas, a ecologia dos hospedeiros principais para estes ixodídeos é primordial para a compreensão da distribuição parasitária.

Amblyomma nodosum e *A. calcaratum* tem como hospedeiros principais mamíferos da super ordem Xenarthra. Estes mamíferos ocorrem com mais frequência em áreas abertas como em campos e cerrados e apesar de também estarem distribuídos em ambientes de florestas (CHEBEZ, 1994; PARERA, 2002; BRAGA, 2004) onde são dependentes devido à limitada habilidade termo regulatória (RODRIGUES et al., 2008), é possível que as áreas degradadas analisadas por Ogrzewalska et al. (2011) oferecessem os recursos necessários aos hospedeiros de *A. nodosum*. Outro fator para a presença dos hospedeiros de *A. nodosum* e *A. calcaratum* em ambientes fragmentados é a existência de algum grau de liberação ecológica pela exclusão de seus competidores ou predadores em áreas fragmentadas como suposto por Zimbres et al. (2013). Este mesmo autor, quando analisou o efeito da fragmentação sobre a comunidade de mamíferos Xenarthra no cerrado brasileiro, verificou a maior abundância desses animais em áreas mais fragmentadas. Assim, estudos que observam um aumento populacional de ixodídeos em áreas consideradas degradadas, se justificam devido ao repertório comportamental de alguns hospedeiros mamíferos que são menos sensíveis a antropização e conseguem se adaptar em ambientes degradados aumentando sua população e consequentemente a de seus carrapatos (NUPP, SWIHART 1996; ALLAN et al. 2003).

A maior prevalência de *A. longirostre* no presente estudo é corroborada em estudos de Labruna et al. (2007; 2009), Ogrzewalska et al. (2008) realizados em áreas de Mata Atlântica e por Sanches et al. (2013) que também coletou este ixodídeo em fragmentos reflorestados mais antigos de Mata Atlântica. O porco-espinho possui hábitos arborícolas e predominantemente florestais, utilizando o chão somente quando o seu deslocamento pelas copas e galhos não é possível e para defecar (OLIVEIRA, 2008). Isso pode explicar a maior abundância de *A. longirostre* em áreas florestadas ou menos antropizadas (PASCOAL et al. 2012) e ainda a sua maior presença em fragmentos reflorestados mais antigos como verificado por Sanches et al. (2013).

A relevância da presença de áreas preservadas para manutenção de uma elevada população de *A. longirostre* comparada às áreas mais antropizadas na região estudada, demonstra que as relações ecológicas entre esta espécie de ixodídeo e seus fatores abióticos, na região em que foi coletado, devem ser analisadas em sua individualidade. A importância das variáveis abióticas individuais para cada região e a espécie do carrapato é considerada em muitos estudos como determinantes para uma real correlação do desmatamento de áreas florestais e o tamanho de populações de ixodídeos (LI et al. 2012; WOOD, LAFFERTY, 2013).

Em conclusão, este capítulo demonstrou a relevância de inquéritos parasitológicos envolvendo carrapatos e aves silvestres em remanescentes de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro tendo em vista os novos registros de aves hospedeiras relatadas. Adicionalmente ampliou-se o conhecimento existente entre ixodídeos e a avifauna silvestre, principalmente para *A. longirostre*. Este ixodídeo além de se confirmar como a espécie parasita de aves silvestres da Mata Atlântica, demonstrou estreita relação com a família Dendrocolaptidae que devido ao seu habitat arborícola, apresentou alta prevalência de parasitismo e IMP nas

espécies positivas para *A. longirostre*. Adicionalmente mostrou-se uma alternativa para a identificação de larvas de *A. longirostre* através da descrição feita por Barros-Battesti, et al. (2005) sem a necessidade de clarificação dependendo do estado de ingurgitamento da larva coletada. Dados como estes são de extrema importância para Mata Atlântica já que este bioma sofreu e sofre destacada redução de abrangência na região Neotropical.

CAPÍTULO II

DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RICKETTSIA SPP. POR PCR- POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRIÇÃO/ “RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM” (PCR-RFLP) EM CARRAPATOS COLETADOS DE AVES DA FAMÍLIA DENDROCOLAPTIDAE

RESUMO

COSTA-SANTOLIN, Ísis Daniele Alves. **Capítulo II: Detecção e identificação de *Rickettsia* spp. por PCR-Polimorfismo de Fragmentos de Restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism” (PCR-RFLP) em carrapatos coletados de aves da família Dendrocolaptidae.** 2014. 18p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Rickettsioses transmitidas por carrapatos são doenças zoonóticas graves e potencialmente ameaçadoras à vida. A detecção e identificação de bactérias do gênero *Rickettsia* em populações de carrapatos tornaram-se mais fáceis e precisas nos últimos 25 anos, devido ao desenvolvimento de métodos baseados em biologia molecular. Atualmente, sete espécies de *Rickettsia* foram descritas nos carrapatos brasileiros, utilizando PCR para a detecção e sequenciamento de “amplicons” para a identificação. A análise *in silico* de sequências que codificam os genes *gltA*, *htrA* e *ompB* dessas espécies foi realizada e revelou ser a base para um novo método de PCR-RFLP, que permite a identificação diferencial das sete espécies brasileiras. O método foi avaliado utilizando larvas e ninfas de *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma naponense* e *Amblyomma varium* coletadas em aves da família Dendrocolaptidae, na Reserva Biológica do Tinguá, no estado do Rio de Janeiro. A espécie “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” foi identificada em 93,5% (129/138) dos *A. longirostre* examinados, enquanto que as outras três espécies de carrapatos foram PCR negativos. O método básico emprega as endonucleases de restrição *MspI* e *RsaI* e pode ser realizada no decurso de um único dia de trabalho. Dispõe de um conveniente e rentável meio para executar a análise em grande escala de populações de carrapatos, e deve ser um benefício para os pesquisadores que não dispõem de recursos financeiros ou técnicos necessários para a identificação baseado no sequenciamento.

Palavras Chaves: *Rickettsia*, detecção, PCR-RFLP.

ABSTRACT

COSTA-SANTOLIN, Ísis Daniele Alves. **Chapter II: Detection and identification of *Rickettsia* spp. Polymorphism by PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism/ "Restriction Fragment Length Polymorphism" (PCR-RFLP) in ticks collected from birds of Dendrocolaptidae family.** [Capítulo II: Detecção e identificação de *Rickettsia* spp. por PCR-Polimorfismo de Fragmentos de Restrição/ "Restriction Fragment Length Polymorphism" (PCR-RFLP) em carrapatos coletados de aves da família Dendrocolaptidae.] 2014. 18p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Tick-borne rickettsioses are serious and potentially life threatening zoonotic diseases. The detection and identification of *Rickettsia* bacteria in tick populations have become easier and more precise during the last 25 years as result of the developmental of robust molecular biology based methods. Currently, seven species of *Rickettsia* have been described in Brazilian ticks, using PCR for detection and amplicon sequencing for identification. *In silico* analysis of sequences encoding the *gltA*, *htrA* and *ompB* genes of those species was performed and revealed the basis for a novel PCR-RFLP method that allows their differential identification. The method was evaluated using larvae and nymphs of *Amblyomma longirostre*, *A. naponense*, *A. ovale* and *A. varum* collected from birds in the Tinguá Biological Reserve, in Rio de Janeiro State. The species "*Candidatus Rickettsia amblyommii*" was identified in 93,5% (129/138) of the *A. longirostre* examined, while the other two tick species were PCR negative. The basic method employs the restriction endonucleases *MspI* and *RsaI* and can be performed in the course of a single working day. It offers a convenient and cost effective means to perform large scale analysis of tick populations, and should be of benefit to researchers who lack the financial or technical resources necessary for sequence based identification.

Key words: *Rickettsia*, detection, PCR-RFLP.

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos despertam interesse em diversos seguimentos, principalmente os que envolvem a saúde pública por desempenharem papel na disseminação de enfermidades além de serem capazes de causar condições tóxicas graves, como paralisia e intoxicação, irritação e alergia, devido ao seu comportamento hematofágico. Estão entre os artrópodes que transmitem a maior variedade de microrganismos patogênicos, dentre eles, protozoários, rickettsias, espiroquetas e vírus (JONGEJAN, UILENBERG, 2004, DANTAS-TORRES, et al. 2012b).

Animais silvestres e carrapatos representam um dos principais reservatórios de patógenos de importância médica e veterinária, onde estes últimos podem servir também, em alguns casos, amplificadores de patógenos como sugerido por Socolovschi et al. (2009) que demonstraram a transmissão transovariana de *Rickettsia conorii* por várias gerações de *Rhipicephalus sanguineus*. Atualmente está bem estabelecido que o parasitismo acidental de carrapatos no homem é responsável pela disseminação de doenças que antes foram restritas à vida silvestre e este ocorre devido à inter-relação estabelecida pelo homem e o ambiente natural (DANTAS-TORRES et al. 2012b).

A diversidade de ambientes ocupados por carrapatos, seus hospedeiros naturais e os possíveis patógenos que circulam nessa relação entre parasito-hospedeiro, são importantes aspectos a serem considerados quando se necessita ampliar o conhecimento a respeito das possíveis doenças associadas a estes ectoparasitos (DANTAS-TORRES et al. 2012b). Outros fatores como a urbanização, o desmatamento de ambientes naturais devido ao intenso crescimento demográfico em países desenvolvidos e em desenvolvimento, o impacto da recente crise econômica, maior movimento global de pessoas e animais de companhia, as mudanças climáticas globais, expande os padrões de distribuição, tanto em áreas endêmicas e/ou anteriormente não endêmicas de vetores e hospedeiros naturais e acidentais. Isso permite a emergência e re-emergência de doenças, antes restritas ao ambiente natural, transmitidas por artrópodes (COLWELL et al. 2011; LÉGER et al. 2013) como as rickettsioses que com a redução de áreas florestadas aumentam as chances de dispersão para populações humanas (OGRZEWALSKA et al., 2011; PAROLA et al., 2013).

Dentre os alguns carrapatos e patógenos causadores de enfermidades que atingem o homem estão a Borreliose de Lyme causada pela *Borrelia burgdorferi* sensu lato carreada pelos *Ixodes hexagonus*, *I. pacificus*, *I. persulcatus*, *I. ricinus*, *I. scapularis*; Anaplasmose Granulocítica Humana que tem por responsável o agente *Anaplasma phagocytophilum* tendo por vetores *Haemaphysalis concinna*, *H. punctata*, *Ixodes ricinus*, *I. pacificus*, *I. scapularis*, *Rhipicephalus bursa*; Erliquiose Monocítica Humana causada pela *Ehrlichia chaffeensis* e transmitida pelo *Amblyomma americanum*; Babesiose causada por *Babesia divergens* e *B. microti* que tem os vetores *Ixodes ricinus* e *I. scapularis*; Febre Q causada por *Coxiella burnetii* que tem dentre as espécies de carrapatos vetores o *Amblyomma triguttatum* e *Dermacentor marginatus*, Tularemia causada por *Francisella tularensis* que entre os vetores estão *D. variabilis*, *D. andersoni* e *Amblyomma americanum* (DANTAS-TORRES et al. 2012b).

As rickettsioses estão entre as zoonoses mais conhecidas transmitidas por carrapatos e são alvos de diversos inquéritos envolvendo patógenos de ixodídeos encontrados em animais domésticos e silvestres (PAROLA et al 2013). São bactérias Gram-negativas intracelulares obrigatórias pertencentes à Classe α -Proteobactéria, ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae, que variam de endossimbiontes aparentemente inofensivos como *Rickettsia bellii*, a agentes etiológicos de doenças que acometem a vida animal e humana como *R. rickettsi*. Associadas a artrópodes, vivem como simbioses na microbiota do artrópode vetor

requerendo também um hospedeiro vertebrado para sobreviver e reproduzir (HACKSTADT, 1996; PERLMAN et al. 2006; ABDAD et al. 2011; PAROLA et al. 2013).

São divididas classicamente em três grupos: o grupo tifo (GT), que inclui os agentes etiológicos do tifo epidêmico, *Rickettsia prowazekii*, e tifo murino, *R. typhi*; grupo da febre maculosa (GFM), que inclui o agente da febre maculosa do Mediterrâneo, *R. conorii*, febre maculosa, *R. rickettsii*, febre maculosa africana, *R. africae*, febre maculosa transmitidas por pulga, *R. felis* e o “pox rickettsial” causado pela *R. akari* (MERHEJ, RAOULT 2011); o grupo ancestral (GA) do qual pertencem *R. bellii* e *R. canadensis* (STOTHARD et al., 1994; STOTHARD e FUERST, 1995). Porém Gillespie et al. (2007) separaram *R. akari* e *R. felis* da antiga classificação, colocando-as no chamado Grupo de Transição (GTR), pois apresentam características fenotípicas e genotípicas que são intermediárias aos grupos GFM e do GT. Merhej e Raoult (2011) sugerem baseados em comparações genômicas que *R. bellii* e *R. canadensis* sejam colocados em grupos separados com base principalmente em propriedades antigênicas.

Rickettsioses transmitidas por carrapatos são infecções zoonóticas, com distribuição global, causada por bactérias intracelulares pertencentes ao grupo da febre maculosa (GFM) do gênero *Rickettsia* (PAROLA et al. 2013). No entanto, devido aos sintomas compartilhados com outras infecções virais e bacterianas, acredita-se que muitas rickettsioses humanas são mal diagnosticadas (ABDAD et al. 2011). Rickettsioses podem ser determinadas por métodos imunológicos, cultura de células ou através de técnicas moleculares, como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR – RFLP), técnicas de amplificação isotérmica e cada vez mais por sequenciamento de nucleotídeos (PAROLA et al., 2013).

Antes de 2004, a única espécie de *Rickettsia* associada a carrapatos documentados no Brasil foi *Rickettsia rickettsii* que é o agente etiológico de Febre Maculosa Brasileira (FMB) encontrada nos ixodídeos *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* (PINTER, LABRUNA 2006), e *Rhipicephalus sanguineus* (CUNHA et al. 2009; GEHRKE et al. 2009; PACHECO et al. 2011; ALMEIDA et al. 2013). No entanto, durante a última década no Brasil, outras espécies de patogenicidade indeterminada têm sido relatadas, como *R. bellii* encontrada associada a *Amblyomma ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. sculpturatum*, *A. humerale*, *A. rotundatum*, *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. incisum*, *A. nodosum*, *Ixodes loricatus* e *Haemaphysalis juxtakochi* (PAROLA et al. 2013); *Rickettsia monteiroi* encontrada em *A. incisum* (PACHECO et al. 2011) e *Rickettsia rhipicephali* em *H. juxtakochi* (LABRUNA et al. 2005, 2009a). Espécies provavelmente patogênicas como *R. parkeri* associada a *A. triste* (SILVEIRA et al. 2007); *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica ou cepa Bahia (SPOLIDORIO et al. 2010; SILVA et al. 2011). Existem também espécies que ainda não foram validadas ou com descrição incompleta incluindo “*Candidatus Rickettsia amblyommii*”, encontrada em associação com *Amblyomma coelebs*, *A. geayi*, *A. cajennense*, *A. auricularium* e *Amblyomma longirostre* que também foi encontrado infectado com as cepas AL e ARANHA, as quais são geneticamente relacionadas a esta *Rickettsia* (OGRZEWALSKA et al. 2008, 2010; LABRUNA et al. 2011; SARAIVA et al. 2013). Exemplos adicionais destas “novas” *Rickettsias* são as cepas NOD, COOPERI e ApPR (que têm sido encontradas em diversas espécies de *Amblyomma* dentre elas *A. nodosum*, *A. parkeri*, *A. longirostre*) que apesar de não elucidada taxonomicamente tem proximidade filogenética com *R. parkeri*, *R. africae*, *R. sibirica*, e a cepa Mata Atlântica (OGRZEWALSKA et al. 2009, 2012; PACHECO et al. 2012; ALMEIDA et al. 2013). Por último a cepa Pampulha encontrada até o momento exclusivamente em associação com *A. dubitatum* (ALMEIDA et al. 2011; SPOLIDORIO et al. 2012) estando relacionada filogeneticamente às espécies *R. tamurae* e *R. monacensis*.

Até o momento “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” tem sido a espécie mais frequentemente isolada em carrapatos coletados em aves silvestres no Brasil, contudo seu potencial patogênico para os seres humanos ou animais ainda não foi elucidado (OGRZEWALSKA 2010, LABRUNA et al. 2004, LABRUNA et al. 2011, PAROLA et al. de 2013, SARAIVA et al. 2013). Porém é pertinente observar que dados baseados em vigilância sorológica de cães na região do Pantanal do Brasil forneceram evidências de que a infecção por “*Ca. Rickettsia amblyommii*” provavelmente ocorre via *A. cajenennse* (MELO et al. 2011). Orgzewalska et al. (2012) em inquéritos na Mata Atlântica de São Paulo, também registraram altos níveis de soro-conversão em pequenos mamíferos e detectaram, através da PCR, “*Ca. Rickettsia amblyommii*” em 41,7% dos carrapatos *A. longirostre* coletados em aves, demonstrando ampla distribuição e a circulação desta rickettsia em populações de animais silvestres e domésticos no Brasil.

Outra espécie associada a aves no Brasil é *R. parkeri*, especificamente a cepa NOD encontrada associada a *A. nodosum*, *A. calcaratum* e *A. longirostre* coletados em Floresta Atlântica Semidecidual dos estados do Paraná e São Paulo (OGRZEWALSKA et al. 2009, 2011a; PACHECO et al. 2012; OGRZEWALSKA et al. 2013). Aves se deslocam por longas distâncias em diversos ambientes e por isso, podem atuar como excelentes dispersoras de ixodídeos que, neste caso tem relevância epidemiológica devido à proximidade filogenética da cepa NOD de rickettsias do GFM (OGRZEWALSKA et al. 2013).

Avanços significativos na nossa compreensão da biologia, ecologia e epidemiologia das rickettsioses transmitidas por carrapatos no Brasil foram realizados na última década (PAROLA et al. 2013). No entanto, o contínuo progresso neste campo vai depender do desempenho de levantamentos em grande escala de populações de carrapatos utilizando a detecção e métodos de identificação molecular. Os custos e alto nível de habilidade técnica necessária para realizar com competência metodologias baseadas no sequenciamento tornam o uso dessa abordagem impraticável para muitos laboratórios.

Numa tentativa de resolver esta limitação, o presente estudo empregou métodos baseados na bioinformática para desenvolver um protocolo robusto de detecção molecular e de baixo custo, com base na análise da Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição de (PCR-RFLP), o qual pode ser utilizado como uma alternativa ao sequenciamento. Além disso, relatamos a aplicação deste método para a detecção e identificação de *Rickettsia* em carrapatos *A. longirostre* coletadas de aves na Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de Carrapatos Coletados da Família Dendrocolaptidae

Um total de 225 carrapatos foi coletado de 18 aves da família Dendrocolaptidae (metodologia de captura das aves e coleta dos carrapatos descrito no Capítulo I ítem 2.2). Deste total, 138 tiveram o DNA extraído utilizando o protocolo de extração com fenol:clorofórmio descrito no item 2.2.4. (Capítulo III). As extrações foram realizadas em grupos de 22 carrapatos incluindo dois tubos de controle de extração, um contendo somente solução de extração e outro contendo um organismo (larvas de *Drosophila* sp.) para a extração de DNA. As amostras controle foram submetidas a todos os procedimentos empregados como as amostras contendo carrapatos e serviram para determinar a possibilidade de contaminação por via do meio ambiente durante o processo de extração que envolve múltiplas etapas. Além disso, todas as extrações foram realizadas em câmara de fluxo laminar previamente desinfetada, e utilizando ponteiras com filtro durante todo o procedimento de lavagem e extração.

O controle da contaminação durante a preparação das reações de PCR foi também foi efetuado como o cuidado no preparo de todas as misturas principais de PCR em uma área do laboratório "Livre de DNA". Nesta área nunca anteriormente houve manipulação de DNA, onde também foi utilizado um conjunto de pipetas e ponteiras com filtro utilizadas somente para este fim. Além disso, todas as reações de PCR realizadas neste estudo incorporaram dois controles negativos. O primeiro destes compreendia uma amostra em que o DNA de teste foi substituído pela mesma quantidade de água para biologia molecular, que foi adicionada ao tubo antes destes serem retirados do ambiente (livres de DNA) no qual as misturas para a reação da PCR foram preparadas e distribuídas para os tubos de reação individuais. Este controle, denominados água dentro, serviu para confirmar que os componentes da mistura da reação estavam livres de DNA contaminante. O segundo controle negativo denominado água fora, também foi composto de um tubo pelo qual o DNA foi substituído por um volume equivalente de água para biologia molecular. No entanto, este tubo controle foi mantido no ambiente (potencialmente contaminado por DNA), durante o período em que o DNA teste foi adicionado aos tubos individuais, contendo alíquotas da mistura principal para PCR. Este foi sempre o último tubo a ser preparado. Deste modo, o controle que foi intitulado água fora, serviu para determinar se havia ocorrido contaminação durante o processo de adição de amostras de DNA teste nos tubos individuais de reação. Uma reação positiva em qualquer controle negativo invalidava todas e quaisquer reações positivas registradas com o DNA teste das amostras.

Inicialmente, o DNA extraído foi utilizado como molde em ensaios de PCR desenvolvidos para a amplificação do 16S DNAr mitocondrial. Posteriormente “amplicons” derivados dos ensaios do 16S DNAr mitocondriais foram sequenciados para identificar as espécies dos carrapatos, conforme descrito no Capítulo I.

As amostras de DNA derivadas dos carrapatos extraídos após a identificação foram examinadas quanto a presença de DNA rickettsial como descrito abaixo.

2.1.1 PCR diagnóstico para o gênero *Rickettsia*

O DNA extraído de 138 carrapatos coletados de aves da família Dendrocolaptidae foram examinados para a presença de DNA rickettsial através de um conjunto de ensaios

baseado em PCR. O primeiro ensaio (Tabela 2) teve um fragmento de aproximadamente 401 pares de bases (pb), do gene citrato sintase (*gltA*) presente em todas as espécies de *Rickettsia* (LABRUNA et al, 2004), como alvo. O segundo PCR (também foi utilizado para confirmar a presença do gênero *Rickettsia*) sendo projetado para amplificar um fragmento de aproximadamente 407 pb do gene *htrA*, que codifica um antígeno de 17Kda.

As amostras positivas para as reações de PCR gênero específicos foram então submetidas à PCR para o diagnóstico quanto a presença de rickettsias do grupo da febre maculosa. Assim, foram utilizados ensaios para a amplificação de um fragmento 856 pb do gene *ompB* (RAOULT et al, 2001). A sequência dos iniciadores para *gltA*, *htrA* e *ompB* (120-M59f/120-807), assim como as condições das reações de PCR utilizadas estão detalhadas na Tabela 7.

Os limites de detecção dos quatro ensaios de PCR foi determinado utilizando DNA derivado de culturas de células VERO infectadas com *R. felis* (gentilmente fornecidas pelo Prof Marcelo Labruna, USP) e com *R. parkeri* (cepa NOD) generosamente fornecida pelo Prof Adivaldo Fonseca, (UFRRJ), como controles positivos. Em ambos os casos, o número de bactérias nas culturas foi desconhecido e o DNA extraído continha ácidos nucleicos tanto de rickettsias quanto de mamíferos. Como tal, não foi possível quantificar a concentração de DNA bacteriano nestes controles. Entretanto, a fim de estabelecer uma estimativa semi-quantitativa do DNA rickettsial no material utilizado como controle, cada estoque de DNA foi utilizado para preparar uma série de diluições (fator de 10), de 10^{-1} a 10^{-7} . Em seguida, volumes de 1 μ L de cada diluição foram testados em duplicata para cada um dos quatro ensaios de PCR, num volume final de 12,5 μ L, para estabelecer a última diluição que apresentasse amplificação visível. Com base nestes resultados, a última e penúltima diluição foram utilizadas como controles positivos quantificados em todos os ensaios, para fornecer uma forma de garantir que os ensaios foram reprodutíveis (que os ensaios foram eficientes dentro dos limites pré-definidos de detecção), e para assegurar que as bandas derivadas a partir dos lisados de carrapatos foram de peso molecular correto. Os controles negativos (água dentro e água fora), descritos acima foram incorporados em cada ensaio.

Em todas as reações de PCR o peso molecular dos “amplicons” foi confirmado através da comparação com o marcador de peso molecular 100 pb GeneRuler Ladder DNA, (produto # SM024, Thermo Scientific). A eletroforese de todos os ensaios acima descritos foi realizada em gel de agarose 1,5%, com tampão de corrida Tris-Acetato com EDTA (TAE) (1X= 40 mM Tris base; 40 mM ácido acético; 1 mM EDTA pH 8,0), a uma tensão elétrica constante de 5V/cm durante 60 minutos. Após a corrida, os fragmentos de DNA presentes no gel de agarose foram corados em Brometo de Etídeo (BE: 0,5 μ g/mL) durante 10 minutos e posteriormente submersos em água destilada por 30 minutos para remoção do excesso de BE. A observação e fotografia foram feitas digitalmente sob iluminação ultravioleta em um fotodocumentador Gel Doc XR (Bio-Rad) e as imagens resultantes foram analisadas utilizando o software Quantity One (Bio-Rad).

Tabela7. Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do DNA de espécies de *Rickettsia*.

Alvo	Iniciadores	Mistura para PCR para volume final de 25µL	Condições da PCR	Tamanho do produto	Referência
<i>gltA</i>	<p>Forward CS-78: 5' GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT 3'</p> <p>Reverse CS-323: 5' GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAA TCA GGA T 3'</p>	<p>1x tampão 1.5 mM MgCl₂ 200 µM dNTPs 20 pmoles de cada primer</p>	<p>95°C durante 5 minutos para a desnaturação do DNA e ativação da polimerase. Seguidos de 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 20 segundos, temperatura de anelamento de 52°C por 20 segundos e extensão final com temperatura de 72°C por cinco minutos.</p>	401 bp	(LABRUNA et al, 2004)
<i>htrA</i>	<p>Forward 17KD: 5'GGA ACC AGG CGG TAT GAA TAA 3'</p> <p>Reverse 17KD: 5'ACT TGC CAT AGT CCG TCA GG 3'</p>	<p>1 unidade de DNA Taq polimerase Platinum (Life Technologies, Brasil) 2 µL de DNA molde.</p>	<p>temperatura de desnaturação de 95°C por 20 segundos, temperatura de anelamento de 52°C por 20 segundos e extensão final com temperatura de 72°C por cinco minutos.</p>	407 pb	(LABRUNA et al., 2004).

<i>ompB</i>	<p>Forward 120-M59f: 5' ATG GCG AAT ATT TCT CCA AAA 3'</p> <p>Reverse Rr. 120-807: 5'AGT GCA GCA TTC GCT CCC CCT 3'</p>	<p>1x tampão 1.5 mM MgCl₂ 200 μM dNTPs 20 pmoles de cada primer 1 unidade de DNA Taq polimerase Platinum (Life Technologies, Brasil) 2 μL de DNA molde.</p>	<p>95°C durante 5 minutos para a desnaturação do DNA e ativação da polimerase. Seguidos de 40 ciclos com temperatura de desnaturação de 95°C por 20 segundos, temperatura de anelamento de 52°C por 20 segundos e temperatura de extensão de 72°C por 40 segundos e extensão final com temperatura de 72°C por cinco minutos.</p>	856 pb	(RAOULT et al., 2001).
-------------	---	--	---	--------	------------------------

2.1.2 Análise *in silico* de digestão com endonucleases de restrição para identificação diferencial das espécies de *Rickettsia*

Sequências completas ou parciais (listadas abaixo) que codificam para os genes *htrA*, *gltA* e *ompB* derivadas de todas as espécies de *Rickettsia* registradas, até o momento, em carrapatos no Brasil, junto com sequências de *R. massaliae* e *R. felis*, foram baixadas em formato FASTA do banco de dados GenBank <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. As sequências foram então alinhadas com os iniciadores utilizados nos três ensaios de PCR, para gerar “amplicons” virtuais utilizando o programa Sequencher® (Versão 5.1; Genecodes, Corporation). Os produtos de amplificação resultantes foram então submetidos à digestão com uma série de endonucleases de restrição *in silico*, através do Programa NEBcutter V 2,0 desenvolvido por Vincze et al., (2003) disponível no link www.tools.neb.com/NEBcutter2

As sequências utilizadas foram as seguintes; *gltA*: (Número de acesso no GenBank; JX867425, JN378401, CP003334 (“*Candidatus Rickettsia amblyommii*”), CP000087, CP000849, JQ906786, DQ865204, DQ517288 (*R. bellii*), CP000053, JQ674484, JN315968 (*R. felis*), CP003319, KF826286, CP000683 (*R. massaliae*), FJ269035 (*R. monteiroi*), CP003341, EF102236, JN126320, JQ906783, EU567177 (*R. parkeri*), CP003342, DQ865206, U11020, U59721 (*R. rhipicephali*), CP003311, CP003306, CP003305, CP000848 (*R. rickettsii*), JN190455 (cepa Pampunha); para o gene *htrA*- (Número de acesso no GenBank; U11013, AY375162, CP003334, AY360215, EU274655 (*R. amblyommii*), CP000087, CP000849, AF445380, DQ865205, AY362702 (*R. bellii*), CP000053, AF195118, GU447234, KF241854, AB114813, DQ102709 (*R. felis*), CP003319, CP000683, (*R. massaliae*), CP003341, U17008, EU567178 (*R. parkeri*), CP003342, DQ865207 (*R. rhipicephali*), CP003311, CP003306, CP003305, CP000848 (*R. rickettsii*), JN190456 (cepa Pampunha); para o gene *ompB*- (Número de acesso no GenBank; CP003334, AY360214, EU826515, AY375164, EU544299, EU728827, EU274657 (*R. amblyommii*), AF182279, CP000053, GQ385243, KF056801 (*R. felis*), CP003319, AF123714, CP000683 (*R. massaliae*), JQ906785, GQ855236, EU567179, CP003341, EF102239 (*R. parkeri*), CP003342, AF123714, AF123719 (*R. rhipicephali*), CP003311, CP003306, CP003305, CP000848 (*R. Rickettsii*).

2.1.3 PCR- Polimorfismo do Comprimento de Fragmento de Restrição/ “Restriction Fragment Length Polymorphism” – (PCR- RFLP)

“Amplicons” derivados das amostras de carrapatos coletados de aves e positivos nos ensaios de PCR para *Rickettsia* foram submetidos à digestão usando as enzimas de restrição *HindIII*, *MspI* e *RsaI* (New England Biolabs), selecionadas com base na análise de digestão *in silico*. Os produtos das reações de PCR utilizados como controles positivos foram derivados de culturas de células ou extraídos de carrapatos previamente determinados por PCR e sequenciamento, como sendo infectados com “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” (cepa ARANHA), *R. bellii*, *R. felis* ou *R. parkeri* (cepa NOD). Estes controles serviram para assegurar o desempenho das enzimas e para gerar perfis de bandas padrão.

As reações foram executadas em volume final de 12 μL , que continham 5 μL do produto de amplificação (aproximadamente 700ng - calculado por espectrofotometria utilizando no aparelho NanoDrop 2000), 0,5 μL (10unidades/ μL) da enzima, 1,2 μL de tampão de reação apropriado, e 5,3 μL de água. Em seguida as amostras foram incubadas a 37°C durante 3 horas e imediatamente submetidas à eletroforese em géis de agarose (2,0%), a uma tensão elétrica constante de 5V/cm durante 90 minutos, em seguida foram seguidos os procedimentos descritos na seção 5.6.1 para visualização das bandas. Os padrões de bandas foram analisados através de comparação entre as amostras e com um marcador de peso molecular de DNA (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, produto # SM0371 Thermo Scientific), junto com os controles positivos. As imagens resultantes foram analisadas utilizando o software Quantity One (Bio-Rad), para determinar com precisão os tamanhos dos fragmentos de restrição individuais.

2.2 Sequenciamento do DNA

Os produtos das PCR foram purificados com Exo-SAP-IT (*GE Healthcare Life Sciences*) e submetidos ao sequenciamento através do “BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit” Applied Biosystems. Os “amplicons” foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores utilizados na PCR, e a reação de “cycle sequencing” foi realizada no termociclador modelo 9700 (Applied Biosystems), utilizando as seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C durante 60 segundos, seguidos de 30 ciclos de 10 segundos a 96°C, cinco segundos à 50°C para o anelamento e quatro minutos à 60°C para a extensão. Após a reação, a remoção dos nucleotídeos não incorporados foi feita através de precipitação com EDTA/etanol seguido por ressuspensão em 10 μL de formamida (Applied Biosystems). Todo o sequenciamento foi realizado utilizando o sequenciador de DNA automático (modelo 3500 Applied Biosystems), localizado no Departamento de Parasitologia Animal, UFRRJ. Alinhamento das sequências foi realizado utilizando o programa Sequencher® (Versão 5.1; Genecodes Corporation), e as sequências obtidas foram identificadas usando o programa BlastN, junto ao banco de dados GenBank.

3 RESULTADOS

Dos 225 carrapatos coletados da família Dendrocolaptidae 138 ixodídeos (oito ninfas e 130 larvas) identificados como *A. varium* (n=2 ninfas), *A. ovale* (n=1 larva), *A. naponense* (n=1 larva) e *A. longirostre* (n=128 larvas e 6 ninfas) foram analisados para a presença de *Rickettsia*. O DNA extraído foi analisado através da PCR com iniciadores gênero específico (*gltA* e *htrA*) para a presença de *Rickettsia* sendo positivos para 97,76% (131/134) carrapatos pertencentes a espécie *A. longirostre*. Em contraste, três carrapatos identificados como *A. longirostre* foram registrados como negativos, para o DNA rickettsial amplificável, assim como os carrapatos identificados como *A. varium*, *A. naponense* e *A. ovale*. Após a identificação das amostras positivas para as PCRs para os fragmentos dos genes *gltA* e *htrA* foram então submetidas a investigação quanto a presença do gene para *ompB* para rickettsias do grupo da Febre Maculosa. Assim, a maioria dos carrapatos analisados, totalizando 98,5% (129/131), foi positiva para *ompB* enquanto que somente 2 foram negativos. Esta amostra foi identificada como larva de *A. longirostre* coletada dentro de um grupo de seis larvas, da mesma espécie de ixodídeo, encontrados na ave *D. turdina* sendo, contudo, as demais larvas positivas para a presença do gene *ompB*.

Com o intuito de identificar a espécie de *Rickettsia* detectada nos carrapatos foi desenvolvido uma metodologia de identificação de PCR-RFLP onde com base em digestões de restrição *in silico* realizadas com produtos de amplificação virtuais gerados a partir de sequências derivadas do GenBank, as enzimas *RsaI* e *MspI* foram capazes de fornecer uma identificação diferencial de sete espécies de *Rickettsia* ("*Candidatus Rickettsia amblyommii*", *R. bellii*, *R. monteiroi*, *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. rhipicephali* e *Rickettsia* sp. cepa Pampulha) registradas em carrapatos coletados no Brasil, bem como *R. massiliae* e *R. felis*. Como mostrado na Tabela 8, a maioria das espécies de *Rickettsia* foram facilmente diferenciadas baseadas na comparação dos padrões de bandas geradas por *MspI* e *RsaI* da digestão do amplicon *ompB*. No entanto, as sequências correspondentes ao amplicon de 856 pares de bases não estavam disponíveis para *R. monteiroi* ou para *Rickettsia* sp. cepa Pampulha. Além disso, os iniciadores utilizados neste estudo não amplificam o gene *ompB* de *R. bellii*. Contudo, uma identificação diferencial com base nos padrões de bandas únicas (Tabela 8), foram alcançadas utilizando *MspI* e *RsaI* para digerir o fragmento amplificado do gene *htrA* de *Rickettsia* sp. cepa Pampulha, as enzimas *MspI* e *SacI* para cortar o fragmento amplificado de *htrA* de *R. monteiroi* e *HindIII* para clivar o amplicon *htrA* de *R. bellii*.

Tabela 8. Tamanhos dos fragmentos de PCR-RFLP previstos para a digestão com endonucleases de restrição gerados de 407 pares de bases do fragmento amplificado do gene *htrA* e por um fragmento amplificado de 856 pares de bases do gene *ompB*.

<i>Rickettsia</i> spp.	Tamanhos em pares de bases do fragmento gerado de 407 pb amplicon <i>htrA</i>		Tamanhos em pares de bases do fragmento gerado de 856-bp amplicon of <i>ompB</i>	
	Padrão de bandas <i>MspI</i>	Padrão de bandas <i>RsaI</i>	Padrão de bandas <i>MspI</i>	Padrão de bandas <i>RsaI</i>
“ <i>Candidatus</i> <i>Rickettsia amblyomii</i> ”	250, 157	298, 82, 27	505, 222, 129	599, 174, 83
<i>R. bellii</i>	305, 102	149, 137, 54, 33, 34	ND	ND
<i>R. felis</i>	200, 157, 50	298, 82, 27	363, 309, 87, 63, 40	599, 174, 89
<i>R. massiliae</i>	250, 102, 55	298, 82, 27	505, 222, 129	559, 174, 40, 83
<i>R. monteiroi</i> *	407	195, 97, 82, 33	ND	ND
<i>R. parkeri</i>	246, 157, 4	298, 82, 27	505, 222, 129	391, 169, 144, 83, 39, 30
<i>R. rhipicephali</i>	246, 102, 55, 4	298, 82, 27	636, 220	559, 174, 83, 40
<i>R. rickettsii</i>	250, 157	298, 82, 27	353, 152, 129, 125, 97	144, 129, 125, 97, 96, 83, 79, 73, 30
<i>Rickettsia</i> cepa sp. Pampulha	200, 157, 50	207, 82, 69, 22, 27	ND	ND

ND = nenhuma sequência disponível. * Digestão do amplicon *htrA* de 407 pb de *R. monteiroi* com a endonuclease de restrição *SacI* gera um perfil de duas bandas com massas moleculares de 216 e 191pb.

Assim, 17 carrapatos representados por 17 *A. longirostre* (13 larvas e quatro ninfas), coletadas de espécimes de *Dendrocincla turdina*, *Sittasomus griseicapillus*, *Xiphorhynchus fuscus* e *Xiphorhynchus guttatus* foram examinadas utilizando os ensaios de PCR para os genes rickettsiais *htrA*, *gltA* e *ompB*. Todos os *A. longirostre* (17/17) geraram produtos de amplificação do tamanho previsto para cada ensaio. A digestão subsequente, usando *MspI* e *RsaI*, dos 17 amplicons *ompB* revelou que em todos os casos, os carrapatos foram infectados com “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” (Figura 13). É interessante notar que, com base em dados de sequenciamento, duas variantes genéticas de “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” denominadas cepas ARANHA e AL foram descritas infectando estágios imaturos de *A. longirostre* no Brasil (PAROLA et al, 2013). A identificação diferencial das três “espécies” não foi alcançada utilizando a digestão do amplicon *ompB*. No entanto, durante a análise *in silico* foi observado que a totalidade das sequências *htrA* depositadas no GenBank como sendo derivadas de “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” continham um único local/sítio para a enzima *HindIII* que, após a digestão geraram dois fragmentos de 203 e 204 pares de bases de tamanho. Este sítio de restrição foi ausente nas sequências depositadas das cepas ARANHA (GenBank número de acesso AY360215) e AL (GenBank número de acesso EU274655). Como tal, a PCR-RFLP usando essa sequência e a enzima *HindIII*, possibilitaram a diferenciação entre a cepa clássica e as variantes brasileiras. Os produtos de amplificação de *htrA* das amostras de carrapatos não foram cortados por digestão com *HindIII*, o que indicou que eles podiam ser cepa ARANHA ou AL. A identificação definitiva como cepa ARANHA foi alcançada pelo sequenciamento dos amplicons *ompB*. Observou-se que todos os 17 fragmentos amplificados foram idênticos uns aos outros e mostrou um nível de 99,4% (812/817 bases sequenciadas) de similaridade de nucleotídeos para a sequência correspondente derivada da *R. amblyommii* cepa ARANHA (GenBank número de acesso AY360214).

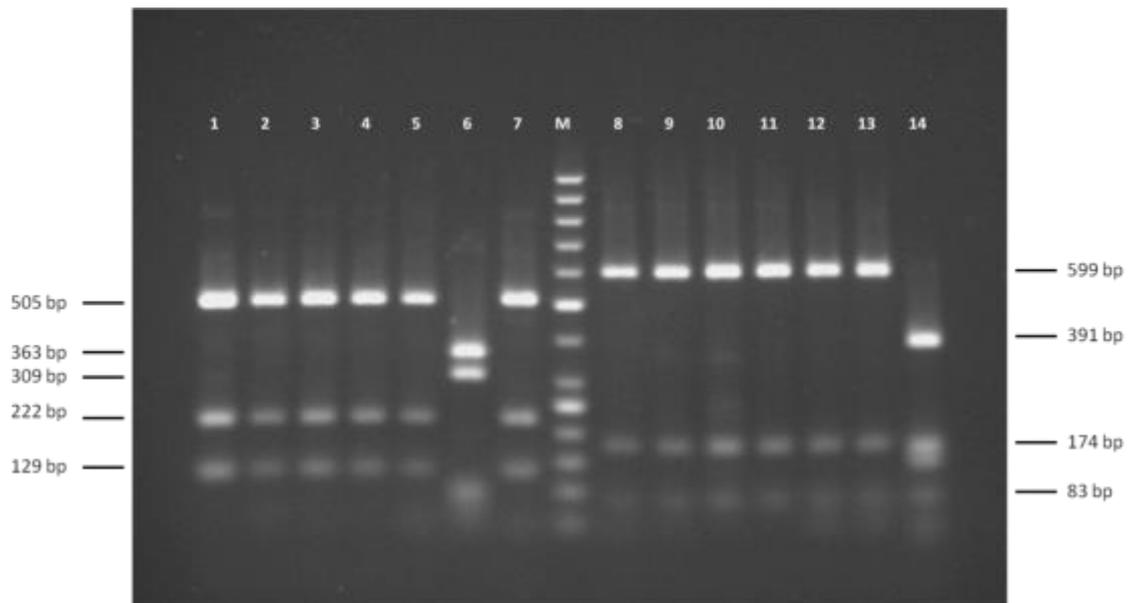


Figura 13. Gel de agarose (2%) corado em brometo de etídeo. Análise dos padrões de bandas de PCR-RFLP produzidos por digestão do amplicon *ompB* gerado pelas endonucleases *MspI* e *RsaI* de quatro larvas de *Amblyomma longirostre* utilizando o par de iniciadores 120-M59 e 120-807. Colunas 1, 2, 3 e 4 = padrões de amostras obtidos através do DNA de carrapatos de aves silvestres; coluna 5 = “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” (cepa ARANHA), coluna 6 = *Rickettsia felis*, coluna 7 = *Rickettsia parkeri* (cepa NOD) digeridos com a endonuclease de restrição *MspI*. Coluna M = marcador de tamanho de DNA (Thermo scientific GeneRuler; 50 bp DNA ladder). Colunas 8, 9, 10 e 11 = padrões de amostras obtidos através do DNA de carrapatos de aves silvestres, coluna 12 = “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” (cepa ARANHA), coluna 13 = *Rickettsia felis*, coluna 14 = *Rickettsia parkeri* (cepa NOD), digeridos com a endonuclease de restrição *RsaI*. Tamanhos da banda são indicados em pares de bases (pb).

4 DISCUSSÃO

O método baseado na PCR-RFLP se baseia na digestão de fragmentos amplificados por PCR através endonucleases de restrição, que geram uma série de fragmentos de diferentes tamanhos, que ocorrem como resultado de mutações em sequências dos sítios de restrição, a aquisição ou a deleção dos sítios de reconhecimento, ou inserções e exclusões nas sequências entre os sítios de reconhecimento (RAMESHKUMAR et al. 2012). O DNA digerido é separado por eletroforese em gel (agarose ou poliacrilamida) e a imagem do gel é gravada digitalmente para posterior análise dos padrões de bandas (RAMESHKUMAR et al. 2012). Uma série de protocolos de PCR-RFLP foram relatados para diferentes espécies de *Rickettsia* (GAGE et al. 1.994, MATSUMOTO, INOKUMA de 2009, PENICHELARA et al. 2013), mas nenhum desses protocolos permitiu a identificação diferencial das espécies de *Rickettsia* registradas no Brasil. O desenvolvimento de técnicas mais rentáveis que possibilitem sua aplicação em estudos que envolvem grandes tamanhos amostrais, como inquéritos que objetivam a compreensão da biologia de carrapatos vetores de *Rickettsia*, são necessários já que apesar dos progressos significativos nos últimos anos, ainda existem inúmeras lacunas em sua compreensão (SZABÓ et al. 2013). Assim, para preencher essas lacunas, há uma necessidade premente de realizar vigilância de extensas populações de carrapatos brasileiros para a presença de agentes patogênicos (OGRZEWALSKA et al. 2012, PAROLA et al. 2013). Por um lado, isso pode ser simplesmente e facilmente conseguido, pelo menos em termos de taxas de detecção, por meio do rastreio baseado na PCR, com os iniciadores específicos do gênero, como os empregados no presente estudo. Por outro lado, a identificação precisa de espécies ou ainda ao nível de subespécies (como exigido para investigações epidemiológicas detalhadas, identificação de cepas, ou estudos filogenéticos), requer uma análise pós-amplificação na forma de sequenciamento dos produtos da PCR (PAROLA et al. 2013). Infelizmente, apesar da redução contínua do custo de metodologias de sequenciamento, a aplicação rotineira dessa metodologia como uma técnica para a identificação de bactérias ainda não é financeiramente viável ou prática para muitos laboratórios, devido às complexidades técnicas e treinamento, necessários para realizar uma análise eficiente da grande quantidade de dados gerados pelo sequenciamento. Diante dessas limitações, a aplicação de métodos alternativos e mais baratos para análise dos produtos da PCR deve ser priorizada na análise molecular preliminar de isolados e, assim selecionar os grupos representativos de “amplicons” derivados dos carrapatos para o sequenciamento.

“*Candidatus Rickettsia amblyommii*” tem sido frequente em estudos de populações de carrapatos que parasitam aves silvestres da Mata Atlântica (OGRZEWALSKA et al. 2008; OGRZEWALSKA et al. 2011a; OGRZEWALSKA et al. 2012; PACHECO et al. 2012) e de outros biomas brasileiros e animais (LABRUNA et al. 2004a; OGRZEWALSKA et al. 2010; SARAIVA et al. 2013). Apesar da frequência de relatos da infecção de “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” em carrapatos de aves silvestres, nenhum estudo antes relatou o elevado número de *A. longirostre* positivos, para esta *Rickettsia*, que fossem provenientes de Dendrocolaptidae.

É interessante que, com base em dados de sequenciamento, duas variantes genéticas de “*Candidatus Rickettsia amblyommii*”, são circulantes no Brasil onde são denominadas cepas ARANHA e AL (LABRUNA et al. 2011; PAROLA et al., 2013). Ambas as cepas foram descritas infectando *A. longirostre* (OGRZEWALSKA et al.

2008, 2010, 2011; PACHECO et al. 2012) e outros carrapatos como *Amblyomma auricularium* (SARAIVA et al. 2013), *A. cajennense* e *A. coelebs* (LABRUNA et al. 2004c), *A. geayi* (OGRZEWALSKA et al. 2010). Além de disseminada em outros países do continente americano (LABRUNA et al. 2011; MUKHERJEE et al. 2014; OGRZEWALSKA et al. 2014).

“*Candidatus Rickettsia amblyommii*” despertou interesse quanto a sua relação com o carrapato que infecta. Saraiva et al. (2013) analisou três gerações consecutivas de *A. auricularium* e observou a manutenção da infecção por “*Ca. Rickettsia amblyommii*” comprovando a transmissão transtadial e transovariana. Essa capacidade de permanência ao longo de gerações em uma população de carrapatos pode explicar a quase que totalidade de carrapatos positivos para esta *Rickettsia* observados no presente estudo. Porém a sua relação com o hospedeiro, nesse caso aves, ainda não é compreendida e necessita de mais investigações. No entanto, a vigilância epidemiológica de carrapatos infectados por “*Ca. Rickettsia amblyommii*” deve ser intensa, já que sua dispersão a longas distâncias foi comprovada por Mukherjee et al. (2014) através de aves migratórias capazes de cruzar as Américas. É sabido que bactérias do gênero *Rickettsia* utilizam glândulas salivares de carrapatos como um de seus sítios de permanência sendo então transmitidas para seus hospedeiros através da saliva (BUDACHETRI et al. 2014). Mesmo pertencendo ao grupo da Febre Maculosa e sendo transmitida durante o repasto sanguíneo de carrapatos infectados, a patogenicidade de “*Ca. Rickettsia amblyommii*” nos hospedeiros é indefinida, pois, mesmo coelhos infectados experimentalmente apesar de terem apresentado soro-conversão (títulos de 64 a 256) contra esse microrganismo não apresentaram qualquer reação (febre ou lesão na pele) sintomática de rickettsiose (SARAIVA et al. 2013). É pertinente observar que a soro-conversão também foi observada em cavalos e cães infectados naturalmente por “*Ca. Rickettsia amblyommii*” com nenhuma evidência de doença clínica nesses hospedeiros (LABRUNA et al. 2007, BERMUDEZ et al. 2011, MELO et al. 2011). Nestes últimos casos de registro de infecção em animais urbanos, Labruna et al (2007) alertaram que a infecção com “*Ca. Rickettsia amblyommii*” tem potencial de se tornar um problema pois, seus carrapatos vetores podem infestar acidentalmente humanos que convivem no mesmo ambiente, ainda mais quando se trata de cães que possuem uma relação próxima ao ser humano. Esse alerta ganha peso com os estudos de Apperson et al. (2008) que forneceram evidências sorológicas em humanos da associação de *R. amblyommii* a casos da febre maculosa nos Estados Unidos.

Ponnusamy et al. (2014) ao estudar a diversidade de Rickettsiales em *A. americanum* sugeriu que “*Ca. Rickettsia amblyommii*” não possui um hospedeiro reservatório vertebrado sendo essa, a função do próprio carrapato. Este autor baseou sua hipótese em dois fatores. O primeiro tem relação com a maior frequência desta bactéria em fêmeas quando comparada a machos, que estaria relacionado à adaptação vantajosa desse organismo para a transmissão vertical e não horizontal onde entra a participação do hospedeiro vertebrado. Outro fator seria a ausência de diversidade genética nos genes *ompA* encontrada, pois não seria o padrão esperado para um patógeno transmitido horizontalmente que requer a infecção de um hospedeiro vertebrado intermediário com a capacidade de gerar a imunidade específica que conduziria a uma diversificação no gene. A adaptação de “*Ca. Rickettsia amblyommii*” a sobrevivência em carrapatos também foi sugerida por Budachetri et al. (2014) ao descrever essa *Rickettsia* como simbionte facultativo de *A. maculatum* coletados no ambiente. A presença constante, mas não dominante de *Rickettsia* spp. nos carrapatos analisados, também verificada por Lalar et al (2012) em *Rhipicephalus turanicus* e *Rhipicephalus sanguineus* permitiu a

suposição de que esta bactéria estaria exercendo o papel de endossimbionte facultativo no microbioma dos ixodídeos analisados. Assim, a alta prevalência encontrada no presente estudo pode ser resultado de sua permanência como simbiote.

Outro fator que pode ter influenciado a detecção do elevado número de amostras recuperadas com DNA rickettsial positivo encontrado nos carrapatos coletados, é o método de armazenamento que priorizou seu imediato acondicionamento em solução de RNAlater®. Isso pode ter contribuído já que se trata de uma solução que permeia rapidamente tecidos para estabilizar e proteger o RNA e o DNA celular ao inativar nucleases presentes nas células. Além disso, a solução RNAlater® minimiza a necessidade imediata de processar as amostras ou o congelamento das mesmas (<https://www.lifetechnologies.com/br/en/home/brands/product-brand/rnalater.html>), essencial em trabalhos que envolvem a coleta de material ambiental onde não se disponibiliza de equipamento de refrigeração em campo. Demais estudos que relatam a prevalência de *Rickettsia* utilizaram como solução fixadora dos carrapatos álcool etílico 95% (APPERSON et al. 2008; PONNUSAMY et al. 2014), álcool etílico 96% (OGRZEWALSKA et al. 2012) álcool etílico 100% (HORTA et al. 2007; LALZAR et al. 2012) isopropanol absoluto (OGRZEWALSKA et al. 2010, 2011; PACHECO et al. 2012) ou congelamento a -80°C (LABRUNA et al. 2004, PONNUSAMY et al. 2014). Estudos que visavam a quantificação e análise da microbiota existente nos carrapatos que relataram a alta prevalência de *Rickettsia*, ou mantiveram seus carrapatos vivos em condições laboratoriais até o momento da extração de DNA como Saraiva et al. (2013), ou mantiveram em álcool etílico 95% até a identificação do carrapato e posteriormente submetendo os ixodídeos ao congelamento a -80°C até o momento da extração, como Ponnusamy et al. (2014).

Por fim, a alta prevalência de “*Ca. Rickettsia amblyommii*” identificada em carrapatos coletados em aves da família Dendrocolaptidae identificados como *A. longirostre* puderam demonstrar a existência de uma relação ecológica que precisa de maiores estudos para uma melhor compreensão do real papel desta bactéria no ixodídeo. Além disso, são necessárias maiores investigações no que concerne a patogenicidade desta *Rickettsia* em relação às aves parasitadas por carrapatos vetores, assim como o real risco de/para populações humanas que convivem em ambientes também utilizados por estas aves. Como é sabido, investigações epidemiológicas dependem da coleta e análise de grande número de amostras e o estudo de populações de carrapatos parasitos de aves silvestres não é diferente. Assim, a metodologia de diagnóstico pelo protocolo PCR-RFLP desenvolvida no presente estudo se mostrou simples e robusta, e foi baseada em genes alvos rickettsiais e ensaios de PCR amplamente utilizados e que permitiu a rápida (24 a 48 horas) identificação e diferenciação das espécies de *Rickettsia* associadas a carrapatos relatados no Brasil. A eficácia do método oferece uma alternativa tecnicamente simples sendo uma alternativa à identificação baseada no sequenciamento. Com isso, espera-se que a disponibilidade deste protocolo possa servir para estimular o aumento da investigação sobre o estudo deste importante grupo de patógenos emergentes e re-emergentes.

CAPÍTULO III

ANÁLISE DE MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE DNA DE MICROORGANISMOS PRESENTES EM IXODÍDEOS

RESUMO

COSTA-SANTOLIN, Ísis Daniele Alves. **Capítulo III: Análise de métodos de extração de DNA de microrganismos presentes em ixodídeos.** 2014. 28p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

A utilização de técnicas moleculares no estudo de carrapatos tem sido corriqueira tanto como ferramenta de identificação do ixodídeo, análise filogenética ou na investigação de agentes patogênicos que possam ser carreados por estes artrópodes. Independente da técnica molecular utilizada, o passo primordial em qualquer análise é a extração de DNA. É sabido que no estudo da microbiota de artrópodes, o método escolhido para extração pode ser determinante na recuperação dos microrganismos existentes principalmente daqueles que não são maioria na população procariota analisada. A ausência de padronização faz com que diferentes protocolos sejam utilizados na extração do material genético de carrapatos sem que tenha havido uma prévia investigação da metodologia mais eficiente no estudo de populações procariotas em ixodídeos. Independente do método utilizado, a finalidade dos protocolos de extração é resultar em um DNA de alta qualidade, em quantidade suficiente e de preferência, obtida de uma forma rápida e eficiente. Assim o objetivo deste capítulo foi comparar diferentes protocolos de extração de DNA com a finalidade de avaliar a metodologia mais eficiente na recuperação de DNA procariota presente na microbiota de carrapatos. Assim, larvas e ninfas de *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma parvum* foram utilizados na comparação de seis protocolos de extração de DNA: Fervura em água estéril, InstaGene (BioRad), kit (Qiagen), Fenol:clorofórmio, Mud (terra de diatomácea) e HotShot modificado. A intensidade das bandas geradas pela reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar o DNA recuperado usando o protocolo de extração de cada um foi avaliada. Dois métodos; fenol: clorofórmio e o kit comercial ofereceram os melhores resultados para a amplificação do DNA dos carrapatos. Além disso, se a intenção de análise do DNA for imediata, o método que utilizou InstaGene foi rápido e útil. No entanto, em relação à análise da microbiota, o método que utilizou fenol: clorofórmio foi considerado mais eficaz.

Palavras chave: Padronização, extração de DNA, microbiota de carrapatos

ABSTRACT

COSTA-SANTOLIN, Ísis Daniele Alves. **Capítulo III: Analysis of methods of DNA extraction of micro-organisms in ixodids.** [Análise de métodos de extração de DNA de microrganismos presentes em ixodídeos.] 2014. 28p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

The use of molecular techniques for the study of tick has been commonplace for tick identification, phylogenetic analysis or research of pathogenic agents that may be carried by these arthropods. Independent of molecular technique used, the primary step in any analysis is the extraction of DNA. It is known that in study of the microbiota of arthropods, the extraction method chosen can be decisive in the recovery of micro-organisms, especially those that are not in most prokaryotic population analyzed. The lack of standardization has resulted in a variety of protocols being used for the extraction of genetic material from ticks in the absence of prior investigations to determine the most efficient methodology to be used in the study of the prokaryotic populations in ticks. Regardless of the method used the purpose of the extraction protocol is to generate high quality DNA in a sufficient quantity for analysis and preferably to obtain the material in a quick and efficient manner. Thus, the aim of this chapter was to compare different protocols for DNA extraction in order to establish the most efficient methodology for the recovery of the prokaryotic DNA representing the microbiota of ticks. To this end, larvae and nymphs of *Rhipicephalus microplus* and *Amblyomma parvum* were used to compare six DNA extraction protocols: Boiling in sterile water, InstaGene (BioRad), a commercial kit (Qiagen), Phenol: chloroform, Mud (diatomaceous earth), and a modified HotShot technique. The intensity of the bands generated by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the DNA recovered using each extraction protocol was evaluated. Two methods; phenol: chloroform and the commercial kit offered the best results for amplification of tick DNA. Moreover, in cases where short term analysis of the DNA was undertaken, InstaGene was found to represent a quick and useful tool. However, regarding analysis of the microbiota, the phenol: chloroform method was considered to represent the most effective technique.

Keywords: Standardization, DNA extraction, ticks microbiota

1 INTRODUÇÃO

1.1 Técnicas de Extração de DNA Genômico

A obtenção do material genético para posterior aplicação na biologia molecular geralmente é a primeira e provavelmente a mais importante etapa a ser executada. As fontes dos ácidos nucleicos, DNA ou RNA, desejados podem ser provenientes de tecidos e células, organismos inteiros, matrizes ambientais (solo, fezes, urina). Dependendo da finalidade para o qual esta extração será destinada, PCR, sequenciamento, clonagem gênica, etc., diversos protocolos são utilizados para realização de tal procedimento. O protocolo a ser utilizado dependerá dos fatores de cada experimento como: tipo de tecido, grau de pureza e principalmente a integridade do material genômico extraído necessária para a aplicação (BARATTO, MEGIOLARO, 2012).

Existem diferentes técnicas para o isolamento de DNA genômico bacteriano, contudo a maioria delas exaustivas e muitas vezes suprimindo alguns grupos de procariotas, o que dificulta estudos que envolvem a diversidade bacteriana a partir de amostras biológicas ambientais (BARATTO, MEGIOLARO, 2012). Contudo, independentemente do método utilizado, a finalidade dos protocolos de extração é resultar em um DNA de alta qualidade, em quantidade suficiente e de preferência, obtida de uma forma rápida e eficiente (SAMBROOK; RUSSEL, 2001).

De maneira geral, os métodos descritos envolvem algum tipo de lise das células seguida pela purificação através de procedimentos incluindo desproteinização e recuperação subsequente do DNA (SAMBROOK et al., 1989). A lise pode ser induzida mecanicamente (por exemplo, moagem, utilizando pérolas de vidro, aquecimento), ou quimicamente (exposição a detergentes ou outras substâncias capazes de romper a integridade das membranas celulares e ou nucleares). Assim, uma vez liberados da célula, é importante proteger o DNA da degradação, que pode ser conseguido controlando o pH da solução, incubando a temperaturas elevadas para inibir a ação das nucleases e incluindo agentes quelantes que sequestram os cátions bivalentes necessários para o funcionamento eficaz das nucleases. Dependendo do uso pretendido com o DNA extraído, pode ser necessário remover outras macromoléculas contaminantes, principalmente proteínas, que podem interferir ou inibir reações subsequentes, por exemplo, PCR ou digestão com enzimas de restrição. A remoção das proteínas pode ser conseguida enzimaticamente, utilizando proteinases, ou quimicamente usando solventes orgânicos, tais como fenol, ou em alguns casos, as proteínas podem ser removidas por precipitação utilizando elevadas concentrações de sais "salting out" (SAMBROOK et al., 1989).

Tampão e Sal: Tampões estabilizam o pH, enquanto as células estão sendo lisadas e uma vez que o DNA está liberado. O tampão mais frequentemente utilizado é o Tris = tris(hidroximetil)aminometano, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$, com o pH das soluções geralmente ajustado com ácido clorídrico (HCl) na faixa de pH 7-9. O sal cloreto de sódio (NaCl) pode também ser incluído para aumentar a força iônica, e auxiliar na manutenção da estabilidade do DNA. A inclusão de sal também é recomendada nos casos em que a purificação do DNA é baseada na precipitação com álcool (etanol ou isopropanol) (SAMBROOK et al., 1989)

Detergentes/Surfactantes: Surfactantes, são vulgarmente chamados detergentes, tem a característica de perturbar a interface entre os sistemas distintos hidrofóbicos e hidrofílicos. Detergentes têm, pelo menos, duas propriedades fundamentais, a saber, uma cabeça hidrófila solúvel em água e uma cauda hidrófoba (solúvel em óleo). Estas propriedades permitem que os detergentes se insiram e em seguida dispersem as membranas, além de desnaturar proteínas. Dependendo da composição química dos terminais hidrofílicos e hidrofóbicos, sua ação sobre as proteínas e as membranas pode variar. Surfactantes iônicos tendem a ser melhores na solubilização de membranas e desnaturação de proteínas. Com surfactantes iônicos, a porção hidrofílica é tipicamente um grupo sulfato, ou carboxílico para surfactantes aniônicos, ou para os surfactantes catiônicos grupamentos amônio. SDS (dodecilsulfato de sódio) é um detergente aniônico com uma cabeça hidrofílica e uma cauda com 12 carbonos (dodecil ou lauril). O desoxicolato de sódio é um detergente aniônico carboxílico proveniente dos sais biliares que é comumente utilizado em muitos tampões de lise. CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio) é um detergente catiônico utilizado no isolamento de DNA de plantas (SAMBROOK et al., 1989).

Agentes quelantes e Inibidores de DNase; Tampões de lise tipicamente incluem agentes quelantes como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) ou ácido tetraacético de etileno-glicol (EGTA). Estas substâncias químicas se ligam a íons metálicos com uma carga de +2 (por exemplo, magnésio e cálcio), tornando-os indisponíveis para outras reações. Muitas DNases necessitam destes cátions bivalentes para funcionar, por isso, privá-las destes íons chave, faz com que o EDTA e EGTA ajudem a reduzir o nível de atividade destas enzimas (SAMBROOK et al., 1989).

Proteinase: Um grande número de protocolos de extração emprega a protease fúngica Proteinase K, tal como um meio inicial de redução do nível de proteínas das células lisadas. Esta enzima atua hidrolisando as proteínas celulares, incluindo as histonas associadas com o DNA eucariótico evitando que estas funcionem como inibidores das técnicas moleculares a qual a extração é destinada. Isso é possível, pois a Proteinase K é uma protease serina produzida pelo fungo *Tritirachium album*, que exhibe ampla especificidade de clivagem para as proteínas celulares, pois catalisa a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas de ácidos aminados alifáticos e aromáticos, a unidade de formação da proteína (EBELING et al. 1974). Devido a plasticidade de funcionamento desta enzima, aceitando variações de pH, a presença de detergentes (incluindo o mais utilizado SDS) torna esta proteína extremamente útil para a digestão de proteínas durante a purificação de ácidos nucleicos (SAMBROOK et al., 1989 SIGMA-ALDRICH- <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/p2308?lang=pt®ion=BR>). A adição de proteinase K vai necessitar de um período de incubação que dependendo da origem da amostra ao qual se deseja extrair o material genômico pode variar de minutos a dias. Em geral, a temperatura de incubação da amostra é de 56°C. Isso porque submetidas a esta temperatura, muitas proteínas celulares, principalmente DNases são parcialmente ou totalmente desnaturadas e inativadas, facilitando a sua digestão com proteinase K, que atinge sua atividade máxima entre 20 e 60°C (LAHIRI et al. 1993; SWEET et al. 1996).

Lise mecânica: É importante salientar que muitos protocolos além da utilização de substâncias químicas, que permitam a execução dessa primeira fase de extração objetivando a liberação do material genético, se utilizam também de métodos mecânicos associados a estas. A utilização de “beads” que são pérolas de vidro de diversos diâmetros utilizadas na quebra do tecido ou célula ao qual se deseja extrair o DNA, e “pestles” ou pistilos, possuindo a mesma finalidade de maceração mecânica do material.

Nitrogênio líquido também é utilizado em protocolos como facilitador de ruptura do tecido ou da célula (HILL e GUTIERREZ 2003).

Em termos gerais, existem duas opções para a purificação do DNA a partir de outros componentes presentes nos lisados celulares. Ambas as abordagens têm como objetivo a separação do material genômico dos demais componentes celulares que geralmente envolvem a adição de uma solução que permita a formação de camadas heterogênicas onde o DNA fique dissolvido em apenas uma das camadas. Um exemplo é quando se utiliza solventes orgânicos como fenol para desnaturar as proteínas, ficando o DNA na fase aquosa e as proteínas na interface entre as fases orgânica e aquosa. Outro exemplo de protocolo para a separação do DNA das proteínas é a utilização de altas concentrações de sal comumente chamada de extração “salting-out” que tem por base o princípio de que as proteínas são menos solúveis em concentrações elevadas de sal, sendo então precipitadas. (SAMBROOK et al., 1989).

Baseado nesta segunda fase da extração, os métodos podem ser divididos em duas categorias, métodos de não afinidade e os métodos de afinidade. Com métodos de não afinidade, o DNA permanece em solução, enquanto todas as demais moléculas, incluindo proteínas e restos celulares, são removidas. As técnicas de não afinidade mais comuns utilizadas incluem o fenol/clorofórmio e métodos que empregam a resina Chelex-100®. Já as técnicas ditas de afinidade permitem a remoção da molécula de DNA a partir da solução sendo baseada na afinidade do DNA à um suporte sólido (sílica) através de interações químicas. Este procedimento vai permitir a exclusão dos materiais indesejados, como proteínas, que podem ser descartados seguramente já que o DNA está aderido à sílica sólida. O DNA pode ser obtido a partir da sílica, após a eluição desta molécula pela adição de tampão Tris ou água, hidratando o ácido nucleico e liberando-o da membrana. (PARIDA et al. 2006).

Sendo assim, de acordo com a metodologia seguida na segunda fase da extração, diferentes métodos são utilizados na extração de DNA. Abaixo estão as principais técnicas utilizadas na extração de material genômico de artrópodes destacando os princípios em que cada método é baseado.

1.2 Métodos Baseados na Não Afinidade

1.2.1 Extração com fenol:clorofórmio (método orgânico)

Uma das técnicas mais comuns para se extrair o DNA de amostras biológicas é o método fenol:clorofórmio, que também é chamado de método orgânico de extração. Este método de extração permite a extração do DNA na forma de cadeia dupla, tendo assim, um elevado peso molecular (SAMBROOK et al., 1989). Fenol e clorofórmio são solventes orgânicos que desnaturam proteínas e facilitam a sua precipitação a partir da solução lisada. A adição de fenol permitirá a desnaturação de proteínas e sua migração para a fase orgânica que contém o fenol enquanto o DNA permanecerá na fase aquosa. Posteriormente é utilizada uma mistura de fenol:clorofórmio, que dá nome à técnica, onde o clorofórmio além de também desnaturar proteínas e contribuir para a remoção de lipídios provenientes da lise celular, funciona como estabilizador do fenol. O clorofórmio vai aumentar ainda mais a densidade da solução removendo vestígios de fenol que pode ter sido previamente transferido com a fase aquosa, impedindo assim que este prejudique a molécula de DNA ao segregar as fases heterogêneas da solução

(FARRELL, 2005). Em muitos protocolos à mistura de fenol:clorofórmio é adicionado álcool isoamílico que terá a função de reduzir a formação de espuma durante o processo de centrifugação para separação das fases aquosa e orgânica (WALSH et al. 1992; FARRELL, 2005).

Após centrifugação o fenol assim como a mistura fenol:clorofórmio podem ser separados da amostra devido à formação de fases heterogêneas na solução de extração. Durante a separação, a fase orgânica da solução (fenol:clorofórmio) que tem maior densidade terá uma gravidade específica mais elevada, assentando, assim, no fundo do tubo, enquanto que na superfície se encontrará o DNA, na forma de cadeia dupla, que pela característica hidrofílica se concentrará na fase aquosa da solução. As proteínas indesejadas e os detritos celulares se concentrarão na fase orgânica ou na interface entre a fase orgânica e aquosa. Assim, essa separação visível permite uma fácil remoção da solução contendo o DNA (SAMBROOK et al., 1989).

Halos et al. (2004) destacava, em estudos com carrapatos, a extração de DNA como etapa mais importante em análises moleculares. Em suas comparações com diferentes métodos de extração de DNA dos ixodídeos *Dermacentor* sp., *Rhipicephalus* sp., e *Ixodes ricinus* e do argasídeo *Alectorobius sonrai* o protocolo que utilizava fenol:clorofórmio demonstrou uma excelente eficiência na extração do 16S DNAr mitocondrial. Outros estudos ainda enfatizam a utilização do fenol:clorofórmio em extrações de *Amblyomma americanum* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ressaltando o elevado rendimento e pureza do DNA extraído (HILL e GUTIERREZ 2003).

Algumas desvantagens cercam essa técnica, como o fato de ser um método demorado, a utilização de solventes orgânicos perigosos à saúde (merecendo um descarte apropriado que evite a contaminação do meio ambiente), e a necessidade de múltiplas transferências de tubos, o que aumenta a possibilidade de contaminação cruzada entre as amostras (HOFF-OLSEN et al. 1999). Contudo, ainda assim, extrações com fenol:clorofórmio são indicadas para amostras antigas ou degradadas, pois consegue produzir, mesmo sob esses aspectos, uma maior qualidade do DNA extraído (POONIYA et al. 2014).

1.2.2 “Salting-out”

Neste método a separação das proteínas do DNA é conseguida através da utilização de soluções contendo altas concentrações de NaCl. A precipitação das proteínas ocorre principalmente através da solubilidade reduzida das mesmas devido a sua desnaturação. A desnaturação expõe radicais hidrofóbicos favorecendo as interações proteína-proteína. Além disso, as altas concentrações de sal promovem a desidratação da solução auxiliando a formação de agregados proteicos que aumentam a diferença de densidade entre as proteínas e o soluto. As diferenças de densidade são suficientemente grandes de modo que os agregados de proteínas são passíveis a formação de “pellet” após centrifugação (MILLER et al. 1988).

1.2.3 Fase de precipitação/purificação do DNA

O DNA após ser extraído e ser isolado dos outros componentes celulares passa por um processo de precipitação que dependendo do protocolo seguido vai variar de acordo com o componente utilizado para essa finalidade. Algumas técnicas utilizam uma solução à base de um sal (acetato de sódio) e um álcool (isopropanol ou etanol) (WALSH et al. 1992; SWEET et al. 1996). Outras técnicas de purificação utilizam somente o álcool para esta fase da extração genômica. No caso da utilização do sal, sua função será de neutralização do DNA devido à afinidade elétrica entre os íons de sódio provenientes do sal, que sendo carregados positivamente, são atraídos pelo grupo fosfato existentes na molécula de DNA. Esta associação torna o DNA uma molécula menos hidrófila e assim, menos solúvel em água fazendo que esta precipite sobre sua própria estrutura (RASPAUD et al. 1981; SAMBROOK et al., 1989). É fundamental que o volume de etanol corresponda à, no mínimo, duas vezes o volume da solução lisada para que a precipitação do DNA seja eficiente ou utilizar isopropanol no mesmo volume da solução. Na primeira lavagem com álcool utiliza-se este à 100% (concentrado), contudo isso fará com que precipitem muitos sais juntamente com o DNA dificultando sua posterior ressuspensão, assim, é comum a adição em etapas subsequentes de álcool 70% a 80% que irá dissolver o sal impedindo sua coprecipitação com o ácido nucleico (RASPAUD et al. 1981; WALSH et al. 1992). Após essa etapa o etanol pode ser removido da solução através de secagem e o precipitado (DNA) pode ser ressuspensionado em água ou tampão Tris EDTA (TE) que por se tratar de um tampão neutro com pH semelhante ao pH do DNA, possui baixa força iônica aumentando o tempo de armazenamento do DNA (FARRELL, 2005).

1.2.4 Fervura em resina quelante InstaGene Matrix® (BioRad)

O InstaGene Matrix® é um produto de marca comercial da BioRad que já vem diluído, e tamponado, pronto para uso, sendo uma versão do Chelex 100® da BioRad que se apresenta na versão em pó (BioRad). É constituído por uma resina de troca iônica, agentes quelantes, negativamente carregados que sequestram (quelam) metais bivalentes existentes em solução, tais como o Mg^{+2} . Esses metais como dito anteriormente, são necessários como cofatores de DNases que, com a lise celular, são liberadas, e que fazem a digestão da molécula de DNA precisando, então, serem inativadas para uma eficiente extração genômica. Sendo assim as substâncias existentes no InstaGene Matrix® bloqueiam qualquer degradação enzimática do DNA extraído (GARG et al. 1999).

A resina é constituída por copolímeros de estireno-divinilbenzeno contendo grupos ácido iminodiacético (Figura 14) que se ligam a íons metálicos bivalentes (CEO et al. 1992; GARG et al. 1999).

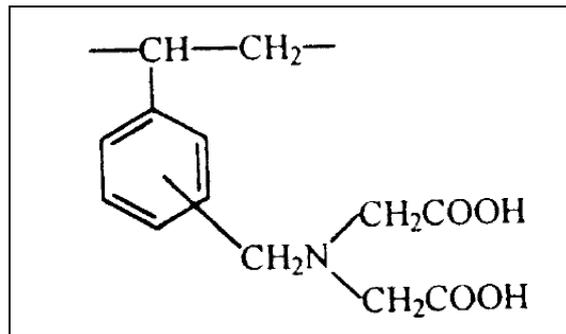


Figura 14. Resina quelante - Ácido iminodiacético (GARG et al. 1999).

Resinas de troca iônica podem ser classificadas de acordo com a carga do íon móvel e força iônica da ligação (BioRad- http://www.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9184_Chelex.PDF). Os grupos de ácido carboxílico caracterizam esta resina como sendo de troca catiônica fraca onde, em pH baixo (isto é, um pH < 4.0), os grupos carboxil e de nitrogênios se tornam protonados capazes de realizarem trocas aniônicas. Alternativamente, em pH elevado os íons H⁺ se dissociam de seus grupos funcionais, tornando a resina um permutador de cátions (CEO et al. 1992). Outra característica da resina presente no InstaGene Matrix® é sua grande seletividade para íons metálicos em detrimento de sua resistência à íons não metálicos tornando-a eficaz na extração de DNA com alto peso molecular e ainda com relato de alto grau de pureza (JACOBSEN et al. 1992).

O pH alcalino do InstaGene Matrix® promove o rompimento das membranas celulares liberando as proteínas existentes na célula que são desnaturadas após a incubação a 100 °C (WILLARD et al. 1998). Outra característica das amostras que sofrem extração com InstaGene também ocorre em decorrência do aumento da temperatura à 100°C é a desnaturação das ligações de hidrogênio existentes entre a dupla hélice da molécula de DNA resultando na formação de moléculas na forma de cadeia simples (WILLARD et al. 1998). A resina ligada aos íons metálicos, provenientes da ruptura celular, precisa ser isolada do DNA extraído, pois caso isso não ocorra esse material funcionará como inibidor das PCR aos quais as amostras serão submetidas. Para esse isolamento após a incubação segue-se uma centrifugação da amostra que, devido ao maior peso e densidade, levam os resíduos de resina e restos celulares para o fundo da amostra permitindo a segregação do sobrenadante contendo o DNA desejado (WILLARD et al. 1998, GREENSPOON et al. 1998).

Garg et al. (1999) destaca algumas vantagens no uso de resinas quelantes em extração de ácidos nucleicos, como a seletividade da ligação da resina a íons metálicos, não possui a dificuldade de separação de fases existentes, além de não se tratar de um produto carcinogênico como os solventes orgânicos utilizados em outros métodos de extração. Como utiliza poucas quantidades da solução contendo a resina, além de tornar-se um método econômico, aumenta a sensibilidade da extração. Além dessas vantagens listadas a que mais se destaca é o fato de requerer menos tempo por parte do analista envolvendo menos passos e, assim, menos de transferências de amostra que pode potencialmente levar a inadvertida contaminação (SWEET et al. 1996; WILLARD et al. 1998; GARG et al. 1999). Hirunkanokpun et al. (2003) utilizaram InstaGene Matrix® em suas análises de bactérias patogênicas presentes em carrapatos coletados na Tailândia, não relatando qualquer problema na eficiência de suas reações de PCR. Estudos com carrapatos *Amblyomma americanum* utilizando esta técnica de extração confirmaram eficiência deste método para detecção de *Ehrlichia chaffeensis*, com

evidências de *E. ewingii* e *Borrelia lonestari* em ixodídeos provenientes dos EUA (VARELA et al. 2004).

No entanto, vários problemas foram relatados com extrações InstaGene Matrix®. Desloire et al. (2006) relatou este método como o menos efetivo dentre os comparados em seus estudos com ácaros *Dermanyssus gallinae* possivelmente em decorrência da presença de inibidores que afetaram a reação em cadeia da polimerase. Como alternativa ao problema com inibidores, Ganz e Gill, (2013) sugerem a diluição do produto de DNA extraído, em TE (Tris-EDTA), de modo a otimizar a reação em cadeia da polimerase. Contudo, a diluição pode diminuir a sensibilidade de avaliação do DNA extraído caso este não tenha sido efetivo.

1.2.5.Extração à base de Fervura em Água Estéril

O princípio deste método é a simples utilização da alta temperatura da água (100°C) para liberação do material genético. A água fervente irá desnaturar as DNases liberadas com o rompimento das membranas da célula e hidrolisar as ligações de hidrogênio que mantém a molécula de DNA na forma de fita dupla deixando-a no formato de fita simples. Por ser um método rápido e fácil, foi utilizado em alguns estudos como em análises da prevalência de *Borrelia* sp. em carrapatos provenientes de aves migratórias na Escandinávia (OLSÉN et al. 1995) e para prevalência de *Rickettsia felis* em pulgas, *Ctenocephalides felis* (PORNWIROON et al. 2007).

1.3 Métodos de Afinidade

1.3.1 Extração à base de sílica

Os métodos de afinidade se baseiam na capacidade de ligação da molécula de DNA à sílica (HOSS et al. 1993; YANG et al. 1998). Com isso diversos protocolos tem empregado a utilização da sílica para separação do DNA dos demais materiais celulares por se tratar de uma maneira relativamente simples e específica de isolamento do material genético desejado. Kits comerciais de extração também têm empregado filtros feitos de sílica pelo qual a solução de extração, contendo o DNA, é passada deixando-o preso, enquanto que o excesso de material celular, incluindo inibidores, que não se ligam às esferas de sílica, são eluídos através de uma série de lavagens.

A adsorção do DNA à sílica, normalmente em kits comerciais apresentada na forma de membrana, ocorre quando os sais caotrópicos que dependendo do protocolo empregado pode ser perclorato de sódio, cloridrato de guanidina e tiocianato de guanidina presentes na solução de extração rompem e desnaturam a estrutura de macromoléculas tais como proteínas e ácidos nucleicos (por exemplo, DNA e RNA). Solutos caotrópicos tem a capacidade de aumentar a entropia do sistema permitindo a ligação dos grupos fosfatos presentes na molécula de DNA à uma ponte de cátion formada pelo sal que se liga ao oxigênio presente nas moléculas de água como observado na figura abaixo (Figura 15) (LAKSHMI et al. 1999; QIAGEN - http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/QIAGEN_protocol.pdf). Grande parte dos kits comerciais, incluindo QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), utilizam a guanidina como sal caotrópico que além de promover a ligação do DNA à sílica, desnatura as proteínas e inativa nucleases liberadas durante o processo de extração. Agentes caotrópicos como o

tiocianato de guanidina, tem sido utilizados em extrações de DNA onde o carrapato é a fonte do material genético. Este permitirá a lise das membranas celulares além de impedir que o DNA se ligue a outras moléculas, facilitando a segunda etapa da extração que é a separação do ácido nucleico dos outros componentes celulares (SAMBROOK et al., 1989; SANGIONI et al. 2005; SARAIVA et al. 2013).

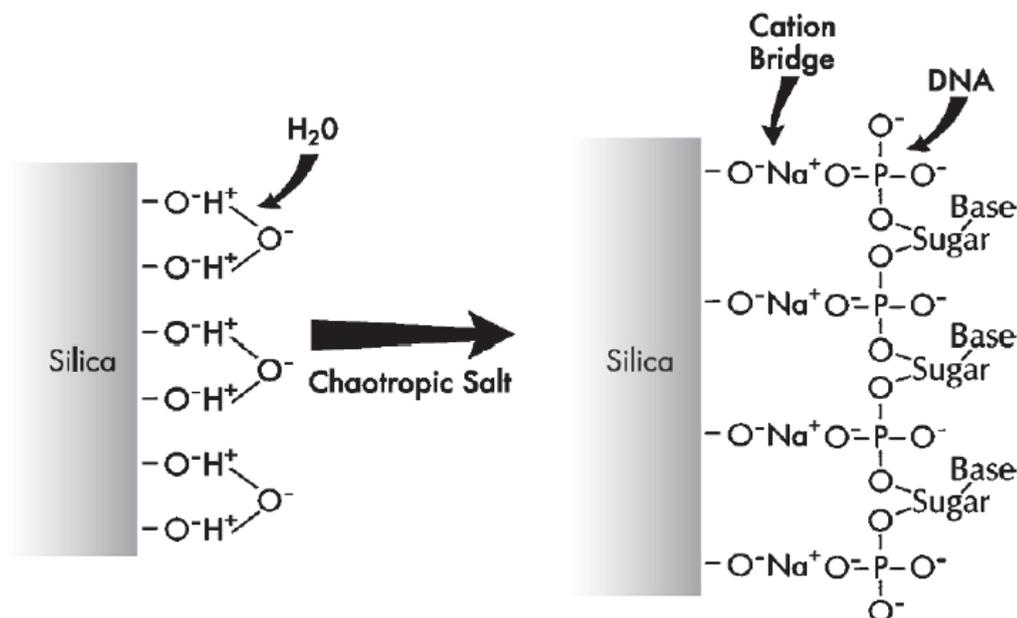


Figura15. O silicone fornece um meio universal para a imobilização de moléculas de ácido nucléico. Na presença de água e sais caotrópicos as moléculas interagem ionicamente com íons de sódio e os grupos fosfato do ácido nucléico. Após a ligação, os contaminantes podem ser removidos por lavagem e centrifugação.

Para a liberação do DNA da membrana de sílica é adicionado uma solução que promoverá a hidratação do material genético preso à membrana podendo ser Tris ou água (QIAGEN - http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/QIAGEN_protocol.pdf).

1.4 Utilização do 16S DNAr

A descrição da diversidade microbiana por técnicas cultura-independente, na maioria das vezes envolve a amplificação do gene 16S RNAr (16S DNA ribossomal (RNAr)) pela reação em cadeia da polimerase (PCR) (SCHLOSS e HANDELSMAN, 2004). A maioria dos estudos envolvendo comunidades microbianas inclui o sequenciamento do “amplicon” alvo dos marcadores filogeneticamente informativos, tais como a pequena subunidade ribossomal. Isso permite aos pesquisadores comparar as identidades dos microrganismos que estão presentes nas comunidades de interesse. Uma vantagem de genes RNAr é que os ribossomos e, assim, 16S RNAr, estão presentes em todos os organismos vivos, enquanto outros marcadores comumente usados têm uma limitada distribuição taxonômica (KUCZYNSKI et al. 2012). O comportamento estável do 16S RNAr, que vem se mantendo ao longo de anos de evolução, é comparado a um “cronômetro molecular” como sugerido por Woese et al. (1987). Além disso, os genes ribossomais, contêm regiões em evolução lenta sendo

então, utilizados como alvo de um largo espectro de iniciadores, que permite a disponibilização de suas sequências em vários bancos de dados tidos como referência para sequências taxonômicas (KUCZYNSKI et al. 2011).

Alguns locais do 16S RNAr, chamados "hot spot", variáveis de acordo com a espécie, se mostram com maior número de mutações ao longo de todos o gene (TORTOLI, 2003) conferindo a este, regiões variáveis (hipervariáveis) e regiões conservadas, demonstrando polimorfismos interespecíficos suficientes para distinção molecular entre as espécies. Até o momento foram distinguidas nove regiões hipervariáveis (V), denominadas de V1 a V9, intercaladas com regiões semelhantes (domínios universais ou conservados). Sequências específicas dentro de uma dada região hipervariável constituem alvos úteis para ensaios de diagnóstico e outras investigações científicas (WOESE et al., 1983; CHAKRAVORTY et al., 2007).

Iniciadores capazes de anelar em regiões conservadas do 16S RNAr, comuns a maioria dos procariotos, também chamadas de regiões universais, são usados para gerar "amplicons" de regiões variáveis que são informativos em estudos taxonômicos (WANG e QIAN, 2009). Diversos artigos têm investigado os melhores conjuntos de iniciadores capazes de amplificar o maior número de filos procariotas quanto possível dentro de uma amostra. Kuczynski et al. (2012) analisando a eficiência de conjuntos de iniciadores universais para 16S RNAr para a microbiota de seres humanos, verificou que o fragmento amplificado pelo conjunto 515F-806R representou a grande maioria dos grupos pertencentes a Bacteria e Archaea. Ainda, este par de iniciadores também foi utilizado na avaliação da microflora de himenópteros com resultados satisfatórios na caracterização de sua comunidade procariota (ZAHNER et al. 2008). Entretanto, o par de iniciadores 357F-907R foi eficiente ao diferenciar microbiota humana entre indivíduos acometidos pela doença de Crohn e indivíduos saudáveis (MARTINEZ-MEDINA et al. 2006) e em análises da comunidade procariota em lodo de esgoto (TABATABAEI et al. 2013).

Mesmo com o conhecimento da possibilidade da ocorrência de erros durante as análises moleculares, Hong et al. (2009) alertam que muitos estudos de diversidade microbiana podem identificar somente metade das espécies existente em amostras ambientais ainda que se utilize vários conjuntos de iniciadores, múltiplas técnicas de extração de DNA e uma padronização das condições da PCR.

Diante disso, e da ausência de padronização na escolha da metodologia de extração de DNA de ixodídeos, este estudo teve por objetivo a análise comparativa de seis metodologias de extração de DNA de carrapatos, utilizando como alvo 16S DNA mitocondrial de carrapatos e 16S RNAr dos microrganismos albergados por estes artrópodes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Extração do DNA dos Carrapatos

2.1.1 Aquisição dos carrapatos utilizados na padronização da extração de DNA

Foram coletados carrapatos nas fases de larva e ninfa provenientes de uma mesma postura de uma fêmea de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Amblyomma parvum*. Parte da postura dos carrapatos foi coletada e larvas recém-eclodidas, antes da primeira alimentação foram separadas, e a outra parte foi submetida à infestação experimental em coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) para que alcançassem a fase de ninfa. Larvas de *A. parvum* após o período de repasto sanguíneo e se desprenderem livremente do hospedeiro, foram colocadas em estufas tipo B.O.D. com temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $80 \pm 5\%$ para que fizessem ecdise para a fase de ninfa. Para a fase de ninfa de *R. microplus*, após sete dias de eclosão, as larvas foram levadas para a infestação experimental, onde após sete dias de repasto sanguíneo e verificação visual da ecdise foram então, removidas do hospedeiro mecanicamente com o auxílio de pinças (Protocolos de experimentação animal UFRRJ/COMEP 160/2011; UFRRJ/COMEP 23083.006255/2013-25).

Os carrapatos coletados foram divididos em grupos de dez indivíduos e armazenados em tubos com tampa de rosca contendo 500 μL de RNAlater® (Ambicon; produto # AM7021) e congelados à -20°C .

Para a extração os carrapatos foram descongelados e submetidos à lavagem em Solução tamponada de Fosfato (PBS), pH 7,2, para remoção do RNAlater® seguindo-se o seguinte protocolo. Acrescentou-se 1000 μL de PBS estéril nos tubos de tampa com rosca contendo um carrapato cada, submetendo-os em seguida, a uma centrifugação por cinco minutos com rotação de 16000 x g. Este procedimento foi repetido três vezes em cada tubo de amostra. Foram testados seis protocolos de extração de DNA diferentes, descritos detalhadamente abaixo, que foram executados no mesmo dia de extração de maneira sincronizada.

2.2 Protocolos de Extração

2.2.1 Protocolo 1: Fervura em água estéril

Em cada tubo de tampa com rosca de 1,5 mL foram acrescentados 20 μL de água estéril. Os carrapatos foram macerados com o auxílio de um micro pistilo “pestle” (Sigma-Aldrich; produto #Z35994). Os tubos foram incubados em uma placa aquecedora (Thermomixer® Comfort; Eppendorf) a 100°C durante cinco minutos. Em seguida as amostras foram centrifugadas durante 1 minuto a 16000 x g. Retirou-se alíquota de 10 μL do sobrenadante e armazenou-se à -20°C para posterior análise.

2.2.2 Protocolo 2: Extração à base da resina “Chelex®-100” – InstaGene® Matrix (BioRad)

Em tubos de tampa rosca de 1,5 mL, foram acrescentados 20µL da suspensão InstaGene®. Os carrapatos foram então macerados com o auxílio de um micro pistilo “pestle” (Sigma-Aldrich; produto #Z35994). Após a maceração aumentou-se o volume do macerado acrescentando-se 80 µL de InstaGene®. As amostras foram incubadas em placa aquecedora (Thermomixer® Comfort; Eppendorf) a temperatura de 56°C durante 15 minutos. Passado esse período, as amostras foram misturadas por agitação manual (invertidas três vezes) e aquecidas à 100°C por oito minutos. As amostras foram centrifugadas durante 1 minuto em 16000 x g. Deste protocolo retirou-se 50µL do sobrenadante, mantendo-se o cuidado de retirar o volume desejado sem o “pellet” formado no tubo, que conterá a resina “chelex” presente no InstaGene®. Alíquotas de 10µL foram separadas para análise molecular e armazenadas à -20°C.

2.2.3 Protocolo 3: Extração com kit QIAamp® DNA Mini Kit

A extração utilizando o kit (Qiagen; produto # 51306) foi realizada em tubos com tampa de rosca de 1,5 mL contendo um carrapato e acrescentados 20µL de água estéril. Os carrapatos foram macerados com o auxílio um micro pistilo “pestle” (Sigma; produto # Z35994). Acrescentou-se 60µL de água estéril, 100 µL de “buffer” ATL e 20µL de proteinase K (40 mAU/mg). As misturas foram homogeneizadas com vórtex (10 segundos) e incubas por três horas à 56°C. Após o período de incubação, as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 6000 x g. Em seguida acrescentou-se 200µL de “buffer” AL, misturou-se através de um vórtex por 15 segundos, e em seguida os tubos foram incubados à 70°C por 10 minutos. Passado este período as amostras foram centrifugadas por 1 minuto a 6000 x g, acrescentou-se 200µL de etanol absoluto (MERCK) e em seguida as amostras foram homogeneizadas por vortex durante 15 segundos.

O sobrenadante foi então transferido para o inserto de tubo contendo um filtro de sílica fornecido pelo kit e centrifugada por 1 minuto a 6000 x g. O filtrado foi descartado, mantendo-se o inserto com filtro. Foram acrescentados 500µL de “buffer” AW1 e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 6000 x g. Mais uma vez, o filtrado foi descartado, e foram acrescentados 500µL de “buffer” AW2 em seguida centrifugados por 3 minutos 6000 x g. O filtrado foi descartado e os insertos foram centrifugados por 30 segundos, e em seguida os tubos (ainda dentro do centrifuga) foram girados (180°) e centrifugados por mais 30 segundos. O inserto com o filtro foi transferido para um micro tubo tipo-Eppendorf de 1,5 mL onde foram acrescentados 200 µL de “buffer” AE. Aguardou-se 1 minuto à temperatura ambiente e após esse tempo centrifugou-se por mais 1 minuto a 6000 x g. Alíquotas de 10µL foram separadas para análise molecular e armazenadas à -20°C.

2.2.4 Protocolo 4: Fenol:clorofórmio

Após a lavagem dos carrapatos, foram acrescentados 200 µL de PBS (pH 7,2) estéril, 21 µL de cloreto de cálcio (50 mM) e aproximadamente 50mg de pérolas de vidro - “glass beads” (425-600 µm; Sigma-Aldrich; product # G8772) em tubos com

tampa de rosca de 0,5mL. As amostras foram agitadas por 60 segundos no mini-beadbeater-16 (Biospec; Bartlesville, OK, USA), foram acrescentados 200µL do tampão de lise (20mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 400mM NaCl, 1% Dodecil Sulfato de Sódio) e 20µL proteinase K (20µg mL⁻¹; Sigma-Aldrich). Em seguida, as amostras foram incubadas por três horas a 56°C. Passado o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 1 minuto (16000 x g) e depois foram retirados 350 µL de cada lisado e colocados em novos tubos com tampa de rosca de 1,5mL, contendo 250 µL de PBS (pH 7,2). Foram colocados 600 µL de fenol tamponado (pH 7.4-7.8 BioAgency produto # 11593) e depois misturadas manualmente (invertidos três vezes) para formar uma emulsão. As amostras foram centrifugadas por dez minutos em 16000 x g. Após esse período, foram retirados 550 µL do sobrenadante (fase superior aquosa) sendo o mesmo transferido para um novo tubo com tampa de rosca de 1,5mL. Foram acrescentados 550 µL de Fenol-Clorofórmio (Bioagency product # 3879), misturados manualmente (invertidos três vezes) até que a solução formasse uma emulsão e centrifugados por dez minutos em 16000 x g. Após este tempo, foram retirados 500 µL do sobrenadante (fase superior aquosa) e transferidos para novo tubo com tampa de rosca de 1,5 mL. Foram adicionados 500 µL de isopropanol (MERCK) e os tubos foram incubados durante 30 minutos em temperatura ambiente (aproximadamente 24oC). Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por dez minutos em 16000 x g e depois os tubos foram invertidos para descartar o líquido deixando o “pellet” no fundo do tubo. As amostras foram então lavadas com 1000 µL de etanol 70%, (para remoção do sal), e centrifugadas por 1 minuto a 16000 x g. O sobrenadante foi removido invertendo o tubo. O passo da lavagem foi repedido por mais uma vez. Para remover o restante do álcool, os tubos foram colocados abertos e invertidos em cima de papel absorvente durante 1 minuto e em seguida incubados sem tampa a 56°C durante cinco minutos para evaporar a pequena quantidade de etanol que restava. Após seco, o DNA foi ressuscitado em 200 µL de “buffer” AE (kit Qiagen), através de incubação a 4°C durante a noite e em seguida aquecido à 56°C por dez minutos. Alíquotas de 10µL foram separadas para análise molecular e armazenadas à -20°C.

2.2.5 Protocolo 5: Terra de Diatomácea (MUD)

Após a lavagem dos carrapatos, foram acrescentados 200 µL de PBS (pH 7.0) estéril, 21 µL de cloreto de cálcio (50 mM) e aproximadamente 50mg de pérolas de vidro - “glass beads” (425-600 µm; Sigma-Aldrich; product # G8772) em tubos com tampa de rosca de 0,5mL. As amostras foram agitadas por 60 segundos no mini-beadbeater-16 (Biospec; Bartlesville, OK, USA), foram acrescentados 200µL do tampão de lise (20mM Tris-HCl pH 8.0, 20mM EDTA pH 8.0, 400mM NaCl, 1% Dodecil Sulfato de Sódio) e 20µL proteinase K (20µg mL⁻¹; Sigma-Aldrich). As amostras foram incubadas por três horas a 56°C e depois centrifugadas durante 1 minuto (16000 x g). Em um novo tubo com tampa de rosca de 1,5 mL foram adicionados 240 µL do lisado, 45 µL de “Diatomaceous earth” (Sigma-Aldrich; produto # D-3877) e 810 µL de “binding buffer”. “Diatomaceous earth” ou terra de diatomáceas é constituída por restos fossilizados de diatomáceas e foi preparada da seguinte maneira. Em tubo falcon de 50 mL foram adicionados 10 mL de água estéril, 5g de “Diatomaceous earth”, completados com água estéril até o nível demarcado de 45 mL do tubo. Essa mistura foi homogeneizada em vórtex por 15 segundos, colocada para sedimentar por 30 minutos e

após este período, o tubo foi invertido para a remoção do líquido sobrenadante. Este processo foi repetido mais uma vez. Por fim, foi adicionado volume de TE (10mM Tris-HCl pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) igual ao volume de sedimento restante no tubo. A solução “binding buffer” foi preparada da seguinte maneira. Em tubo falcon de 50 mL foi adicionado 24g de tiocianato de guanidina (GuSCN Sigma-Aldrich; produto #G-6639), 2 mL de Tris (1 M, pH 7.5) e 1 mL de EDTA (0,5M, pH 8.0). Esta solução foi aquecida a 55°C, até que a GuSCN entrasse em solução e depois autoclavada (121°C por 15 minutos). Foram acrescentados 0,5 mL de TritonX-100 (Sigma-Aldrich; produto #93443), misturados invertendo o tubo gentilmente e armazenada ao abrigo da luz.

Em seguida, as amostras foram incubadas a 56°C durante cinco minutos com agitação de 400 rpm no Thermomixer® Comfort; Eppendorf. Após este período a solução foi centrifugada por dez minutos e depois o tubo foi invertido com o objetivo de retirar o máximo de sobrenadante. As amostras foram então lavadas acrescentando-se 1000 µL de “washing etanol” (etanol 70%, 100mM NaCl, 10mM Tris pH 8.0, 1mM EDTA pH 8.0) e misturadas com vórtex por 15 segundos. Depois, as amostras foram centrifugadas por dez minutos em 16000 x g e invertidas mais uma vez/como anteriormente para remoção do sobrenadante. Esse processo de lavagem foi repetido mais uma vez. Para secagem, os tubos foram incubados sem tampa a 56°C durante cinco minutos. A liberação do DNA da sílica foi feita pela adição de 200 µL de Tris pH 7,5 (10mM) com incubação a 56°C durante cinco minutos. Em seguida os tubos foram centrifugados durante dois minutos em 16000 x g e Alíquotas de 10 µL foram separadas para análise molecular e armazenadas à -20°C.

2.2.6 Protocolo 6: HotShot Modificado

Após a lavagem dos carrapatos, foi adicionado 100 µL de tampão de lise hotshot (25mM NaOH, 0,2mM EDTA pH 12,0) e 50mg de pérolas de vidro “glass beads” (425-600 µm; Sigma-Aldrich; produto #G8772). As amostras foram agitadas por 60 segundos no mini-beadbeater-16 (Biospec; Bartlesville, EUA) e incubadas por 45 minutos a 95°C. Após este período as amostras foram incubadas a 4°C por cinco minutos. Passado este tempo, foi adicionado o volume de 100 µL de tampão de neutralização (40 mM de Tris-HCl pH 5.0) e a misturado manualmente por inversão do tubo 6 vezes. Em seguida os tubos foram centrifugados durante dois minutos em 16000 x g e alíquotas de 10 µL foram separadas para análise molecular e posteriormente armazenadas à -20°C.

Os produtos da PCR proveniente dos extraídos foram purificados seguindo o protocolo para DNA em solução do Kit de purificação QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen #289034-70). Após a purificação o produto da PCR foi quantificado com o auxílio do Low DNA Mass Ladder (Invitrogen# 10068-013) que mostrou quanto de DNA as bandas visualizadas classificadas como +++ (12 ng): Bandas com intensidade alta; ++ (5 ng): Bandas com intensidade média; + (1 ng): Bandas com intensidade fraca (5ng a 10ng); - amostras sem amplificação possuíam (figura 16).

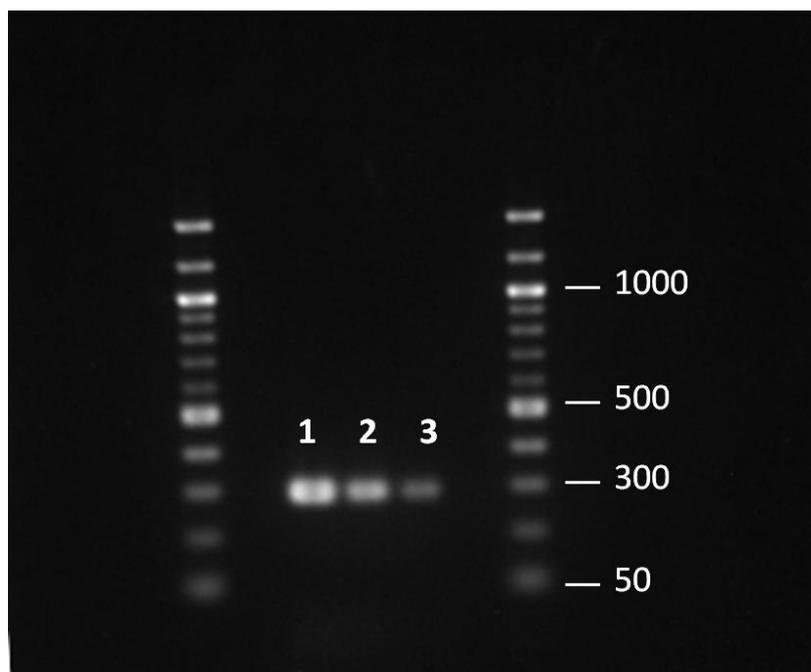


Figura 16. Gel de agarose (1,5%) corado em brometo de etídeo. Análise representativa das bandas visualizadas nas colunas 1, 2 e 3 classificadas como +++: Bandas com intensidade alta (12 ng) coluna 1; ++: Bandas com intensidade média (5 ng) coluna 2; +: Bandas com intensidade fraca (1 ng) coluna 3.

2.3 Reação em Cadeia da Polimerase “Polymerase Chain Reaction” (PCR)

2.3.1 PCR para 16S DNAr mitocondrial de ixodídeos

Para cada uma das metodologias propostas de extração do DNA de carrapatos *R. microplus* e *A. parvum* nas fases de larvas e ninfas, foram preparadas extrações em duplicata. Para a confirmação da eficácia do protocolo de extração do DNA dos carrapatos, ampliações através do protocolo “Hot Start-Touch-up” PCR, de um fragmento do gene codificador do 16S DNAr mitocondrial dos carrapatos foram realizados no mínimo duas vezes. Os iniciadores utilizados para tal reação da PCR gerou um produto de aproximadamente 460 pb (Tabela 1).

Em todos os ensaios, três controles positivos foram utilizados para garantir a eficiência da PCR sendo estes provenientes do DNA extraído de *R. microplus* que foi diluído para conter as seguintes concentrações (1ng/μL), (100 pg/uL) e (10 pg/uL) dois controles negativos que garantiam a ausência de contaminação da mistura para a reação.

2.3.2 PCR 16S DNAr procariota

Após a confirmação da eficiência da recuperação do DNA do carrapato, conforme descrito acima, os DNAs recuperados das seis técnicas de extração foram avaliados com o objetivo de determinar a presença de DNA procariota. Para tal fim,

foram executadas reações de PCR “Hot-Start”, empregando um volume de 1µL de DNA sem diluição ou, o mesmo volume da amostra diluídos dez vezes, (=1:10), e 100 vezes (=1:100) onde através da avaliação visual da intensidade das bandas, a eficiência da extração foi determinada. Para a avaliação da eficiência da recuperação do material genético dos procariontes presentes nos ixodídeos, dois pares de iniciadores universais, projetados para amplificar regiões hipervariáveis do gene que codifica a menor subunidade (16S) RNAr bacteriano foram empregados (Tabela 9).

A reação de amplificação para o primeiro conjunto de iniciadores 515F-806R gerou “amplicons” de aproximadamente 290 pares de bases provenientes da região hipervariável 4 (V4) e a do segundo par de iniciadores 357F-806R gerou “amplicons” de aproximadamente 466 pares de bases provenientes das regiões hipervariáveis 3 e 4 (V3-V4) do gene que codifica a menor subunidade (16S) RNAr procarionte.

A sensibilidade dos dois ensaios foi determinada usando um controle DNA, extraído por meio de lise térmica de aproximadamente 5×10^{10} células de *Escherichia coli* (cepa DH5α). A concentração de DNA presente no lisado foi estimada espectrofotometricamente usando o aparelho Nanodrop 2000 (Thermoscientific). Baseado no valor obtido, o lisado foi serialmente diluído (fator de 10), para proporcionar uma gama de concentrações (10ng/µL à 1 fg/µL). Os controles do DNA (1µL) foram submetidos a PCR (Tabela 1), e analisados através de eletroforese em gel de agarose para determinar a última diluição capaz de gerar um produto visível de amplificação. A última (10 fg/µL) e penúltima (100 fg/µL) diluição foram então utilizadas como controle positivo, em cada ensaio, fornecendo um meio de assegurar que os ensaios foram reprodutíveis (especificamente que os ensaios funcionaram dentro dos limites predefinidos de sensibilidade de detecção), e para assegurar que os “amplicons” derivados dos lisados de carrapatos apresentaram a massa molecular correta. Todas as reações de PCR realizadas neste estudo incorporaram dois controles negativos. O primeiro destes compreendia uma amostra em que o DNA de teste foi substituído pela mesma quantidade de água para biologia molecular, que foi adicionada ao tubo antes destes serem retirados do ambiente (livres de DNA) no qual as misturas para a reação da PCR foram preparadas e distribuídas para os tubos de reação individuais. Este controle, denominados água dentro, serviu para confirmar que os componentes da mistura da reação estavam livres de DNA contaminante. O segundo controle negativo denominado água fora, também foi composto de um tubo pelo qual o DNA foi substituído por um volume equivalente de água para biologia molecular. No entanto, este tubo controle foi mantido no ambiente (potencialmente contaminado por DNA), durante o período em que o DNA teste foi adicionado aos tubos individuais, contendo alíquotas da mistura principal para PCR. Este foi sempre o último tubo a ser preparado. Deste modo, o controle que foi intitulado água fora, serviu para determinar se havia ocorrido contaminação durante o processo de adição de amostras de DNA teste nos tubos individuais de reação. Uma reação positiva em qualquer controle negativo invalidava todas e quaisquer reações positivas registradas com o DNA teste das amostras.

Tabela 9. Iniciadores, mistura para PCR e condições do ciclo da PCR utilizado para amplificação do 16S DNAr procariota.

Alvo	Iniciadores	Mistura para PCR para volume final de 12,5µL	Tamanho do produto	Condições da PCR	Referências
16S DNAr procarioto	515 Forward 5'- GCC AGC AGC CGC GGT AA 3' 806 Reverse 5'- GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT 3'	1x tampão 1,5mM (Invitrogen) MgCl ₂ (Invitrogen) 0,2mM cada dNTP (Promega) 10mM de cada iniciador 0,25 unidades de Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brasil) 1mL do DNA	290 pb	Ativação da <i>Taq</i> Polimerase durante 5 minutos a 94 ^o C seguidos de 40 ciclos de 15 segundos para desnaturação a 94 ^o C, 20 segundos para o anelamento a 55 ^o C, 20 segundos a 72 ^o C e 30 minutos a 72 ^o C para extensão final.	Zahner et al. (2008); Huler et al. (2012)
16S DNAr procarioto	357 Forward 5'- CCT ACG GGA GGC AGC AG 3' 806 Reverse 5'- GGA CTA CCA GGG TAT CTA AT 3'	1x tampão 1,5mM (Invitrogen) MgCl ₂ (Invitrogen) 0,2mM cada dNTP (Promega) 10mM de cada iniciador 0,25 unidades de Platinum Taq DNA polymerase (Life Technologies, Brasil) 1mL do DNA	466 pb	Ativação da <i>Taq</i> Polimerase durante 5 minutos a 94 ^o C seguidos de seguidos de 35 ciclos de 15 segundos para desnaturação a 94 ^o C, 20 segundos para o anelamento a 55 ^o C, 20 segundos a 72 ^o C e 30 minutos a 72 ^o C para extensão final.	Crump et al. (2003); Ding et al. (2014)

3 RESULTADOS

3.1 Padronização do Protocolo de Extração de DNA de Ixodídeos

Os seis métodos para extração do DNA foram aplicados em ninfas de *Rhipicephalus microplus* que propiciaram a eliminação de três protocolos considerados ineficazes quanto a recuperação do material genético procariota. Os protocolos 1 (Fervura em água estéril), 5 (Terra de diatomácea) e 6 (hotshot modificado) não apresentaram boa amplificação em amostras de DNA sem diluição ou nas diluições realizadas (diluído 10 vezes e diluído 100 vezes) com os pares de iniciadores 357F-806R e 515F-806R. Os resultados individuais destes testes foram demonstrados nas tabelas 10, 11 e figura 17.

Tabela 10. Avaliação da intensidade de amplificação dos seis protocolos de extração de DNA utilizando os pares de iniciadores 515F-806R para 16S RNAr procariota em ninfas de *Rhipicephalus microplus*.

Iniciador	Protocolos de Extração					
16SrDNA (515-806)	1 (água)	2 (InstaGene)	3 (Kit)	4 (Fenol)	5 (Mud)	6 (Hotshot)
10 ⁰	-	+++	+++	+++	++	++
10 ⁰	-	+++	+++	+++	++	++
10 ⁻¹	-	++	++	+++	+	+
10 ⁻¹	-	++	++	+++	+	+
10 ⁻²	-	+	++	++	-	-
10 ⁻²	-	+	++	++	-	-

+++; Bandas muito intensas; ++: Bandas com intensidade média; +: Bandas com intensidade fraca; - amostras sem amplificação.

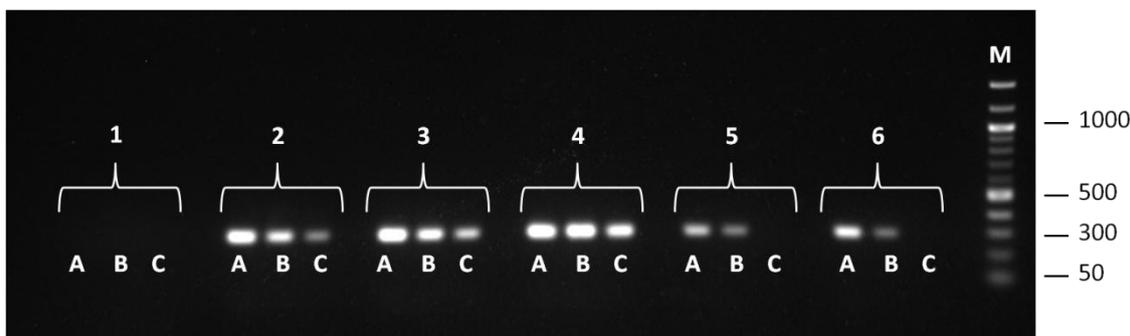


Figura 17. Gel de agarose (1,5%) corado em brometo de etídeo. Análise representativa da tabela 10 dos padrões de bandas de PCR produzidos amplificação do amplicon 16S RNAr procariota gerado por ninfas de *Rhipicephalus microplus* extraídas com seis protocolos. As tríades entre parênteses representam cada amostra utilizada para a PCR onde se encontram amostras sem diluição (A) e diluídas serialmente 10 vezes (B) e diluídas 100 vezes (C) de cada protocolo de extração sendo 1-Fervura em água estéril; 2- InstaGene; 3- Kit Qiagen; 4- Fenol:clorofórmio; 5- Mud e 6- HotShot modificado utilizando o par de iniciadores 515F-806R. A intensidade das bandas revela a eficiência dos protocolos onde +++ são bandas com intensidade alta (12 ng); ++ bandas com intensidade média (5 ng) e + bandas com intensidade fraca (1 ng). Protocolo 1: amostras A, B e C negativas. Protocolo 2: amostras A +++, B ++ e C +. Protocolo 3: A +++, B ++ e C ++. Protocolo 4: A +++, B +++ e C ++. Protocolo 5: A ++, B + e C negativo. Protocolo 6: A ++, B + e C negativo. Coluna M = marcador de tamanho de DNA (Thermo scientific GeneRuler; 100 bp DNA ladder).

Tabela 11. Avaliação da intensidade de amplificação dos seis protocolos de extração de DNA utilizando os pares de iniciadores 357F-806R para 16S RNAr procariota em ninfas de *Rhipicephalus microplus*.

Iniciador 16SrDNA (357-806)	Protocolos de Extração					
	1 (água)	2 (InstaGene)	3 (Kit)	4 (Fenol)	5 (Mud)	6 (Hotshot)
10 ⁰	-	+++	++	+++	++	++
10 ⁰	-	+++	++	+++	++	++
10 ⁻¹	-	+++	++	+++	+	+
10 ⁻¹	-	+++	++	+++	+	+
10 ⁻²	-	++	+	++	-	-
10 ⁻²	-	++	+	++	-	-

+++; Bandas com intensidade alta; ++; Bandas com intensidade média; +; Bandas com intensidade fraca; - amostras sem amplificação.

Com os três protocolos restantes, 2 (InstaGene), 3 (Kit) e 4 (Fenol:clorofórmio) foi acrescentado ao teste a espécie *Amblyomma parvum* e as fases de larva e ninfa de ambas as espécies para comparação, além das análises com o par de iniciadores para 16S DNAr mitocondrial (Tabela 12).

Tabela 12. Avaliação da intensidade de amplificação dos três protocolos de extração de DNA (InstaGene, kit, fenol:clorofórmio) utilizando os pares de iniciadores para 16S DNAr mitocondrial para larvas e ninfas de *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma parvum*.

Iniciador 16SrDNA mitocondrial	InstaGene	Kit	Fenol	InstaGene	Kit	Fenol	InstaGene	Kit	Fenol
Fase	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
LP1	-	++	++	+	+	+++	-	-	-
LP2	-	++	++	+	+	+++	-	-	-
LP1	-	++	++	+	+++	+++	-	-	-
LP2	-	++	++	+	+++	+++	-	-	-
LR1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
LR2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
LR1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
LR2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++
NP1	+	+++	++	+++	++	+++	+	-	-
NP2	+	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
NP1	+	+++	++	+++	++	+++	+	-	-
NP2	+	+++	++	+++	+++	+++	+	-	-
NR1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NR2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NR1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
NR2	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

LR: Larva de *R. microplus*; NR: Ninfa de *R. microplus*; LP: larva de *A. parvum*; NP: Ninfa de *A. parvum*. Duas repetições 1 e 2. +++: Bandas com intensidade alta; ++: Bandas com intensidade média; +: Bandas com intensidade fraca; - amostras sem amplificação. Amostras concentradas (100), diluídas 10 vezes (10-1) e diluídas 100 vezes (10-2).

O protocolo 2 (InstaGene) para 16S DNAr mitocondrial de *A. parvum* em amostras sem diluição de larvas foi ineficiente e em ninfas foram fracamente positiva. A eficiência do método teve melhora quando as amostras foram diluídas 10 vezes apresentando ampliações com intensidade média, contudo quando diluídas 100 vezes param de amplificar novamente. Este protocolo (2) foi melhor para a extração do 16S DNAr de *R. microplus* que apresentou resultados semelhantes em todas as diluições para este e para os protocolos que utilizam o Kit (protocolo 3) e fenol:clorofórmio (protocolo 4).

Quanto às reações de PCR para 16S RNAr procariota, ambas as espécies *A. parvum* e *R. microplus*, que utilizaram os pares de iniciadores 357F-806R mostraram bandas mais intensas nos protocolos que utilizam Fenol:clorofórmio e Kit comparada as amostras extraídas com InstaGene. A eficiência deste par de iniciadores aumentou nas amostras diluídas 10 vezes sendo, contudo Fenol:clorofórmio e Kit ainda os melhores protocolos de extração. Nas

amostras diluídas 100 vezes, a amplificação mostrou que somente algumas ninfas de *A. parvum* e *R. microplus* continuaram a ser positivas no protocolo que utiliza o Fenol:clorofórmio, as demais amostras extraídas com os protocolos do Kit e InstaGene perderam a intensidade de suas bandas nesta diluição.

O par de iniciadores 515F-806R que amplificam as regiões hipervariável 4 foram considerados mais sensíveis pois conseguiram amplificar fragmentos do 16S RNAr de amostras que foram fracas ou negativas para amostras amplificadas com os iniciadores 357F-806R. Para o conjunto de iniciadores 515F-806R, amostras extraídas com os protocolos Kit e Fenol:clorofórmio apresentaram intensidade de bandas mais fortes do que as amostras concentradas extraídas com InstaGene oriundas de larvas e ninfas de ambas as espécies de ixodídeos. Quando as amostras foram diluídas 10 vezes a intensidade das bandas das amostras de larvas apresentaram melhores resultados com o protocolo Fenol:clorofórmio, e ninfas apresentaram amplificação média para os três protocolos. Larvas de *A. parvum* e de *R. microplus*, nas amostras diluídas 100 vezes para os três protocolos perderam a intensidade de suas bandas enquanto que em ninfas a intensidade foi alta, havendo, porém uma diferença notável entre as espécies, onde as amostras de *A. parvum* foram melhores amplificadas do que *R. microplus* (Tabelas 13 e 14).

Tabela 13. Avaliação da intensidade de amplificação dos três protocolos de extração de DNA (InstaGene, kit, fenol:clorofórmio) utilizando o par de iniciadores para 16S RNAr procarionta 357F-806R para larvas e ninfas de *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma parvum*.

Iniciador 357F-806R	InstaGene	Kit	Fenol	InstaGene	Kit	Fenol	InstaGene	Kit	Fenol
Fase	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
LP1	+	+	+	+	++	++	-	-	-
LP2	+	+	+	+	++	++	-	-	-
LP1	-	+	+	+	+	++	-	-	-
LP2	-	+	+	+	+	++	-	-	-
LR1	+	+	++	++	+++	++	+	-	+
LR2	+	+	+++	++	+++	++	-	-	-
LR1	+	+	+++	++	+++	++	-	+	-
LR2	+	+	+++	++	+++	++	-	-	-
NP1	-	++	++	+++	+++	+++	-	+	-
NP2	-	++	++	+++	+++	+++	+	+	++
NP1	-	++	++	+++	+++	+++	-	+	++
NP2	-	++	++	+++	+++	+++	-	+	++
NR1	-	+++	++	+++	+++	+++	++	-	++
NR2	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	++
NR1	-	+++	+++	++	++	+++	-	-	-
NR2	-	+++	+++	++	++	+++	-	-	-

LR: Larva de *R. microplus*; NR: Ninfa de *R. microplus*; LP: larva de *A. parvum*; NP: Ninfa de *A. parvum*. Duas repetições 1 e 2. +++: Bandas com intensidade alta; ++: Bandas com intensidade média; +: Bandas com intensidade fraca; - amostras sem amplificação. Amostras concentradas (100), diluídas 10 vezes (10-1) e diluídas 100 vezes (10-2).

Tabela 14. Avaliação da intensidade de amplificação dos três protocolos de extração de DNA (InstaGene, kit, fenol:clorofórmio) utilizando o par de iniciador para 16S RNAr procariota 515F-806R para larvas e ninfas de *Rhipicephalus microplus* e *Amblyomma parvum*.

Iniciador 515F-806R	InstaGene	Kit	Fenol	InstaGene	Kit	Fenol	InstaGene	Kit	Fenol
Fase	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	10 ⁻²
LP1	++	++	++	+	+	++	-	+	+
LP2	++	++	++	+	+	++	-	-	+
LP1	++	++	++	+	+	++	-	+	+
LP2	++	++	++	+	+	++	-	-	+
LR1	+++	+++	+++	++	++	++	++	-	-
LR2	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-
LR1	+++	+++	+++	++	++	++	+	+	-
LR2	+++	+++	+++	++	++	++	+	-	-
NP1	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++
NP2	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
NP1	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++
NP2	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++	+++
NR1	+	+++	++	+++	+++	++	+++	+	+
NR2	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+
NR1	++	+++	+++	++	++	++	-	-	-
NR2	+	+++	+++	++	++	+++	-	-	-

LR: Larva de *R. microplus*; NR: Ninfas de *R. microplus*; LP: larva de *A. parvum*; NP: Ninfas de *A. parvum*. Duas repetições 1 e 2. +++: Bandas com intensidade alta; ++: Bandas com intensidade média; +: Bandas com intensidade fraca; - amostras sem amplificação. Amostras concentradas (10⁰), diluídas 10 vezes (10⁻¹) e diluídas 100 vezes (10⁻²).

Oito amostras de larvas *A. longirostre* coletadas de *Dendrocincla turdina* (Dendrocolaptidae) também foram testadas para os protocolos Fenol:clorofórmio e Kit, que apresentaram melhor resultado em amostras de *A. parvum* e *R. microplus*. Nos testes com o par de iniciadores para 16S DNAr mitocondrial, todas as amostras sem diluição, extraídas com kit e fenol:clorofórmio apresentaram bandas com intensidade alta. Porém, ao diluir as amostras da extração em 10 vezes (10⁻¹) o protocolo com Fenol:clorofórmio detectou maior número de amostras com intensidade alta e média. Em amostras diluídas 100 vezes (10⁻²) nenhuma das amostras amplificou com nenhum dos protocolos de extração.

Com os iniciadores para 16S RNAr procariota, o conjunto de iniciadores 357F-806R, em amostras concentradas de *A. longirostre*, tiveram amplificações com intensidades semelhantes para ambos os protocolos. A eficiência de ambos os protocolos foi menor em amostras diluídas 10 vezes e foi mantida constante, com intensidade média, em duas amostras diluídas 100 vezes extraídas com protocolo Fenol:clorofórmio. O par de iniciadores 515F-806R nas amostras sem diluição e diluídas 10 vezes tiveram resultados semelhantes ao apresentado pelos iniciadores 357F-806R diferindo somente nas amostras diluídas 100 vezes que foram negativas para a maioria das amostras. Contudo, as amostras 5 e 7 diluídas 100 vezes, provenientes da extração com Fenol:clorofórmio, foram fracamente positivas para os iniciadores 515F-806R (Tabela 15).

Tabela 15. Avaliação da intensidade de amplificação dos protocolos de extração de DNA que utilizam kit e fenol:clorofórmio utilizando os pares de iniciadores para 16S DNAr mitocondrial e 16S RNAr procariota (357F-806R e 515F-806R) para larvas de *Amblyomma longirostre* (1 a 8) coletadas em aves silvestres da família Dendrocolaptidae.

Protocolo de extração	Amostras	16S DNAr mitocondrial			357F-806R			515F-806R		
		10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
Kit	1	+++	++	-	+++	++	+	+++	++	-
Kit	2	+++	++	-	+++	++	+	+++	++	-
Kit	3	+++	+	-	+++	++	+	+++	++	-
Kit	4	+++	+	-	++	++	+	++	++	-
Fenol	5	+++	+++	-	+++	+++	++	+++	+++	+
Fenol	6	+++	++	-	++	+	-	++	+	-
Fenol	7	+++	++	-	+++	++	++	+++	++	+
Fenol	8	+++	+	-	+++	++	++	+++	++	-

+++ : Bandas com intensidade alta; ++ : Bandas com intensidade média; + : Bandas com intensidade fraca; - amostras sem amplificação.

4 DISCUSSÃO

Os protocolos que utilizam a fervura em água estéril e Hotshot modificado possuem várias vantagens óbvias. Além de terem sido as metodologias mais rápidas avaliadas, os reagentes utilizados foram baratos comparados aos demais protocolos, simples de preparar e estáveis à temperatura ambiente. Contudo, a ausência de amplificação verificada nas amostras extraídas com o método que utiliza a fervura em água estéril pode ser devido a não inativação de cofatores de DNases.

Barea et al. (2004) relataram que em amostras contendo sangue, a hemoglobina pode inibir a reação da DNA polimerase, já que os íons Fe^{++} , competidores dos íons Mg^{++} , são resistentes à fervura. É sabido que o armazenamento de ferro é necessário para o desenvolvimento do embrião de ixodídeos e que, a ausência de seu armazenamento adequado pode ser fatal para a eclosão das larvas (HAJDUSEK et al. 2009). Ainda, Hill e Gutierrez (2003) sugerem que a presença de polissacarídeos (quitina presente no exoesqueleto de carrapatos) e/ou proteínas residuais juntamente com o DNA são os responsáveis pela ineficiência de amplificação pela PCR. Mesmo que estes tenham sido os motivos da ineficiência da extração que utiliza fervura em água estéril, é importante salientar que este método tem resultados diferentes que parece ser dependente da fonte do material genético. Na extração de DNA de outros artrópodes hematófagos, como *Ctenocephalides felis*, foi eficiente na investigação de sua microbiota (PORNWIROON et al. 2007), mas ineficiente em amostras de pelos de cavalos (*Equus caballus*) (LACORTE et al. 2004) e em materiais de arquivo como esfregaços de sangue periférico (BAREA et al. 2004).

Já a extração baseada em lise alcalina seguida de neutralização com tris (HotShot) tem sido utilizada em muitos estudos que visam uma rápida, de baixo custo e eficaz extração de DNA (MONTERO-PAU et al. 2008; BREWSTER et al. 2013). O resultado apresentado pela extração realizada pela metodologia que utiliza Hotshot modificado foi semelhante ao apresentado pelo protocolo intitulado Mud, porém inferior ao apresentado pelos protocolos que utilizaram kit, fenol:clorofórmio e InstaGene. Contudo, este método tem grande aceitação na extração de diversas fontes de DNA e desde a primeira vez em que foi utilizado, Truett et al. (2000) relatou sua qualidade semelhante ou até superior quando comparada a utilização de kit comercial na extração de DNA de *Helicobacter* spp. provenientes de fezes. Apesar disso, este mesmo autor ainda lembra que o sucesso de extrações de DNA com o método HotShot depende de uma padronização, para cada caso em que seja aplicada, de modo a atingir resultados consistentes. Ainda assim, mesmo testando diferentes temperaturas de aquecimento para este protocolo, Alasaad et al. (2008) associou o baixo rendimento da extração de DNA de algumas amostras de *Sarcoptes scabiei* à composição de seu exoesqueleto que, como em ixodídeos é composto de quitina (SONENSHINE, 1993). A dificuldade de ruptura do exoesqueleto de carrapatos já foi associada como uma das principais dificuldades na extração de DNA de carrapatos (RODRÍGUEZ et al. 2014), e na intenção de contornar essa dificuldade que todos os protocolos utilizados, assim como o HotShot, associaram a utilização das soluções de lise (de acordo com o protocolo) juntamente à ruptura tecidual mecânica, ou com pérolas de vidro (“beads”) ou com pistilos (“pestles”). Assim, é possível que a ineficiência observada para este protocolo seja devido à presença de inibidores da TaqPolimerase na reação da PCR.

Curiosamente a metodologia intitulada Mud, considerada um kit caseiro, não teve resultados bons. Mais testes para otimização deste protocolo são necessários, pois se acredita que sua eficiência possa ser semelhante ao kit comercial com a vantagem do baixo custo. Isso porque estudos utilizam o tiocianato de guanidina em extrações de DNA de carrapatos visando a detecção de microrganismos tem relativo sucesso (SANGIONI et al. 2005;

LABRUNA 2008; OGRZEWALSKA et al. 2011, 2014; SARAIVA et al. 2013). Além disso, sua associação à purificação com terra de diatomácea revelou ser um bom método de extração de DNA de carrapatos *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Rhipicephalus*, *Argas* e *Ixodes* com ausência de inibição nas reações de PCR (HUBBARD et al. 1995). O sucesso da utilização da terra de diatomácea no passo da purificação do DNA também tem sido relatado com diferentes fontes de material genético, como *Echinococcus granulosus* (KAMENETZKY et al. 2000), culturas bacterianas (SERMWITTAYAWONG et al. 2013) e na detecção de *Brucella abortus* (VEJARANO et al. 2013).

Em comparações de metodologias de extração de DNA de ácaros hematófagos *Dermanyssus gallinae*, amostras extraídas com InstaGene não demonstraram boas ampliações nas reações de PCR realizadas, principalmente quando comparadas àquelas provenientes de extrações com o uso de Kit comercial (DESLOIRE et al. 2006). Desloire et al. (2006) ainda relacionaram a ineficiência deste método à presença de inibidores que se intensificaram nas amostras extraídas de ácaros ingurgitados.

Ganz e Gill (2013) já haviam sugerido que a diluição de amostras extraídas com InstaGene apresentasse uma melhora na amplificação, pois do mesmo modo que o DNA seria diluído, os inibidores também o seriam. Mesmo assim, ainda que as amostras diluídas tenham demonstrado melhora na intensidade das bandas reveladas no gel para este protocolo, uma metodologia que dependesse de uma diluição do DNA extraído se tornaria inviável diante de uma grande quantidade de amostras, que é o esperado em avaliações ambientais. Assim, levando-se em consideração este fato além da ineficiência do protocolo 2 (InstaGene) na extração de DNA de larvas de *A. parvum*, optou-se pela eliminação desta metodologia pois, as soluções extraídas revelaram curta longevidade que, após três meses conservadas a -20°C perderam intensidade das bandas amplificadas quando comparadas às bandas amplificadas logo após a extração.

Hill e Gutierrez (2003), sem razão conhecida, relataram a maior susceptibilidade do DNA de ixodídeos à degradação e ainda acrescentam que essa degradação foi intensificada em metodologias que utilizam etanol no passo da precipitação. Comparativamente, nos resultados analisados neste estudo, somente amostras extraídas com InstaGene demonstraram uma visível degradação no decorrer do tempo.

São escassos os estudos que avaliam diferentes metodologias na detecção de microrganismos presentes em ixodídeos. Junttila et al. (1999) analisou diferentes métodos de detecção de *Borrelia burgdorferi* em *Ixodes ricinus*, onde uma das metodologias que visou a extração genômica através do InstaGene se mostrou menos eficiente do que a detecção por microscopia de campo escuro e por cultura. Este autor não relata os motivos baixa detecção através da PCR, mas é provável que a baixa eficiência da extração associada à presença de inibidores seja crucial na amplificação do DNA de microrganismos que, naturalmente se encontram em menor quantidade do que o DNA do próprio carrapato.

Halos et al. (2004) comparou metodologias de extração de DNA baseada em Kit comercial (o mesmo utilizado no presente estudo) e em fenol:clorofórmio de *Dermacentor* sp. *Rhipicephalus* sp. e *Ixodes ricinus* e verificou que tanto fenol:clorofórmio quanto kit (utilizando pérolas de vidro como meio auxiliar de disruptão tecidual) apresentaram resultados semelhantes e satisfatórios. Esse mesmo autor ainda verificou, durante a análise das metodologias de extração, uma diferença na amplificação das amostras dependendo da espécie de carrapato analisada.

De fato, se a finalidade da extração genômica for a análise do DNA do carrapato, ambos os métodos fenol:clorofórmio e kit ofereceram bons resultados, e ainda, se a intenção de análise for imediata, InstaGene também pode ser uma ferramenta rápida e útil ao levar-se em consideração a possível necessidade de diluição das amostras. Contudo, nas análises da microbiota, fenol:clorofórmio parece, a princípio, levar vantagem sobre o kit, já que mesmo

em amostras diluídas 100 vezes foi possível a detecção de DNA amplificável em algumas amostras. A literatura não demonstra a utilização de uma metodologia padrão para extração de DNA de carrapatos visando a detecção de microrganismos presentes em ixodídeos. Análises da presença de *Rickettsia* em carrapatos foi verificada com a utilização de kits comerciais (ABARCA et al. 2012; VENZAL et al. 2013; MUKHERJEE et al. 2014) e pelo método que utiliza tiocianato de guanidina seguido de purificação com clorofórmio (SANGIONI et al. 2005; LABRUNA 2008; OGRZEWALSKA et al. 2011, 2014; SARAIVA et al. 2013).

Vale ressaltar que a aplicação de uma técnica de extração genômica que seja inteiramente eficiente para todas as espécies de carrapatos é improvável, tendo em vista as diferenças apresentadas neste estudo entre *A. longirostre*, *A. parvum* e *R. microplus* e no estudo de Halos et al. (2004) visto entre *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Ixodes ricinus*. Por fim, pouco se sabe sobre a diversidade da microbiota existente em carrapatos e ainda suas individualidades no que diz respeito a cada espécie de ixodídeo. Por isso, a padronização da metodologia de extração que aperfeiçoe a maior recuperação de DNA microbiano proveniente de carrapatos é necessária, já que diversos estudos que relacionam agentes patogênicos transmitidos por estes animais são realizados frequentemente.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os novos registros de aves silvestres hospedeiras de carrapatos demonstrou a relevância de inquéritos parasitológicos em remanescentes de Mata Atlântica do estado do Rio de Janeiro.
- *Amblyomma longirostre* foi a espécie mais prevalente relacionada a aves silvestres na Mata Atlântica do Rio de Janeiro.
- Aves pertencentes à Dendrocolaptidae tem estreita relação com *A. longirostre*.
- A identificação de larvas de *A. longirostre* através da descrição feita por Barros-Battesti, et al. (2005) foi uma alternativa eficiente, sem a necessidade de clarificação, porém dependente do estado de ingurgitamento do espécime coletado.
- A alta prevalência de “*Ca. Rickettsia amblyommii*” encontrada em *A. longirostre* demonstra a existência de uma relação ecológica próxima desses dois organismos que necessita de maiores estudos para compreensão do real papel desta bactéria no ixodídeo.
- A utilização das endonucleases *MspI* e *RsaI* na digestão do amplicon *ompB* geraram padrões de bandas que permitiram a diferenciação entre as espécies de *Rickettsia* encontradas associadas a aves silvestres.
- O protocolo PCR-RFLP desenvolvido se apresentou como uma rápida (24 a 48 horas), robusta e eficiente metodologia para o diagnóstico de *Rickettsia* encontradas associadas a aves silvestres.
- A extração genômica que tenha por finalidade a análise do DNA do carrapato pode utilizar os métodos fenol:clorofórmio e kit (Qiagen).
- A metodologia de extração, para análise do DNA do carrapato, baseada na utilização do InstaGene requer, para melhor eficiência, uma análise imediata do material extraído, além da diluição das amostras.
- A aplicação de uma técnica de extração genômica que seja inteiramente eficiente, na análise da microbiota para todas as espécies de carrapatos, é improvável.
- Para análise da microbiota de ixodídeos *A. longirostre*, *A. parvum* e *R. microplus* sugere-se a extração baseada na metodologia que utiliza fenol:clorofórmio ou que utiliza o kit (Qiagen).

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABARCA, K; LÓPEZ, J; ACOSTA-JAMETT, G; LEPE, P; SOARES, J F; LABRUNA, M B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne rickettsia in Chile. *J Med Entomol*, v. 49, n.1, 219-222, 2012.
- ABDAD, M.Y.; STENOS, J.; GRAVES, S. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. *Emerg Health Threats J.* . v.4, n. 7168, p.1-7, 2011.
- ALLAN, S. A. Chemical ecology of tick-vector interactions. In W. Takken and G. J. Knols (eds.), *Olfaction of vector-host interactions*. Wageningen Academic, Wageningen, Netherlands. p. 327–348, 2010.
- ALMEIDA, A.P.; CUNHA, L.M.; BELLO, A.C.; DA CUNHA, A.P.; DOMINGUES, L.N.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* v.2, p.209-212, 2011.
- ALMEIDA, R.F.; GARCIA, M.V.; CUNHA, R.C.; MATIAS, J.; LABRUNA, M.B.; ANDREOTTI, R. The first report of *Rickettsia* spp. in *Amblyomma nodosum* in the State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* v.4, n.1-2, p.156-159, 2013.
- AMORIM, M.; OLIVEIRA PASCOAL, J; OLEGÁRIO, M M.; SZABÓ, M P J; MELO, C. Carrapatos em aves selvagens da reserva ecológica do clube de caça e pesca Itororó, Uberlândia, Minas Gerais. In: VIII Encontro Interno, Uberlândia, 2008.
- AN SF, FLEMING KA. Removal of inhibitors of the polymerase chain reaction from formalin fixed, paraffin-wax embedded tissues. *J Clin Pathol*, v. 44, n. 11, p. 924-927, 1991.
- ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari: Ixodidae) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool*, v. 22, p. 623-632, 2005.
- ARZUA, M.; SILVA, M.A.N.; FAMADAS, K.M.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. *Exp Appl Acarol*, v.31, n.3-4, p.283-296, 2003.
- AYRES, M., AYRES JÚNIOR, M., AYRES, D. L., SANTOS, A. A. BIOESTAT – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. 5 ed. Mamiraua. Belém, PA, 2007. 339p.
- BARATTO, C.M.; MEGIOLARO, F. Comparação de diferentes protocolos de extração de dna de bactérias para utilização em RAPD-PCR. *Unoesc & Ciência-ACET*, v.3, n.1, p.121-130, 2012.
- BARROS-BATTESTI D. M., ARZUA M., REBELLO V. M. M., BARBIERI F. S., FAMADAS, K. M. Description of the larva of *Amblyomma longirostre* (Koch , 1844) (Acari : Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. *Rev Bras Parasitol Vet.* v.14, n. 2, p. 51–7, 2005.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOARES, J. F.; MARCILI, A.; FAMADAS, K. M.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. *Zootaxa*, v.3178, n.31, p.22-32, 2012.

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/ICTTD-3/Butantan, 2006

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; PICHORIM, M.; KEIRANS, J.E. *Ixodes (Multidentatus) paranaensis* n. sp. (Acari: Ixodidae) a Parasite of *Streptoprocne biscutata* (Sclater 1865) (Apodiformes: Apodidae) Birds in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.98, n.1, p. 93-102, 2003.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; REBELLO, V.M.M.; BARBIERI, F.S.; FAMADAS, K.M. Description of the larva of *Amblyomma longirostre* (Koch 1844) (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.14, n.2, p.51-57, 2005.

BARROS-BATTESTI, D.M.; LUZ, H.R.; OUVEMAY, D.; ALBUQUERQUE, G.L.C.; LANDULFO, G.A.; SAMPAIO, J.S.; CARMO A.C.V.; ARLEI, M.; LABRUNA, M.B.; *Description of Ornithodoros sp.n. (Acari: Argasidae) found in Brazil on a new host class*. In: Seventh Ticks and Tick-borne Pathogens International Conference. Zaragoza, Spain: TTP7. p.57, 2011.

BERMÚDEZ, C S E; ZALDÍVAR, A Y; SPOLIDORIO, M G; MORAES-FILHO, J; MIRANDA, R. J., CABALLERO, C. M; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in domestic mammals and their ectoparasites in El Valle de Antón, Coclé, Panamá. *Vet Parasitol*, v. 177, n. 1, p. 134-138, 2011.

BIORAD- http://www.bio-rad.com/webmaster/pdfs/9184_Chelex.PDF

BOFFY, A C M; NOVAES, R L M; MELLO, G D S; SANT'ANNA, C. Registro da preguiça-de-coleira *Bradypus torquatus* (Pilosa, Bradypodidae) em três localidades do Estado do Rio de Janeiro: Nova Friburgo, Cachoeiras de Macacu e Teresópolis. *Edentata*, v. 11, n. 1, p. 78-80, 2010.

BORNSCHEIN, M R; REINERT, B L. Aves de três remanescentes florestais do norte do estado do Paraná, sul do Brasil, com sugestões para a conservação e manejo. *Rev. Bras. Zool*, v. 17, n. 3, p. 615-636, 2000.

BRASIL. Decreto Federal nº 97.780 de 23 de maio de 1989. Cria a Reserva Biológica do Tinguá, e dá outras providências. *Diário Oficial da União*, Brasília, DF, 24 mai. 1989. p. 8059.

BRASIL. Lei do Snuc - Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza nº 9.985, de 18 de julho de 2000. Institui o Sistema Nacional de Unidades de Conservação da Natureza – SNUC e estabelece critérios e normas para a criação, implantação e gestão das unidades de conservação. *Coleção de Leis do Brasil* - p. 4917, v. 7.

BRUMMELHAUS, J; WEBER, J; PETRY, M V. A influência da fragmentação da mata ciliar sobre a avifauna na Bacia Hidrográfica do Rio Caí, Rio Grande do Sul. *Neotrop Biol Conserv*, v. 7, n.1, p. 57-66, 2012.

BUDACHETRI K; BROWNING R E; ADAMSON S W; DOWD E; CHAO C; CHING W. An Insight into the Microbiome of the *Amblyomma maculatum* (Acari : Ixodidae). v. 51, n. 1, p. 119–29, 2014.

- BURNS, K J; SHULTZ, A J; TITLE, P O; MASON, N A; BARKER, F K; KLICKA, JLOVETTE, I J. Phylogenetics and diversification of tanagers (Passeriformes: Thraupidae), the largest radiation of Neotropical songbirds. *Mol Phylogenet Evol*, v. 75, p. 41-77, 2014.
- BUSH, A. O.; LAFFERTY, K. D.; LOTZ, J. M.; SHOSTAK, A. W. Parasitology mites ecology on its own terms: Margolis et al Revisited. *J Parasitol*, v.83, p.575-583, 1997.
- CEO, R.N.; KAZEROUNI, M.R.; RENGAN, K. Sorption of Silver Ions by Chelex 100 Chelating Resin. *J. Radioanal.Chem*, v.172, p.43-48, 1992.
- CESTARI, C; PIZO, M A. The use of auxiliary courts by the lek-forming White-bearded Manakin *Manacus manacus* (Aves, Pipridae). *Acta Ethol*, v. 15, n. 1, p. 73-79, 2012.
- CHACE, J F; WALSH, J J. Urban effects on native avifauna: a review. *Landscape Urban Plan*. v.74, p. 46-69, 2006.
- CHACÓN, S.C.; CORREIA, P.G.; BARBIERI, F.S. et al. Efeito de três temperaturas constantes sobre a fase não parasitária de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Rev Bras Parasitol Vet*, v.12, n.1, p.13-20, 2003.
- CHAKRAVORTY, Soumitesh et al. A detailed analysis of 16S ribosomal RNA gene segments for the diagnosis of pathogenic bacteria. *J Microbiol Methods*, v. 69, n. 2, p. 330-339, 2007.
- CHAO, A. Nonparametric estimation of the number of classes in a population. *Scand J Stat*, v. 11, n. 4, p. 265-270, 1984.
- CHIARELLO A G; CHIVERS D J; BASSI C; MACIEL M A; MOREIRA L; BAZZALO M. A translocation experiment for the conservation of maned sloths, *Bradypus torquatus* (Xenarthra: Bradypodidae). *Biol Conserv*, v. 118, p. 421-430, 2004.
- CHIARELLO A G; LARA-RUIZ P. Members of the IUCN SSC Edentate Specialist Group *Bradypus torquatus*. IUCN Red List of Threatened Species, 2008b.
- COLWEL, R. K.; CODDINGTON, J. A. Estimating terrestrial biodiversity through extrapolation. *Philos T Roy Soc B*, v. 345, n. 1311, p.101-118, 1994.
- COLWELL, D.D.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Vector-borne parasitic zoonoses: emerging scenarios and new perspectives. *Vet Parasitol*. v.182, n.1, p.14-21, 2011.
- COMITÊ BRASILEIRO DE REGISTROS ORNITOLÓGICOS (2014) Listas das aves do Brasil. 11ª Edição. Disponível em <<http://www.cbro.org.br>>. Acesso em: 08 de abril de 2014.
- COSTA-SANTOLIN, Í.D.A.C.; LUZ, H R.; ALCHORNE, N.M.; PINHEIRO, M.C.; MELINSKI, R.D.; FACCINI, J.L.H.; FERREIRA, I.; FAMADAS, K.M. Ticks on birds caught on the campus of the Federal Rural University of Rio de Janeiro. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v.21, p.213-218, 2012.
- COPATTI, Carlos Eduardo; DO AMARAL, Adriane Dias; DE MOURA, Carine Franciele Alles. Aves em ecótono Mata Atlântica-Pampa no Sul do Brasil. *Ciência e Natura*, v. 35, n. 2, p. 30-40, 2014.
- CROOKS, E; RANDOLPH, S E. Walking by *Ixodes ricinus* ticks: intrinsic and extrinsic factors determine the attraction of moisture or host odour. *J Exp Biol*, v. 209, p. 2138-2142, 2006.

- CRUMP, B. C., KLING, G. W., BAHR, M., HOBBIE, J. E. Bacterioplankton Community Shifts in an Arctic Lake Correlate with Seasonal Changes in Organic Matter Source. *Appl Environ Microbiol* v. 69, n. 4, p. 2253-2268, 2003.
- CRUMP, B.C.; KLING, G.W.; BAHR, M.; HOBBIE, E. Bacterioplankton Community Shifts in an Arctic Lake Correlate with Seasonal Changes in Organic Matter Source. *Appl. Environ. Microbiol.* V.69, n.4, p.2253-2268, 2003.
- CUNHA, N.C.; FONSECA, A.H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A.R.M.; BARREIRA, J.D.; MASSARD, C.L.; LEMOS, E.R.S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.29, n.2, p.105-108, 2009.
- DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol*, v.28, n.10, p.437–46, 2012b.
- DANTAS-TORRES, F.; FIGUEREDO, L.A.; BRANDÃO-FILHO, S.P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.39, p.64–67, 2006.
- DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. The ticks (Acari : Ixodida : Argasidae , Ixodidae) of Brazil. *Syst. Appl. Acarol*, v.14, p.30–46, 2009.
- DANTAS-TORRES, F.; VENZAL, J.M.; BERNARDI, L.F.O.; FERREIRA, R.L.; ONOFRIO, V.C.; MARCILI, A. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. *J Parasitol*, v.98, n.1, p.36-45, 2012a.
- DESBIEZ, A. L. J., KEUROGHLIAN, A., DE MELLO BEISIEGEL, B., MEDICI, E. P., GATTI, A., PONTES, A. R. M., ALMEIDA, L. B. 2012. Avaliação do risco de extinção do cateto *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758, no Brasil. *Biodivers Bras*, v. 1, p. 74-83.
- DESLOIRE, S.; VALIENTE MORO, C.; CHAUVE, C.; ZENNER, L. Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet. Res.*, v.37, p.725-732, 2006.
- DESLOIRE, S; MORO, C V; CHAUVE, C; ZENNER, L. Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermanyssidae). *Vet Res*, v. 37, n. 5, p. 725-732, 2006.
- DEVELEY, P. F.; ENDRIGO, E. **Aves da Grande São Paulo**: Guia de Campo. Editora: AVES E FOTOS. 2004. 320p.
- DING XIAO-FEI, CHONG-DE WU, LI-QIANG ZHANG, JIA ZHENG, RONG-QING ZHOU. Characterization of eubacterial and archaeal community diversity in the pit mud of Chinese Luzhou-flavor liquor by nested PCR–DGGE. *World J Microb Biot*, v.30, n.2, p.605-612, 2014.
- EBELING, W.; HENNRICH, N.; KLOCKOW, M.; METZ, H.; ORTH, H.D.; LANG, H. Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur J Biochem*, v.47, n.1, p.1–7, 1974.
- ERICSON, P. G. P.; CHRISTIDIS, L.; COOPER, A.; IRESTEDT, M.; JACKSON, J.; JOHANSSON, U. S.; NORMAN, J. A. A Gondwanan origin of passerine birds supported by DNA sequences of the endemic New Zealand wrens. *Proc R Soc Lond B* v. 269, p. 235–241, 2002.
- ESTRADA-PENA, A.; FARKAS, R.; JAENSON, T.G.T.; KOENEN, F.; MADDER, M.; PASCUCCI, I.; SALMAN, M.; TARRÉS-CALL, J.F.J. Received: Association of

- environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari : Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. *Exp Appl Acarol.* v.59, n.3, p.351–366, 2013.
- FACCINI, J.L,H.; BARROS-BATTESTI, D.M.; *Aspectos gerais da biologia e identificação de carrapatos.* In Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006 p. 13-27.
- FARRELL, R.E. JR. RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization. Third Ed. USA: *Elsevier Academic Press*, p.60-61, 2005.
- FERREIRA, I; VENTURA, P. E. C.; LUZ, H. R. *Aves no campus da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.* Editora da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. 2010. 255p.
- FLECHTMANN, C. H. W. *Elementos de acarologia.* São Paulo: Nobel, 1975. 344 p.
- FONSECA, L. M.; MARTINS, A. V. Febre maculosa: Revisão de literatura – Artigo Revisão. *Saúde & Amb. Rev.* v.2, n.1, p.01-20, 2007.
- FRANCISCHETTI, I.M; SA-NUNES, A; MANS, B.J; SANTOS, I.M; RIBEIRO, J.M. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci* v. 14, p. 2051–2088, 2009
- FREIRE, J. J. Fauna parasitária riograndense. II. Cabra, búfalo, camelo, cavalo, porco, furão, grachaim, gato doméstico, gato do mato e coelho. *Rev. Med. Vet.* v. 3, p. 143-158, 1967.
- FREITAS, A V L; LEAL, I R; PRADO, M U, IANNUZZI, L. Insetos como indicadores de conservação da paisagem, p.357-385. In ROCHA C F, BERGALO H, VAN SLUYS M, ALVES M A (Eds). *Biologia da conservação: essências.* São Carlos, Rima Editora, p. 357-384, 2006.
- GANZ, K.; GILL, A. Inhibition of polymerase chain reaction for the detection of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enteric* on walnut kernels. *J. Food Microbiol.* v.35, n.1, p.15-20, 2013.
- GARG, B.S.; SHARMA, R.K.; BHOJAK, N.; MITTAL, S. Chelating Resins and their Applications in the Analysis of Trace Metal Ions. *Microchemical Journal*, v.61, p.94-114, 1999.
- GEHRKE, F.S.; GAZETA, G.S.; SOUZA, E.R.; RIBEIRO, A.; MARRELLI, M.T.; SCHUMAKER, T.T.S. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia sp* . TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro / Brazil. *Clin Microbiol Infec*, v.15, S. 2, p.267–268, 2009.
- GILLESPIE, J.J.; BEIER, M.S.; RAHMAN, M.S.; AMMERMAN, N.C.; SHALLOM, J.M; PURKAYASTHA, A.; SOBRAL, B.S.; AZAD, A.F. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. *PLoS One.* v.2, p.266, 2007.
- GOMES, J P.; IANNUZZI, L; LEAL, I R. Resposta da comunidade de formigas aos atributos dos fragmentos e da vegetação em uma paisagem da Floresta Atlântica nordestina. *Neotrop Entomol*, v. 39, n. 6, p. 898-905, 2010.
- GRAHAM, R.I.; MAINWARING, M.C.; DU FEU, R. Detection of spotted fever group *Rickettsia spp.* from bird ticks in the U.K. *Med. Vet. Entomol.* , v.24, p.340-343. 2010

- GREENSPOON, S.A.; SCARPETTA, M.A.; DRAYTON, M.L.; TUREK, S.A. QIAamp Spin Columns as a Method of DNA Isolation from Forensic Casework. *J Forensic Sci*, v.43, p.1024-1030, 1998.
- GRIBBEN, J G; FREEDMAN, AS; WOO, S D et al. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood*, v. 78, n. 12, p. 3275-3280, 1991.
- GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M.M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S.; VENZAL, M.; MANGOLD, A. J.; SZABO, M.P.J.; MARTINS, J.R.; GONZALEZ-ACUNA, D.; ESTRADA- PENA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol* v.40, p.83-100, 2006.
- GUGLIELMONE, A A.; NAVA, S. Names for Ixodidae (Acari: Ixodoidea): valid, synonyms, incertae sedis, nomina dubia, nomina nuda, lapsus, incorrect and suppressed names with notes on confusions and misidentifications. *Zootaxa*, v. 3767, n. 1, p. 1-256, 2014.
- GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.A.; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G.; SHAO, R.; BARKER, S.C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world. *Zootaxa*, v.28, p.1–28, 2010.
- GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M *Ectoparasitos de importância veterinária*. 2001 São Paulo: Plêiade. 218p.
- HACKSTADT, T. The biology of rickettsiae. *Infect Agents Dis*. v.5, p.127–143, 1996.
- HAJDUSEK, O; SOJKA, D; KOPACEK, P; BURESOVA, V; FRANTA, Z; SAUMAN, I; GRUBHOFFER, L. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. *Proc Nat Acad Sci*, v. 106, n. 4, p. 1033-1038, 2009.
- HALOS, L.; JAMAL, T.; VIAL, L.; MAILLARD, R.; SUAU, A.; MENACH, A.L.; BOULOUIS, H.J.; TAUSSAT, M.V. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. *Vet Res*, v.35, p.709- 713, 2004.
- HAMER, S.A.; GOLDBERG, T.L.; KITRON, U.D.; BRAUN, J.D.; ANDERSON, T.K.; LOSS, S.R.; WALKER, E.D.; HAMER, G.L. Wild Birds and Urban Ecology of Ticks and Tick-borne Pathogens, Chicago, Illinois, USA, 2005–2010. *Emerg Infect Dis*. v.18, n.10, p.2005–2010, 2012.
- HAMMER, O.; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. Past: Paleontological Statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electron*, v.4, n.1, 2001.
- HARPER, L H. The persistence of ant-following birds in small Amazonian forest fragments. *Acta Amaz*, v. 19, p. 249-263, 1989.
- HASLE, G.; BJUNE, G.; EDVARSEN, E.; JAKOBSEN, C.; LINNEHOL, B.; RØER, J.; MEHL, R.; RØED, K.; PEDERSEN, J.; LEINAS, H. Transport of ticks by migratory passerine birds to Norway. *J Parasitol*, v.95, p.1342-1351, 2009.
- HERRMANN, C.; GERN, L. Do the level of energy reserves, hydration status and *Borrelia* infection influence walking by *Ixodes ricinus* (Acari: Ixodidae) ticks? *Parasitol*, v. 139, n. 3, p. 330-337, 2012.
- HILL, C.A.; GUTIERREZ, J.A. A method for extraction and analysis of high quality genomic DNA from ixodid ticks. *Med Vet Entomol*, v.17, n.2, p.224-227, 2003.

- HIRSCH, A; CHIARELLO, A G. The endangered maned sloth *Bradypus torquatus* of the Brazilian Atlantic forest: a review and update of geographical distribution and habitat preferences. *Mammal Rev*, v. 42, n.1, p. 35-54, 2012.
- HIRUNKANOKPUN, S.; KITTAYAPONG, P.; CORNET, J. Molecular Evidence for Novel Tick-Associated Spotted Fever Group Rickettsiae from Thailand. *Vector-borne Dis*, v.40, n.2, p.230–237, 2003.
- HONG, S. H.; BUNGE, J.; JEON, S. O.; EPSTEIN, S. S. Predicting microbial species richness. *Proc Natl Acad Sci USA* v. 103, n. 1, p. 117-122, 2006.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Adv Parasitol* , v.24, p.135-238, 1985.
- HORTA, M C; LABRUNA, M B; PINTER, A; LINARDI, P M; SCHUMAKER, T T S. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 7, p. 793-801, 2007.
- HOSS, M.; PAABO, S. DNA Extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. *Nucleic Acids Res*, n.21, p.3913-3914, 1993.
- HUBBARD, M J; CANN, K J; WRIGHT, D J M. Validation and rapid extraction of nucleic acids from alcohol-preserved ticks. *Exp App Acarol*, v. 19, n. 8, p. 473-478, 1995.
- HULER J., ROUNTREE, N. R., DIAMOND, S. E., STELINSKI, L. L., FIERER, N., DUNN, R. R. Mycangia of ambrosia beetles host communities of bacteria. *Microbiol Ecol* v. 64, n. 3, p. 784-93, 2012.
- IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. PLANO DE MANEJO REBIO-TINGUÁ, 2006. 951p.
- IBAMA. *Reserva Biológica do Tinguá*. In: Unidades de Conservação do Brasil. Brasília. Vol. 1. p. 168-170, 1989.
- JACOBSEN, C.S.; RASMUSSEN, O.F. Development and Application of a New Method To Extract Bacterial DNA from Soil Based on Separation of Bacteria from Soil with Cation-Exchange Resin. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.58, p.2458-2462, 1992.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. *Parasitol*, v.129, S3–S14. 2004
- JORDAN, B. E.; ONKS, K. R.; HAMILTON, S. W.; HAYSLETTE, S. E.; WRIGHT, S. M. Detection of *Borrelia burgdorferi* and *Borrelia lonestari* in Birds in Tennessee. *J Med Entomol*, v.46, n.1,p.131-138, 2009.
- JORGENSEN, H B; HANSEN, M M; BEKKEVOLD, D; RUZZANTE, D E LOESCHCKE, V. Marine landscapes and population genetic structure of herring (*Clupea harengus* L.) in the Baltic Sea. *Mol Ecol*, v. 14, n. 10, p. 3219-3234, 2005.
- JUNTTILA, J; PELTOMAA, M; SOINI, H; MARJAMÄKI, M; VILJANEN, M K. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes ricinus* ticks in urban recreational areas of Helsinki. *J Clin Microbiol*, v. 37, n. 5, p. 1361-1365, 1999.
- KAMENETZKY, L; CANOVA, S G; GUARNERA, E A; ROSENZVIT, M C. *Echinococcus granulosus*: DNA Extraction from Germinal Layers Allows Strain Determination in Fertile and Nonfertile Hydatid Cysts. *Exp Parasitol*, v. 95, n. 2, 122-127, 2000.

- KAUR, N.; AND, C.K.; DHANJU. Food and Feeding Habits of Common Birds of Agroecosystems. *Indian J. Ecol.* v.40, n.1, p.83-86, 2013.
- KEUROGHLIAN, A., DESBIEZ, A. L. J., DE MELLO BEISIEGEL, B., MEDICI, E. P., GATTI, A., PONTES, A. R. M, ALMEIDA, L. B. 2012. Avaliação do risco de extinção do queixada *Tayassu pecari* Link, 1795, no Brasil. *Biodivers Bras.* v. 1, p. 84-102.
- KLOMPEN, J.S.H.; BLACK, W.C.; KEIRANS, J.E.; OLIVER, JR. J.H. Evolution of ticks. *Ann Rev Entomol*, v. 41, p.141–161, 1996.
- KOHL, G. M. Concerning the identity of *Amblyomma maculatum*, *A. tigrinum*, *A. triste* and *A. ovatum* of Koch, 1844. *Proc. Entomol. Soc.* v. 58, p. 143-147, 1956.
- KUCZYNSKI, Justin et al. Experimental and analytical tools for studying the human microbiome. *Nat Rev Genet*, v. 13, n. 1, p. 47-58, 2012.
- LABRUNA MB; CAMARGO LM; TERRASSINI FA; FERREIRA F; SCHUMAKER TS; CAMARGO EP Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Syst Appl Acarol* v. 10 p. 17– 32, 2005a.
- LABRUNA MB; JORGE R, SANA D; JÁCOMO, A, KASHIVAKURA, C, FURTADO, M; FERRO, C, PEREZ S; SILVEIRA, L; SANTOS, JRT; MARQUES, S et al. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Exp Appl Acarol*, v. 36, p. 151–165, 2005b.
- LABRUNA, M B; BARBIERI, F S; MARTINS, T F; BRITO, L G; RIBEIRO, F D S. New tick records in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Rev Bras Parasitol Vet*, v. 19, n. 3, p. 192-194, 2010.
- LABRUNA, M B; OGRZEWALSKA, M; MARTINS, T F; PINTER, A. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. *J Med Entomol*, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008.
- LABRUNA, M B; SANFILIPPO, L F; DEMETRIO, C; MENEZES, A C; PINTER, A; GUGLIELMONE, A A; SILVEIRA, L F. Ticks collected from birds in the state of São Paulo, Brazil. *Exp Appl Acarol* 43:147–160, 2007a.
- LABRUNA, M B; WHITWORTH, T; BOUYER, D H; MCBRIDE, J; CAMARGO, L M A; CAMARGO, E P; WALKER, D H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol* v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004.
- LABRUNA, M. B., AMAKU, M., METZNER, J. A., PINTER, A., & FERREIRA, F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *J Med Entomol*, v. 40, n. 2, p. 170-178, 2003.
- LABRUNA, M. B., M. ROMERO, T. F. MARTINS, M. TOBLER, AND F. FERREIRA. Ticks of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) infesting tapirs (*Tapirus terrestris*) and peccaries (*Tayassu pecari*) in Peru. *Syst Appl Acarol* v. 15, p. 109–112, 2010.
- LABRUNA, M. B., MARTINS, T. F., NUNES, P. H., COSTA, F. B., PORTERO, F., VENZAL, J. M. New Records of *Amblyomma multipunctum* and *Amblyomma naponense* from Ecuador, with Description of *A. multipunctum* Nymph. *J Parasitol.* v.99, n. 6, p. 973-977, 2013.

- LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J.W.; BOUYER, D.H.; CAMARGO, L.M. A.; CAMARGO, E.P.; WALKER, A.D.H. Molecular Evidence for a Spotted Fever Group *Rickettsia* Species in the Tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *J. Med. Entomol.*, v.41,n.3, p.533-537, 2004.
- LABRUNA, M. B.; WLIPPO, L. F. S.; DEMETRIO, C.; MENEZES, A. C.; PINTER, A.; GUGLIELMONE, A. A.; SILVEIRA, L. F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v.43, p.147-160, 2007.
- LABRUNA, M.B. Ecology of rickettsia in South America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v.1166, p.156–166, 2009a.
- LABRUNA, M.B.; CAMARGO, L.M.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. *Vet. Parasitol.* v.127, p.169–174, 2005.
- LABRUNA, M.B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.15, p.458–460, 2009b.
- LABRUNA, M.B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J.M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; DE SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev. MVZ Cordoba* v.16, p.2435–2457, 2011.
- LABRUNA, M.B.; VENZAL, J.M. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. *Acta Parasitol.* v.54, p.355–363, 2009.
- LABRUNA, MB; BARBIERI, FS; MARTINS, TF. New tick records in Rondônia, Western Brazilian Amazon. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, v. 19, n. 3, p. 192-194, 2010.
- LACERDA, D. R., MARINI, M. A., SANTOS, F. R. D. Mitochondrial DNA corroborates the species distinctiveness of the Planalto (*Thamnophilus pelzelni* Hellmayr, 1924) and the Sooretama (*T. ambiguus* Swainson, 1825) Slaty-antshrikes (Passeriformes: Thamnophilidae). *Braz J Biol*, v. 67, n. 4, p. 873-882, 2007.
- LACORTE, G A; DIAS, I; CARVALHO, M. Extração não-invasiva de DNA de *Equus caballus*: Uma avaliação de métodos. In: *Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal*, v. 5, p. 1-3 2004.
- LAHIRI, D.K.; BYE, S.; NURNBERGER, J.I.; HODES, M.E.; CRISP, M. A non-organic and non-enzymatic extraction method gives higher yields of genomic DNA from whole-blood samples than do nine other methods tested. *J Biochem Biophys Methods*, v.25, n.4, p.193–205, 1992.
- LAKSHMI, R.; BASKAR, V.; RANGA, U. Extraction of Superior-Quality Plasmid DNA by a Combination of Modified Alkaline Lysis and Silica Matrix. *Anal Biochem*, v.271, p.109-112, 1999.
- LAMBRUNA, M; MATTAR, S; NAVA, S; BERMÚDEZ, S E; VENZAL, J; DOLZ, G; CASTRO, J Z. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev MVZ Córdoba*, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.
- LÉGER, E.; VOURC, G.; CHRISTINE, V.; MCCOY, K.D. Changing distributions of ticks : causes and consequences. *Exp Appl Acarol*, v.15, p.219–244, 2013.
- LEMONS, E RS; MACHADO, R D; COURA, J R; GUIMARÃES, M A A; SERRA-FREIRE, N M; AMORIM, M.; GAZETA, G S. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever:

seasonal activity of ticks collected in endemic area in São Paulo, Brazil. *Rev Soc Brasil Med Trop* v. 30, p. 181-185, 1997.

LIMA L. Aves da Mata Atlântica: riqueza, composição, endemismos e lacunas de conhecimento. *Asas da Mata Atlântica*. Marcos Pivetta. Pesquisa Fapesp, 217 Ed. 217, p. 36-41, 2014.

LIMA, H. C. (Org.). *Paisagem e flora da Reserva Biológica do Tinguá*: subsídios ao monitoramento da vegetação. Rio de Janeiro, Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2002. 45 p.

LOPES, A.J.O.; ALBERTO, J.O.; NASCIMENTO-JÚNIOR, J.R.S.; SILVA, C.G.; PRADO, A.P.; LABRUNA, M.O.B.; COSTA-JÚNIOR, L.M. Parasitism by Ixodiphagus wasps (Hymenoptera: Encyrtidae) in Rhipicephalus sanguineus and Amblyomma ticks (Acari: Ixodidae) in three regions of Brazil. *J. Econ. Entomol.* v.105, p.1979–81, 2012.

LOROSA, E.S.; ANDRADE, R.E.; VALENTE, M.V.M.; FARIA, M.S.; CRUZ JR., G.S.G. Inespecificidade parasitária em *Argas (Persicargas) miniatus* Koch, 1844 (Acari: Argasidae). *Arq Bras Med Vet Zootec.* v.59, v.6, p.1485–8, 2007.

LOURES-RIBEIRO, Alan; MANHÃES, Marco A.; DIAS, Manoel M. Sensitivity of understory bird species in two different successional stages of the lowland Atlantic Forest, Brazil. *An Acad Bras Ciênc*, v. 83, n. 3, p. 973-980, 2011.

LOURES-RIBEIRO, Alan et al. Aves de sub-bosque de uma área de Mata Atlântica de baixada do sudeste do Brasil. *Ornithologia*, v. 4, n. 2, p. 76-85, 2011.

LUTHER, D; HILTY, J; WEISS, J; CORN-WALL, C; WIPF, M; BALLARD, G. Assessing the impact of local habitat variables and landscape context on riparian birds in agricultural, urbanized, and native landscapes. *Biodiversity Conserv*, v. 17, p. 1923-1935, 2008.

LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H.; LANDULFO, G.A.; BERTO, B.P.; FERREIRA, I. Bird ticks in an area of the Cerrado of Minas Gerais State, southeast Brazil. *Exp Appl Acarol*, v.58, n.1, p.89-99, 2012.

LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H. Parasitismo por carrapatos em anuros no Brasil. *Vet. e Zootec*, v.20, p.100-111, 2013b.

LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H. *Ticks on Brazilian birds: Overview*. in *Birds: Evolution and Behavior, Breeding Strategies, Migration and Spread of Disease*. 2013a. 188p.

MAGURRAN, A. E. *Ecological diversity and its measurement*. London: Croom Helm Limited, 1988. 179 p.

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

MARQUES, S; BARROS-BATTESTI, DM; FACCINI, JLH; ONOFRIO, VC. Brazilian distribution of *Amblyomma varium* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae), a common parasite of sloths (Mammalia: Xenarthra) *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 1141–1146, 2002.

MARTINS, F. R.; SANTOS, F. A. M. Técnicas usuais de estimativa da biodiversidade. *Rev Holos*, v.1, p. 236-267, 1999.

- MARTINS, T.; ONOFRIO, C. V.; BARROS-BATTESTI, D. M. LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks Tick Borne Dis.* v. 1, n. 2, p. 75-99, 2010.
- MEDEIROS, A.P., SOUZA, A.P, DE MOURA, A.B.; LAVINA, M.S.; BELLATO, V.; SARTOR, A.A.; RICHTZENHAIN, L.J.; LABRUNA, M.B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari : Ixodidae) in the state of Santa Catarina , Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.106, p.926–30, 2011.
- MELO, A.L.T.; MARTINS, T.F.; HORTA, M.C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M.B.; AGUIAR, D.M. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp . in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* v.2, n.4, p.213-218, 2011.
- MENDONÇA, L.B.; ANJOS, L. Bird-flower interactions in Brazil: a review. *Ararajuba*, v. 11, n. 2, p. 195-205, 2003.
- MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol Rev Camb Philos Soc.* v.86, p.379-405, 2011.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, v. 16, n. 3, p. 1215, 1988.
- MIRA, A; MORAN, N A. Estimating population size and transmission bottlenecks in maternally transmitted endosymbiotic bacteria. *Microbial Ecol*, v. 44, n. 2, p.137-143, 2002.
- MODESTO, T C; PESSÔA, F S; JORDÃO-NOGUEIRA, T; ENRICI, M C; COSTA, L M; ATTIAS, N; BERGALLO, H. G. Mammals, Serra da Concórdia, state of Rio de Janeiro, Brazil. *Check list*, v.4, n. 3, p. 341-348, 2008.
- MODESTO, T C; PESSÔA, F S; ENRICI, M C; ATTIAS, N; JORDÃO-NOGUEIRA, T; COSTA, L D M; BERGALLO, H D G. Mamíferos do Parque Estadual do Desengano, Rio de Janeiro, Brasil. *Biota Neotrop*, v. 8, n. 4, p. 153-159, 2008.
- MOVILA, A.; REYE, A.L.; DUBININA, H.V.; TOLSTENKOV, O.; TODERAS, I.; HÜBSCHEN, J.M.; MULLER, C.P.; ALEKSEEV, A.; Detection of *Babesia* Sp. EU1 and Members of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Ticks Collected from Migratory Birds at Curonian Spit, North-Western Russia. *Vector-Borne Zoon Dis.* v.1, n.1, p.89-91, 2011.
- MUKHERJEE, N.; BEATI, L.; SELLERS, M.; BURTON, L.; ADAMSON, S.; ROBBINS, R.G.; MOORE,; KARIM, S. Importation of exotic ticks and tick-borne spotted fever group rickettsiae into the United States by migrating songbirds. *Ticks Tick Borne Dis* v.5, n.2, p.127–34, 2014.
- MUKHERJEE, N; BEATI, L; SELLERS, M; BURTON, L; ADAMSON, S; ROBBINS, R G; KARIM, S. Importation of exotic ticks and tick-borne spotted fever group rickettsiae into the United States by migrating songbirds. *Ticks Tick Borne Dis*, v. 5, n. 2, p.127–34, 2014.
- NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci.*, v.14, n.8, p.2857-2877, 2009.
- NAVA, S.; VELAZCO, P.M.; GUGLIELMONE, A.A. The first record of *Amblyomma longirostre* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) from Peru, with a revision of its host range. *Syst. Appl. Acarol.* v.15, p.21–30, 2010.
- NAVA, S.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; MANGOLD, A. J.; CAMARGO, L.; CASAS, G.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros guaporensis* (Acari, Ixodida: Argasidae), a

new tick species from the Guaporé River Basin in the Bolivian Amazon. *Zootaxa*, v.3666, n.4, p. 579-90, 2013.

NAVA, S.; VENZAL, J.M.; TERASSINI, F.A.; MANGOLD, A.J.; CAMARGO, L.M.A.; LABRUNA, M.B. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. *Journal of Parasitology*, v.96, p.1089–1101, 2010a.

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 Tick Borne Dis*, v. 5, n. 3, p. 252-276 2014.

NAVA, S; GUGLIELMONE, A A. A meta-analysis of host specificity in Neotropical hard ticks (Acari: Ixodidae). *Bull Entomol Soc*, v. 103, n. 2, p. 216-224, 2013.

NAVA, S; VELAZCO, P M; GUGLIELMONE, A A. First record of *Amblyomma longirostre* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) from Peru, with a review of this tick's host relationships. *Syst Appl Acarol*, v.15, p. 21-30, 2010.

NOVA IGUAÇU. Decreto Municipal Nº 6.629 de 17 de fevereiro de 2003. Define a descrição dos limites dos bairros da cidade de Nova Iguaçu.

OGDEN, N.H.; LINDSAY, L.R.; HANINCOVÁ, K.; BARKER, I.K.; BIGRAS-POULIN, M.; CHARRON, D.F.; HEAGY, A.; FRANCIS, C.M.; O'CALLAGHAN, C.J.; SCHWARTZ, I.; THOMPSON, R.A.; Role of Migratory Birds in Introduction and Range Expansion of *Ixodes scapularis* Ticks and of *Borrelia burgdorferi* and *Anaplasma phagocytophilum* in Canada. *Appl Environ Microbiol*, v.74, p.1780-1790, 2008.

OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T.; CAPEK, M.; LITERAK, I.; LABRUNA, M.B. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. v.4, p.145– 147, 2013.

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

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in an Atlantic Rain Forest region of Brazil. *J Med Entomol* v.46, p.1225–1229, 2009.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D.G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; COSTA, F.B.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of Sao Paulo, Brazil. *Parasitol* v.139, p.1283-1300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; JENKINS, C.N.; LABRUNA, M.B. Effect of Forest Fragmentation on Tick Infestations of Birds and Tick Infection Rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. *Ecohealth*. v.8, p.320–331, 2011.

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. *Parasitol. Res.* v.106, p.809–816, 2010.

OGRZEWALSKA, M; LITERAK, I; MARTINS, TF; LABRUNA, MB. Rickettsial infections in ticks from wild birds in Paraguay. *Ticks Tick Borne Dis* v. 5, n. 2, p. 83–9, 2014.

OLIVEIRA, P. A. *Ecologia de fêmeas de ouriço-preto Chaetomys subspinosus (Olfers 1818) (Rodentia: Erethizontidae) nas florestas de restinga do Parque Estadual Paulo César Vinha, Guarapará, Espírito Santo*. 2006. 87f. Dissertação (Mestrado em Zoologia de Vertebrados). Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. 2008.

OLSÉN, B.; JAENSON, T.G.; BERGSTRÖM, S. Prevalence of *Borrelia burgdorferi* sensu lato-infected ticks on migrating birds. *Appl Environ Microbiol* v.61, n.8, p.3082-7, 1995.

ONEAL, A S; ROTENBERRY, J T. Scale-dependent habitat relations of birds in riparian corridors in an urbanizing landscape. *Landscape Urban Plan*, v. 92, p. 264-275, 2009.

PACHECO, R.C.; ARZUA, M.; NIERI-BASTOS, F. A.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) collected on birds in southern Brazil. *J Med Entomol*.v.49, n.3, p.710-6, 2012.

PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; SZABÓ, M.P.; CATROXO, M.H.; BOUYER, D.H.; LABRUNA, M.B. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. *Appl Environ Microbiol*, v.77, p.5207–5211, 2011.

PARIDA SK, DASH S, PATEL S, MISHRA BK.. Adsorption of organic molecules on silica surface. *Adv. Colloid Interface Sci. Advances* , v. 121, n. 1, p. 77-110, 2006.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M.B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World : a Geographic Approach. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.26, n.4, p.657–702, 2013.

PASCOAL, J.O.; AMORIM, M.P.; MARTINS, M.M.; MELO, C.; SILVA JR., E.L.; OGRZEWALSKA, M.; LABRUNA, M.B.; SZABÓ, M.P.J. Ticks on birds in a savanna (Cerrado) reserve on the outskirts of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil *Rev Bras Parasitol Vet*, v.22, n.1, p.46-52, 2012.

PERRET, JL; GUERIN, P M; DIEHL, P A; VLIMANT, M; GERN, L. Darkness induces mobility, and saturation deficit limits questing duration, in the tick *Ixodes ricinus*. *J Exp Biol*, v. 206, p. 1809–1815, 2003.

PINHEIRO, M. C; SÁ-HUNGARO, I J; MARTINS, C D; RAIÁ, V A; FAMADAS, K M. Capacidade de sobrevivência do embrião de *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) a alterações bruscas de temperatura. *Arch Vet Sci*, v. 19, n.1, p. 17-23, 2014.

PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci*. v.1078, p.523–529, 2006.

POONIYA, S.; LALWANI, S.; RAINA, A.; MILLO, T.; DOGRA, T. D. Quality and quantity of extracted deoxyribonucleic acid (DNA) from preserved soft tissues of putrefied unidentifiable human corpse. *J Lab Physic*, v. 6, n. 1, p. 31, 2014.

PORNWIROON, W.; KEARNEY, M.T.; HUSSENER, C.; FOIL, L.D.; MACALUSO, K.R. Comparative microbiota of *Rickettsia felis*-uninfected andinfected colonized cat fleas, *Ctenocephalides felis*. *ISME JI*, v.1, n.5, p. 394-402, 2007.

PREVEDELLO, J. A; FERREIRA, P; PAPI, B S; LORETTO, D; VIEIRA, M V. Uso do espaço vertical por pequenos mamíferos no Parque Nacional Serra dos Órgãos, RJ: um estudo de 10 anos utilizando três métodos de amostragem. *Rev Espaço e Geografia*, v.11, p. 35:58, 2010.

QIAGEN - http://www.tufts.edu/~mcourt01/Documents/QIAGEN_protocol.pdf

RAMOS, R.A.N.; GALINDO, M.K.F.; SANTANA, M.A.; FAUSTINO, M.A.G.; ALVES, L.C. Parasitismo em humano por *Amblyomma sp* (Acari: Ixodidae), na Cidade de Recife, Estado de Pernambuco. *Rev Soc Bras Med.Trop*, 43, n. 5, p. 594-595, 2010.

RANDOLPH, S.E. Tick ecology: processes and patterns behind the epidemiological risk posed by ixodid ticks as vectors. *Parasitology*, v.129, n.7, p.S37–S65, 2004.

RAOULT, Didier et al. A flea-associated Rickettsia pathogenic for humans. *Emerg Infect Dis*, v. 7, n. 1, p. 73, 2001.

RASPAUD, E.; OLVERA, D.E.; LA CRUZ, M.; SIKORAV, J.L.; LIVOLANT, F. Precipitation of DNA by Polyamines: A Polyelectrolyte Behavior. *Biophysical J*. v. 74, p.381-393, 1981.

RICKLEFS, R E. A economia da natureza. Editora Guanabara Koogan 5 ed, 501 p.

RIVAS, C.J.G.; CASTILLO, G.N.; ACOSTA, J.C.; VENZAL, J.M.; GUGLIELMONE, A.A. Primer reporte de parasitismo de una garrapata blanda del género *Ornithodoros* (Ixodida: Argasidae) sobre *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) en el departamento de Valle Fértil, San Juan, Argentina. *Cuad Herpetol.*, v.26, p.95-97, 2012.

ROCHA, C F D; BERGALLO, H G; POMBAL Jr, J P; GEISE, L; VAN SLUYS, M O; FERNANDES, R; CARAMASCHI, U Fauna de anfíbios, répteis e mamíferos do Estado do Rio de Janeiro, sudeste do Brasil. *Publicações Avulsas do Museu Nacional*, v. 104, p. 3-23, 2004.

RODRIGUES, P J; NASCIMENTO, M T. Fragmentação florestal: breves considerações teóricas sobre efeitos de borda. *Rodriguésia*, v. 57, p. 63-74, 2006.

RODRÍGUEZ, I; FRAGA, J; NODA, A A; MAYET, M; DUARTE, Y; ECHEVARRIA, E; FERNÁNDEZ, C. An Alternative and Rapid Method for the Extraction of Nucleic Acids from Ixodid Ticks by Potassium Acetate Procedure. *Braz Arch Biol Techn*, v. 57, n. 4, p. 542-547, 2014.

ROUX, V., RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int J Syst Evol Microbiol* v. 50, n. 4, p.1449-1455, 2000.

SAMBROOK, J., RUSSEL. D. W. *Molecular cloning: a Laboratory manual*, 3. ed., Cold Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York : CSHL, 2001.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Ed.. Cold Spring Harbor Laboratory Press, v. 1, 1989.

SAMISH, M.; ALEKSEEV, E. Arthropods as predators of ticks (Ixodoidea). *J Med Entomol*, v.38, n.1, p.1–11, 2001.

SAMISH, M.H.; GINSBERG, A.I.; GLAZER. Biological control of ticks. *Parasitol* v.129, p.389-403, 2004.

- SANCHES, G.S.; MARTINS, T.F.; LOPES, I.T.; COSTA, L.F.S.; NUNES, P.H.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; LABRUNA, M.B. Ticks infesting birds in Atlantic Forest fragments in Rio Claro, State of Sao Paulo, Brazil. *Rev. Bras Parasitol Vet*, v.22, n.1, p.6-12, 2013.
- SÁNDOR, A.D.; MĂRCUȚAN, D.I.; D'AMICO, G.; GHERMAN, C.M.; DUMITRACHE, M.O.; MIHALCA, A.D. Do the Ticks of Birds at an Important Migratory Hotspot Reflect the Seasonal Dynamics of *Ixodes ricinus* at the Migration Initiation Site? A Case Study in the Danube Delta. *PLoS ONE* v.9, n.2, p.e89378, 2014.
- SANGIONI, L A; HORTA, M C; VIANNA, M C; GENNARI, S M; SOARES, R M; GALVÃO, M A; LABRUNA, M B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis* v. 11, n. 2, p. 265–70, 2005.
- SANGIONI, L.A., HORTA, M.C.; VIANNA, M.C.B.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.; GALVÃO, M.A.M.; SCHUMAKER, T.T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M.B.. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis.*, v.11, n.2, p.265–70, 2005.
- SANTOS-SILVA, M. M.; SOUSA, R.; SANTOS, A. S.; MELO, P.; ENCARNAÇÃO, V.; BACELLAR, F. Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. *Exp App Acarol*, v.39, p.331–338, 2006.
- SARAIVA, D.G.; NIERI-BASTOS, F.A.; HORTA, M.C.; SOARES, H.S.; NICOLA, P.A.; PEREIRA, L.C.M.; LABRUNA, M.B.. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, northeastern Brazil: isolation, transovarial transmission, and transstadial perpetuation. *Vector Borne Zoonotic Dis.* v.13, 2013.
- SARAIVA, G; FOURNIER, G F; MARTINS, T F; LEAL, K P; VIEIRA, F N; CÂMARA, E M; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. *Exp Appl Acarol*, v. 58, n. 2, p. 159-166, 2012.
- SCHLOSS, Patrick D.; HANDELSMAN, Jo. Status of the microbial census. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, v. 68, n. 4, p. 686-691, 2004.
- SERMWITTAYAWONG, D., JAKKAWANPITAK, C., WAJI, N., & HUTADILOK-TOWATANA, N. Economical method for midiprep plasmid DNA purification using diatomaceous earth. *Scienceasia*, v. 39, n. 6, p. 631-635, 2013.
- SERRA-FREIRE, N.M. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Pará , Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v.19, p.141–147, 2010.
- SICK, H. *Ornitologia Brasileira*. Editora Nova Fronteira. 1997. 504p.
- SIGRIST, T. *Guia de Campo Aves do Brasil Oriental*. Editora Avisbrasilis. 2007. 448p.
- SILVA, N.; EREMEEVA, M.E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G.S.; PADDOCK, C.D.; RAMOS, E.A.; FAVACHO, A.R.; REIS, M.G.; DASCH, G.A.; DE LEMOS, E.R.; AI, K. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v.17, p.275–278, 2011.
- SILVEIRA, I., PACHECO, R.C.; SZABÓ, M.P.J.; RAMOS, H.G.C.; LABRUNA, M.B. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* v.13, p.1111–1113, 2007.
- SILVEIRA, J.A.G.; OLIVEIRA, P.A.; CURI, N.H.A.; BARATA, R.S.L.; CHIARELLO, A.G.; RIBEIRO, M.F.B. Occurrence of *Amblyomma longirostre* (Koch, 1844) in *Chaetomys*

subspinosus (Olfers, 1818) from Atlantic Forest. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.60, p.772-774, 2008.

SOARES, J.F.; SOARES, C.D.M.; GALLIO, M.; SILVA, A.S.; MOREIRA, J.P.; BARROS-BATTESTI D.M.; MONTEIRO, S.G. Occurrence of *Amblyomma longirostre* in *Ramphastos dicolorus* in Southern Brazil. *Ciênc Rural*, v.39, n.3, p.930-932, 2009.

SOCOLOVSCHI, C., BITAM, I., RAOULT, D., & PAROLA, P. Transmission of *Rickettsia conorii conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*. *Clin Microbiol Infect*. v.15, n. s2, p. 319-321, 2009.

SOCOLOVSCHI, C.S.; EDIANNIKOV, O.M; AOULT D.R.; AROLA, P.P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and Ixodid ticks. *Vet Res.*, v. 40, n.2, p.34, 2009.

SONENSHINE, D.E. *Biology of Ticks*.1993. New York: Oxford University, v. 2, 465p.

SPOLIDORIO, M. G.; ANDREOLI, G. S.; MARTINS, T. F.; BRANDÃO, P. E.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in ticks collected from road-killed wild animals in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Med Entomol*, v. 49, n.6, p. 1510-1514, 2012.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.; MANTOVANI, E.; BRANDAO, P.; RICHTZENHAIN, L.; YOSHINARI, N. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v.16, p.521–523, 2010.

STORNI, A.; ALVES, M. A. S.; VALIM, M. P. Ácaros de penas e carrapatos (Acari) associados a *Turdus albicollis* Viellot (Aves, Muscicapidae) em uma área de Mata Atlântica da Ilha Grande, Rio de Janeiro, Brasil. *Rev Bras Zool*, v. 22, n. 2, p. 419-423, 2005.

STOTHARD, D.R.; CLARK, J.B.; FUERST, P.A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. *Int J Syst Bacteriol*. v.44, p.798–804, 1994.

STOTHARD, D.R.; FUERST, P.A. Evolutionary analysis of the spotted fever and typhus group of *Rickettsia* using 16S rRNA gene sequences. *Syst Appl Microbiol*. v.18, p.52–61, 1995.

SWEET, D.; LORENTE, M.; VALENZUELA, A.; LORENTE, J.A.; ALVAREZ, J.C. Increasing DNA extraction yield from saliva stains with modified Chelex method. *Forensic Sci Int*, v.83, p.167-177, 1996.

SZABÓ M.P.J; LABRUNA M.B; VOGLIOTTI A; DUARTE J.M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) on small red brocket deer (*Mazama bororo* Duarte) along deer trails in the Atlantic rain forest of Southeastern Brazil. *Syst Appl Acarol*, v. 11, n. 1, p. 41-45, 2006.

SZABÓ, M P J; NIERI-BASTOS, F A; SPOLIDORIO, M G; MARTINS, T F; BARBIERI, A M; LABRUNA, M B. 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. *Parasitol*, v. 140, p. 719–728, 2013.

SZABÓ, M P J; NIERI-BASTOS, F A; SPOLIDORIO, M G; MARTINS, T F; BARBIERI, A M; LABRUNA, M B. 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. *Parasitol*, v. 140, p. 719–728, 2013.

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.3, n.27, p.1–9, 2013.

- TABATABAEI, M.; ZAKARIA, M. R.; RAHIM, R. A.; ABDULLAH, N.; WRIGHT, A. D. G.; SHIRAI, Y.; HASSAN, M. A. Comparative study of methods for extraction and purification of environmental DNA from high-strength wastewater sludge. *Afr J Biotechnol* v. 9, n. 31, p. 4926-4937, 2013.
- TOLESANO-PASCOLI, G. V.; TORGA, K.; MARCAL, J. O.; FRANCHIN, A. G.; OGRZEWALSKA, M.; GERARDI, M.; OLEGÁRIO, M. M. M.; LABRUNA, M. B.; SZABO, M. P. J. Ticks on birds in a forest fragment of Cerrado, Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet*, v.19, n.4, p.244-248, 2010.
- TOLESANO-PASCOLI, G.; GARCIA, F. I.; GOMES, C. R. G.; DINIZ, K. C., ONOFRIO, V. C.; VENZAL, J. M.; SZABÓ, M. P. J. Ticks (Acari: Ixodidae) on swifts (Apodiformes: Apodidae) in Minas Gerais, southeastern Brazil. *Exp App Acarol*, p. 1-5, 2014.
- TORGA, K; TOLESANO-PASCOLI, G; VASQUEZ, J B; SILVA JÚNIOR, E L D; LABRUNA, M B; MARTINS, T F; SZABÓ, M P J. Ticks on birds from Cerrado Forest patches along the Uberabinha river in the Triângulo Mineiro region of Minas Gerais, Brazil. *Ciênc Rural*, v. 43, n. 10, p. 1852-1857, 2013.
- TORTOLI E. Impact of Genotypic Studies on Mycobacterial Taxonomy: the New Mycobacteria of the 1990s. *Clin Microbiol Rev* v. 16, n. 2, p.319-354, 2003.
- VARELA, A.A.S.; MOORE, V.A.; LITTLE, S.E. Disease Agents in *Amblyomma americanum* from Northeastern Georgia Disease Agents in *Amblyomma americanum* from Northeastern Georgia. *J Med Entomol*, v.41, n.4, p.753-9, 2004.
- VASCONCELOS, M F; PACHECO, J F; PARRINI, R. Levantamento e conservação da avifauna na zona urbana de Marabá, Pará, Brasil. *Cotinga*, n. 28, p. 45-52, 2007.
- VEJARANO, M.P; MATRONE, M; KEID, L B; ROCHA, V C M; IKUTA, C Y; RODRIGUEZ, C A R; SALGADO, V R; FERREIRA, F; DIAS, R A; TELLES E O; FERREIRA NETO, J S.. Evaluation of Four DNA Extraction Protocols for Brucella abortus Detection by PCR in Tissues from Experimentally Infected Cows with the 2308 Strain. *Vector Borne Zoonotic Dis*, v. 13, n. 4, p. 237-242, 2013.
- VENZAL, J M; NAVA, S; TERASSINI, F A; OGRZEWALSKA, M; CAMARGO, L M A; LABRUNA, M. *Ornithodoros peropteryx* (Acari: Argasidae) in Bolivia: an argasid tick with a single nymphal stage. *Exp Appl Acarol*, v. 61, n. 2, p. 231-241, 2013.
- VENZAL, J. M.; FÉLIX, M. L.; OLMOS, A.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. A collection of ticks (Ixodidae) from wild birds in Uruguay. *Experimental & applied acarology*, v.36, n.4, p. 325-331, 2005.
- VENZAL, J. M.; NAVA, S.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; CASÁS, G.; GUGLIELMONE, A. A. *Ornithodoros quilinensis* sp. nov.(Acari, Argasidae), a new tick species from the Chacoan region in Argentina. *Acta Parasitologica* v. 57, n. 3, p. 329-336, 2012.
- VENZAL, J.M.; NAVA, S.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MANGOLD, A.J.; MUÑOZ-LEAL, S.; LADO, P; GUGLIELMONE, A.A. A new species of *Ornithodoros* (Acari: Argasidae), parasite of *Microlophus spp.* (Reptilia: Tropiduridae) from northern Chile. *Ticks Tick Borne Dis*, v.4, n.1-2, p.128-132, 2013.
- VENZAL, J.M.; ONÓFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M. *Família Argasidae: características gerais, comentários e chaves para gêneros e espécies*. In

- Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006 p. 13-27.
- VIAL, L. Biological and Ecological Characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite*, v.16, p. 191-202, 2009.
- VINCZE, T., POSFAI, J., ROBERTS, R. J. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acid Res.* v. 31, p. 3688-91, 2003.
- WALSH, D.J.; COREY, A.C.; COTTON, R.W.; FORMAN, L.; HERRIN, G.L. JR.; WORD, C.; GARNE, D.D. Isolation of Deoxyribonucleic Acid (DNA) from Saliva and Forensic Science Samples Containing Saliva. *J Forens Sci* v.37, p.387-395, 1992.
- WANG, Yong; QIAN, Pei-Yuan. Conservative fragments in bacterial 16S rRNA genes and primer design for 16S ribosomal DNA amplicons in metagenomic studies. *PLoS one*, v. 4, n. 10, p. e7401, 2009.
- WILLIS, E O; ONIKI, Y. Aves seguidoras de correições de formigas nas Américas e África. *Acolh Alfabetiz País LÍng Portug*, v. 2, n. 4, p. 301-320, 2008.
- WILLIS, E. O. The composition of avian communities in remanescent woodlots in Southern Brazil. *Pap. Avulsos Zool.* v. 33, p.1-25, 1979.
- WILLIS, E. O. Three *Dendrocincla* woodcreepers (Aves, Dendrocolaptidae) as army ant followers. *Ciênc Cult*, v. 35, p. 201-204, 1983.
- WOESE, R., C. R. GUTELL, R. GUPTA, H. NOLLER. Detailed analysis of the higher-order structure of 16s- like ribosomal ribonucleic acid. *Microbiol. Rev.* v.46, p. 621-669, 1983.
- YANG DY, ENG, B, WAYE JS, DUDAR JC, SAUNDERS SR . Technical Note: Improved DNA Extraction from Ancient Bones Using Silica-Based Spin Columns. *Am J Phys Anthropol*, v.105, p.539-543, 1998.
- ZAHNER, V., LUCAROTTI, C. J., MCINTOSH, D. Application of 16S rDNA-DGGE and plate culture to characterization of bacterial communities associated with the sawfly, *Acantholyda erythrocephala* (Hymenoptera, Pamphiliidae). *Curr Microbiol* v.57, n.6, p.564-9, 2008.
- ZAR, J. H. *Biostatistical analysis*. 4^a ed. Upper Saddle River, New Jersey: Prentice – Hall, 1999. 912 p.
- ZIMBRES, B; FURTADO, M M; JÁCOMO, A T; SILVEIRA, L; SOLLMANN, R; TÔRRES, N M; MARINHO-FILHO, J. The impact of habitat fragmentation on the ecology of xenarthrans (Mammalia) in the Brazilian Cerrado. *Landscape Ecol*, v. 28, n. 2, p. 259-269, 2013.



ANEXO I Autorização para atividades científicas – SISBIO

Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27967-2	Data da Emissão: 21/11/2011 10:57
Dados do titular	
Nome: Ísis Daniele Alves Costa Santolin	CPF: 109.879.347-16
Título do Projeto: ESTUDO ECOLÓGICO DE CARRAPATOS EM ÁREA DE REGENERAÇÃO DE FLORESTA OMBRÓFILA Densa NO ENTORNO DA RESERVA BIOLÓGICA DO TINGUÁ RIO DE JANEIRO, BRASIL. SEU PAPEL COMO BIOINDICADORES E/OU AGENTES DE RISCO PARA SAUDE SILVESTRE E COLETIVA	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Capturas de campo	04/2011	04/2015
De acordo com o art. 33 da IN 154/2009, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.			

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NAO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA n° 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio n° 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio e o material biológico coletado apreendido nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	1- Só será permitida a entrada do titular da pesquisa e sua equipe na Rebio do Tinguá, mediante a apresentação da Autorização de pesquisa em mãos. 2- O titular da pesquisa deverá encaminhar a Rebio do Tinguá, relatórios e outros referente a pesquisa, atendendo IN 154/2007/ICMBIO, para fins de consulta. (Estrada do Comércio, 3400, Tinguá, Nova Iguaçu-RJ., Cep:26063-630)
---	--

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Bruna Barboza Bezerra	Estagiária	360.534.358-99	459600498 ssp-SP	Brasileira
2	Ramiro Dário Melinski	Estagiário	325.121.508-60	338732020 SSP-SP	Brasileira
3	Elizabeth Captivo Lourenço	Trabalho de Campo	102.220.997-39	200245157 DETRAN-RJ	Brasileira
4	PEDRO ERNESTO CORREIA VENTURA	Coorientador	543.121.597-34	2544490 IFF-RJ	Brasileira
5	Priscilla Maria Peixoto Patricio	Estagiária	131.244.287-57	111659215 Detran-RJ	Brasileira

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13981461



Página 1/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27967-2	Data da Emissão: 21/11/2011 10:57
------------------------	--

Dados do titular

Nome: Ísis Daniele Alves Costa Santolin	CPF: 109.879.347-16
Título do Projeto: ESTUDO ECOLÓGICO DE CARRAPATOS EM ÁREA DE REGENERAÇÃO DE FLORESTA OMBRÓFILA Densa NO ENTORNO DA RESERVA BIOLÓGICA DO TINGUÁ RIO DE JANEIRO, BRASIL. SEU PAPEL COMO BIOINDICADORES E/OU AGENTES DE RISCO PARA SAUDE SILVESTRE E COLETIVA	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

6	Camilla Mathias Luiz Reis	Estagiária	116.475.047-08	689105-5 MMA-RJ	Brasileira
7	Kátia Maria Famadas	Orientação	632.286.537-49	311298 MAer-RJ	Brasileira
8	Hermes Ribeiro Luz	Trabalho de campo	088.990.417-09	1714411 SSP-ES	Brasileira
9	ILDEMAR FERREIRA	Coorientador	361.618.027-91	2624250 IFP-RJ	Brasileira
10	Gabriel Alves Landulfo	Trabalho de Campo	365.848.708-98	428154396 SSPP-SP	Brasileira
11	Michele da Costa Pinheiro	Trabalho de Campo	087.671.547-19	121114219 DIC-RJ	Brasileira
12	Luiz Antonio Costa Gomes	Estagiário	116.412.177-40	21.726.327-6 DETRAN-RJ	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	NOVA IGUACU	RJ	RESERVA BIOLÓGICA DO TINGUÁ	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Galliformes, Charadriiformes, Trogoniformes, Caprimulgiformes, Strigiformes, Passeriformes, Cuculiformes, Psittaciformes, Tinamiformes, Apodiformes, Piciformes, Columbiformes, Trochiliformes

Material e métodos

1	Amostras biológicas (Aves)	Ectoparasita, Sangue, Fezes, Penas
2	Método de captura/coleta (Aves)	Rede de neblina

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	Identificação de espécies

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13981461



Página 2/3



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 27967-2	Data da Emissão: 21/11/2011 10:57
Dados do titular	
Nome: Ísis Daniele Alves Costa Santolin	CPF: 109.879.347-16
Título do Projeto: ESTUDO ECOLÓGICO DE CARRAPATOS EM ÁREA DE REGENERAÇÃO DE FLORESTA OMBRÓFILA Densa NO ENTORNO DA RESERVA BIOLÓGICA DO TINGUÁ RIO DE JANEIRO, BRASIL. SEU PAPEL COMO BIOINDICADORES E/OU AGENTES DE RISCO PARA SAUDE SILVESTRE E COLETIVA	
Nome da Instituição : UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO	CNPJ: 29.427.465/0001-05

Registro de coleta imprevista de material biológico

De acordo com a Instrução Normativa nº154/2007, a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta coleta imprevista ser comunicada por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica e, depositado, preferencialmente, em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Táxon*	Qtde.	Tipo de amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico possível.

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 13981461



Página 3/3

ANEXO II

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

DETECTION AND IDENTIFICATION OF *Rickettsia* AGENTS IN TICKS COLLECTED FROM WILD BIRDS IN BRAZIL BY POLYMERASE CHAIN REACTION-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (PCR-RFLP) ANALYSIS*

Ísis Daniele Alves Costa Santolin¹⁺, Kátia Maria Famadas² and Douglas McIntosh³

ABSTRACT. Santolin I.D.A.C., Famadas K.M. & McIntosh D. **Detection and identification of *Rickettsia* agents in ticks collected from wild birds in Brazil by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis.** [Detecção e identificação de *Rickettsia* em carrapatos coletados de aves silvestres no Brasil pela PCR-RFLP.] *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(Supl.2):68-73, 2013. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Instituto de Veterinária, Anexo 1, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, *Campus* Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: isis@santolin.com.br

The detection and identification of *Rickettsia* bacteria in tick populations have become easier and more precise during the last 25 years as result of the developmental of robust molecular biology based methods. Currently, seven species of *Rickettsia* have been described in Brazilian ticks, using PCR for detection and amplicon sequencing for identification. *In silico* analysis of sequences encoding the *gltA*, *htrA* and *ompB* genes of those species was performed and revealed the basis for a novel PCR-RFLP method that allows their differential identification. The method was evaluated using larvae and nymphs of *Amblyomma longirostre*, *A. ovale* and *A. varum* collected from birds in the Tinguá Biological Reserve, in Rio de Janeiro State. The species "*Candidatus Rickettsia amblyommii*" was identified in 100% of the *A. longirostre* examined, while the other two tick species were PCR negative. The basic method employs the restriction endonucleases *MspI* and *RsaI* and can be performed in the course of a single working day. It offers a convenient and cost effective means to perform large scale analysis of tick populations, and should be of benefit to researchers who lack the financial or technical resources necessary for sequence based identification.

KEY WORDS. *Rickettsia*, detection, PCR, ticks.

RESUMO. Rickettsioses transmitidas por carrapatos são doenças zoonóticas graves e potencialmente ameaçadoras à vida. A detecção e identificação de bactérias do gênero *Rickettsia* em populações de carrapatos tornaram-se mais fáceis e precisas nos últimos 25 anos, devido ao desenvolvimento de métodos baseados em biologia molecular. Atualmente, sete espécies de *Rickettsia* foram descritas

nos carrapatos brasileiros, utilizando PCR para a detecção e sequenciamento de "amplicons" para a identificação. A análise *in silico* de sequências que codificam os genes *gltA*, *htrA* e *ompB* dessas espécies foi realizada e revelou ser a base para um novo método de PCR-RFLP, que permite a identificação diferencial das sete espécies brasileiras. O método foi avaliado utilizando larvas e ninfas de

*Recebido em 16 de outubro de 2013.

Aceito para publicação em 14 de novembro de 2013.

¹ Bióloga, *MSc.* Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Instituto de Veterinária (IV), Anexo 1, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), *Campus* Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. ⁺Author for correspondence, E-mail: isis@santolin.com.br

² Zootecnista *PhD*, Departamento de Parasitologia Animal (DPA), IV, Anexo 1, UFRRJ, *Campus* Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: kfamadas@ufrj.br

³ Microbiologista, *PhD*, DPA, IV, Anexo 1, UFRRJ. *Campus* Seropédica, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: pus972@yahoo.co.uk

Amblyomma longirostre, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma varium* coletadas em aves na Reserva Biológica do Tinguá, no estado do Rio de Janeiro. A espécie “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” foi identificada em 100% dos *A. longirostre* examinados, enquanto que as outras duas espécies de carrapatos foram PCR negativos. O método básico emprega as endonucleases de restrição *MspI* e *RsaI* e pode ser realizada no decurso de um único dia de trabalho. Dispõe de um conveniente e rentável meio para executar a análise em grande escala de populações de carrapatos, e deve ser um benefício para os pesquisadores que não dispõem de recursos financeiros ou técnicos necessários para a identificação baseado no sequenciamento.

PALAVRAS-CHAVE. *Rickettsia*, detecção, PCR, carrapatos.

INTRODUCTION

Tick-borne rickettsioses are zoonotic infections, with a global distribution, caused by intracellular bacteria belonging to the spotted fever group (SFG) of the genus *Rickettsia* (Parola et al. 2013). However, due to shared symptoms with other bacterial and viral infections, it is thought that many human rickettsial infections are misdiagnosed (Abdad et al. 2011). Rickettsial infections of ticks can be determined by immunological, cell culture or molecular biology based methods including PCR, PCR-RFLP, isothermal amplification techniques and increasingly by nucleotide sequencing (Parola et al. 2013). It is of interest to note, that prior to 2004 the only tick-associated *rickettsia* species documented in Brazil was *R. rickettsii*, the etiological agent of Brazilian spotted fever (BSF). However, during the last decade an additional 6 species (“*Candidatus Rickettsia amblyommii*”, *R. bellii*, *R. monteiroi*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* and *Rickettsia* sp. Pampulha strain), have been detected in a variety of tick species, parasitizing a range of hosts including wild animals and birds (Labruna et al. 2011, Parola et al. 2013). In this context, the species “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” has emerged as the *Rickettsia* most frequently isolated from bird ticks in Brazil and has been identified in *Amblyomma cajennense*, *A. coelebs*, *A. geayi*, *A. auricularium* and *Amblyomma longirostre* (Ogrzewalska 2010, Labruna et al. 2004a, Labruna et al. 2011, Parola et al. 2013, Saraiva et al. 2013). The only other species of SFG *Rickettsia* detected in bird ticks in Brazil to date has been *R. parkeri* (Ogrzewalska et al. 2011a, Ogrzewalska et al. 2013, Pacheco et al. 2012).

The pathogenic potential for humans of the more recently isolated species is unclear. Yet, it is pertinent to note that data from serological surveillance of dogs in the Patanal region of Brazil, provided evidence for infection by *R. amblyommii* most likely via the tick *A. cajennense* (Melo et al. 2011). Moreover, a subsequent study of birds and other wild animals in the Atlantic Forest in São Paulo state, Brazil (Ogrzewalska et al. 2012), also recorded high levels of sero-conversion for *R. amblyommii* in small mammals and detected *R. amblyommii* by PCR in 41.7% of the *A. longirostre* ticks collected from birds, demonstrating that this *Rickettsia* spp. is widely distributed and is circulating within wild and domestic animal populations in Brazil.

Significant advances in our understanding of the biology, ecology and epidemiology of tick-borne rickettsioses in Brazil have been made in the last decade (Parola et al. 2013). Nevertheless, continued progress in this field will depend upon the performance of large scale surveys of tick populations using molecular detection and identification methods. The costs and high level of technical ability required to competently undertake sequencing based analysis, serve to make the use of this approach impractical for many laboratories. In an attempt to address this constraint, the current study employed bioinformatical methods to develop a robust and cost effective molecular detection protocol, based on polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis, which can be used as an alternative to sequencing. In addition, we report the application of this method to the detection and identification of *Rickettsia* in *A. longirostre* ticks collected from birds in the State of Rio de Janeiro, Brazil.

MATERIALS AND METHODS

DNA derived from cell cultures or tick extracts previously determined by PCR and sequence analysis to be positive for “*Candidatus Rickettsia amblyommii* (strain ARANHA), *R. bellii*, *R. felis* or *R. parkeri* (strain NOD), were used as positive controls for all PCR and restriction digests. Amplification of a 401 base pairs (bp), fragment of the citrate synthase gene *gltA*, which is conserved in all *Rickettsia* species reported to date in Brazil, was performed using the primers (forward) CS-78 and (reverse) CS-323 (Labruna et al. 2004b). The primers 17KDF (5’GGAACCAGGCGGTATGAATAA3’) and 17KDR (5’ACTTGCCATAGTCCGTC

AGG 3’), were employed to amplify a 407 bp fragment of the genus specific gene *htrA* and the primers 120-M59f and 120-807, were used to amplify an 856-bp fragment of the rickettsial 135-kDa outer membrane protein gene (*ompB*)

(Roux and Raoult, 2000). The PCR mixtures (25 µL) contained 2.5µL of Platinum Taq DNA polymerase buffer (Life Technologies, Brasil), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs, 20 pmoles of each primer, 1 unit of Platinum Taq DNA polymerase and 2 µL of DNA template. Samples were initially heated to 95°C for 5 min to denature the template and activate the polymerase, followed by 40 repeated cycles of denaturation at 95°C for 20 seconds, annealing at 52°C for 20 seconds, and extension at 72°C for 30 seconds (*gltA* and *htrA*) or for 40 seconds (*ompB*), followed by a final extension at 72°C for five minutes. PCR products were analyzed by gel electrophoresis (1.5 % agarose), with confirmation of amplicon sizes achieved via comparison to a DNA molecular weight marker (GeneRuler 100 bp DNA Ladder, product # SM024, Thermo Scientific).

Restriction digestion of amplicons employed three restriction endonucleases; *Hind*III, *Msp*I and *Rsa*I (New England Biolabs), selected based upon the *in silico* digestion analysis reported below. Digestion mixtures contained approximately 700 ng of amplicon (calculated spectrophotometrically using a NanoDrop apparatus), 1.2 µL of the appropriate reaction buffer, 5 units of restriction endonuclease and molecular biology grade water to a final volume of 12 µL. Incubation was at 37°C for 3 h, followed by electrophoresis in agarose gels (2.0%) at a constant voltage of 5V/cm for 90 min. Gels were stained with ethidium bromide, observed and digitally photographed under ultra-violet illumination in a Gel Doc XR photo-documenter (Bio-Rad). Banding patterns were compared between samples and via comparison to a DNA molecular weight marker (GeneRuler 50 bp DNA Ladder, product # SM0371 Thermo Scientific). The resulting images were analyzed using Quantity-One software (Bio-Rad), to accurately establish the size of individual restriction fragments.

Sequence alignment and *in silico* restriction analysis was performed using the following nucleotide sequences, corresponding to the complete or partial coding regions of the rickettsial genes *gltA*- (GenBank accession numbers; JX867425, JN37840, CP003334 (*R. amblyommii*), CP000087, CP000849, JQ906786, DQ865204, DQ517288 (*R. bellii*), CP000053, JQ674484, JN315968 (*R. felis*), CP003319, KF826286, CP000683 (*R. massaliae*), FJ269035 (*R. monteiroi*), CP003341, EF102236, JN126320, JQ906783, EU567177 (*R. parkeri*), CP003342, DQ865206, U11020, U59721 (*R. rhipicephali*), CP003311, CP003306, CP003305, CP000848 (*R. rickettsii*), JN190455 (Pampunha strain); *htrA*- (GenBank accession numbers; U11013, AY375162, CP003334, AY360215, EU274655 (*R. amblyommii*), CP000087, CP000849, AF445380, DQ865205, AY362702 (*R. bellii*), CP000053, AF195118, GU447234, KF241854, AB114813, DQ102709 (*R. felis*), CP003319, CP000683, (*R. massaliae*), CP003341, U17008, EU567178 (*R. parkeri*), CP003342, DQ865207 (*R. rhipicephali*), CP003311, CP003306, CP003305, CP000848 (*R. rickettsii*), JN190456 (Pampunha strain); or *ompB*- (GenBank accession numbers; CP003334, AY360214, EU826515, AY375164, EU544299, EU728827, EU274657 (*R. amblyommii*), AF182279, CP000053, GQ385243, KF056801 (*R. felis*), CP003319, AF123714, CP000683 (*R. massaliae*), JQ906785, GQ855236, EU567179, CP003341, EF102239 (*R. parkeri*), CP003342, AF123714, AF123719 (*R. rhipicephali*), CP003311, CP003306, CP003305, CP000848 (*R. Rickettsii*). All sequences were downloaded in FASTA format and aligned

with the appropriate PCR primers employing the program Sequencher® (Version 5.1; Genecodes Corporation). *In silico* restriction digestion of the resulting virtual amplicons, was performed using the program NEBcutter V2.0 developed by Vincze et al. (2003) and available on-line at www.tools.neb.com/NEBcutter2/.

Birds were collected between May 2011 to April 2012 in the Tinguá Biological Reserve at Municipality of Nova Iguaçu in the State of Rio de Janeiro, Brazil (22° 28'-22° 39'S and 43° 13'-43° 34'W). All collections were made with the authorization of IBAMA (process # 27967-2). The identification and classification of the captured bird specimens were performed according to the guidelines of the Brazilian Ornithological Records Committee (2011). Ticks were removed with forceps and placed in individual 1.5 mL screw capped micro-centrifuge tubes containing 500 µl of RNALater® (Ambion). Upon arrival in the laboratory ticks were identified morphologically to the genus level following Barros-Battesti et al. (2006), whereas *Amblyomma* nymphs were identified based on the study of Martins et al. (2010). Following identification, the ticks were stored frozen (-20°C) in RNALater® until processed for DNA extraction. Representative samples of ticks collected in this study were deposited in the Acarology Collection of the Instituto Butantan (IBSP), São Paulo, Brazil - curator Dr. DM Barros-Battesti (records: 10,940, 10,941, 10,942). Molecular identification at the species level was performed by PCR amplification and sequencing of a 460bp fragment of the mitochondrial sequence encoding 16S rRNA, using the methods reported by Mangold et al. 1998).

DNA was extracted from ticks as follows; individual ticks were washed twice with 1mL of ice cold phosphate buffered saline (PBS; pH 7.2) to remove excess RNALater® then re-suspended in 250 µl of PBS in a screw capped 1.5mL micro-centrifuge tube containing @ 50 mg of acid-washed, 425-600 microns, glass beads (Sigma-Aldrich; product # G8772). The tubes were placed on a mini-beadbeater-16 apparatus (Biospec; Bartlesville, USA), and the ticks were disrupted by a single cycle of agitation (60 seconds). Cell lysis was completed by the addition of 250 µl of cell disruption solution (20mM Tris-HCl, 20mM EDTA, 400mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulphate, 10mM CaCl₂) and 20 µl of proteinase K (20µg mL⁻¹; Sigma-Aldrich). Lysates were incubated for 3 hr at 56°C and DNA was extracted by single rounds of phenol and phenol chloroform treatment, followed by precipitation with an equal volume of isopropanol for 30 minutes at room temperature. Precipitated (16,000 X g) DNA pellets were desalted twice with 70% ethanol and re-suspended overnight at 4°C in 50 µl of Buffer AE = 10 mM Tris-HCl, 0.5 mM EDTA (pH 9.0), with subsequent storage at minus -20°C. The resulting DNAs were subjected to PCR-RFLP analysis as described above.

RESULTS AND DISCUSSION

Despite the significant progress of recent years, there are still numerous gaps in our understanding of the biology of tick-borne *Rickettsia* in Brazil (Szabó et al. 2013). In order to fill those gaps, there is a pressing need to perform extensive surveillance of Brazilian tick populations for the presence of *Ri-*

ckettsia agents (Ogrzewalska et al. 2012, Parola et al. 2013). On the one hand this could be simply and readily achieved, at least in terms of total detection rates, via PCR based screening with genus specific primers as employed in the current study. On the other hand, accurate identification at the species or sub-species levels (as required for detailed epidemiological investigations, identification of outbreak strains, or phylogenetic studies), requires post amplification analysis in the form of sequencing of PCR products (Parola et al. 2013). Unfortunately, in spite of continual reductions in the cost of sequencing methodologies, the routine application of sequencing as a technique for bacterial identification is still not financially viable or practical for many laboratories, owing to the technical intricacies and training required to perform proficient analysis of large quantities of sequencing data. In light of those restraints, the application of alternative and less expensive methods for analysis of PCR products should be advocated as a means of performing preliminary molecular analysis of isolates and in order to select representative groups of tick derived amplicons for sequencing. One such alternative method is PCR-RFLP, which relies upon restriction endonuclease based digestion of PCR amplicons to generate a series of differently sized fragments, which occur as a result of mutations in restriction site sequences, the acquisition or deletion of recognition sites, or insertions and deletions in the sequences between recognition sites (Rameshkumar et al. 2012). The digested DNA is separated electrophoretically in gels (agarose or polyacrylamide) and the image of the gel is recorded digitally for posterior analysis of banding patterns. (Rameshkumar et al. 2012). A number of PCR-RFLP protocols have been reported

for different *Rickettsia* species (Gage et al. 1994, Matsumoto & Inokuma, 2009, Peniche-Lara et al. 2013), but none of those protocols would permit the differential identification of the seven species of *rickettsia* recorded to date in Brazil.

Based on the *in silico* restriction digests performed in the current study, using virtual amplicons generated from GenBank derived sequences, we identified the enzymes *MspI* and *RsaI* as being capable of providing differential identification of the 7 species of *Rickettsia* reported from Brazilian ticks, as well as *R. massiliae*, which has been reported in ticks from Argentina (Parola et al. 2013) and *R. felis*. The species *R. felis* is generally considered to be carried by fleas, but a number of alternative arthropod vectors for this bacterium, including ticks, have recently been reported in a variety of geographical locations (Abdad et al. 2011). As such, we considered it both prudent and justified to include this species in our analysis.

As shown in Table 1, the majority of the *Rickettsia* species could be easily differentiated based upon comparison of the banding patterns generated by *MspI* and *RsaI* digestion of the *ompB* amplicon. However, sequences corresponding to the 856 bp amplicon were not available for *R. monteiroi* or for *Rickettsia* species Pampulha strain. In addition, the primers used in the current study do not amplify the *ompB* gene of *R. bellii*. Nevertheless, differential identification based on unique banding patterns (Table. 1), could be achieved using *MspI* and *RsaI* to digest the *htrA* amplicon of *Rickettsia* species Pampulha strain, *MspI* and *SacI* to cut the *htrA* amplicon of *R. monteiroi* and *HindIII* to cleave the *htrA* amplicon of *R. bellii*.

To assess the utility of this method with field

Table 1. PCR-RFLP fragment sizes predicted following endonuclease digestion of a PCR generated 407 bp amplicon of the gene *htrA* and for a PCR generated 856-bp amplicon of the gene *ompB*.

<i>Rickettsia</i> Species	Fragment sizes in base pairs generated from 407 bp amplicon <i>htrA</i>		Fragment sizes in base pairs generated from 856-bp amplicon of <i>ompB</i>	
	Banding pattern	Banding pattern	Banding pattern	Banding pattern
	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>	<i>MspI</i>	<i>RsaI</i>
" <i>Candidatus Rickettsia amblyomii</i> "	250, 157	298, 82, 27	505, 222, 129	599, 174, 83
<i>R. bellii</i>	305, 102	149, 137, 54, 33, 34	NA	NA
<i>R. felis</i>	200, 157, 50	298,82, 27	363, 309, 87, 63, 40	599, 174, 89
<i>R. massiliae</i>	250, 102, 55	298, 82,27	505, 222, 129	559, 174, 40, 83
<i>R. monteiroi</i> *	407	195. 97, 82, 33	NA	NA
<i>R. parkeri</i>	246,157, 4	298, 82, 27	505, 222, 129	391, 169, 144, 83, 39, 30
<i>R. rhipicephali</i>	246, 102, 55, 4	298,82,27	636, 220	559, 174, 83, 40
<i>R. rickettsii</i>	250,157	298,82, 27	353, 152, 129, 125, 97	144, 129, 125, 97, 96, 83, 79,73, 30
<i>Rickettsia</i> sp. Pampulha strain	200, 157, 50	207, 82, 69, 22, 27	NA	NA

NA = No sequence available. * Digestion of the 407 bp amplicon *htrA* amplicon of *R. monteiroi* with the restriction endonuclease *SacI* generates a unique banding profile based on two bands with molecular masses of 216 & 191bp.

samples, ticks were collected from wild birds and examined for the presence of amplifiable rickettsial DNA. DNA was extracted from a total of 19 ticks represented by 17 *A. longirostre* (13 larvae and 4 nymphs), one larvae of *A. ovale*, and a single nymph of *A. varium* collected from specimens of *Dendrocincla turdina*, *Sittasomus griseicapillus*, *Xiphorhynchus fuscus*, and *Xiphorhynchus guttatus*. All (17/17) of the *A. longirostre* generated amplicons of the predicted size when examined using each of the three PCR assays. In contrast, the other two tick species were recorded as universally negative for amplifiable rickettsial DNA. Subsequent digestion of the 17 *ompB* amplicons with *MspI* and *RsaI* revealed that in all cases the ticks were infected with “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” (Figure 1). This finding was not unexpected given the predominance of this species in the majority of studies on bird-tick-associated rickettsia conducted in Brazil (Ogrzewalska et al. 2008, Ogrzewalska et al. 2010, Ogrzewalska et al. 2011b, Ogrzewalska et al. 2012 Labruna et al. 2011). It is of interest that, based upon sequencing data, two genetic variants of “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” denominated strains ARANHA and AL have been described infecting immature stages of *A. longirostre* in Brazil (Parola et al. 2013). Differential identification of the three “species” could not be attained using digestion of the *ompB* amplicon. However, it was

observed that all of the *htrA* sequence deposited in the GenBank as being derived from “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” contained a single site for the enzyme *HindIII* which upon digestion would yield two fragments of 203 and 204 base pairs in size. This restriction site was found to be absent from the sequences deposited for strains ARANHA (GenBank accession number AY360215), and AL (GenBank accession number EU274655). As such, PCR-RFLP using this sequence and the enzyme *HindIII*, provides a possible means for differentiation between the classical strain and the Brazilian variants. The *htrA* amplicons from our tick samples were not cut upon digestion with *HindIII*, indicating that they were either strain ARANHA or AL.

In conclusion, we report the development of a simple and robust PCR-RFLP protocol, which is based upon widely employed rickettsial gene targets and PCR assays and that allows the rapid (24 to 48 hour), identification of each of the tick-associated *Rickettsia* species which have been reported to date in Brazil. The method is cost effective and provides a technically uncomplicated alternative to sequence based identification. It is our hope that the availability of this protocol may serve to stimulate increased research on the study of this important group of emerging and re-emerging pathogens.

Acknowledgements. We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES) and the Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ) (process E-26/112.563/2012). We also thank Hermes Ribeiro Luz and Gabriel Alves Landulfo, both doctoral students in the Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, for invaluable assistance during collection of the birds.

REFERENCES

- Abdad M.Y., Stenos J. & Graves S. *Rickettsia felis*, an emerging flea-transmitted human pathogen. *Emerg. Health Threats J.*, 4:1-7, 2011.
- Barros-Battesti D.M., Arzua M. & Bechara G.H. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, 2006. 223p.
- CBRO. Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos, 2011. São Paulo. Available at: <<http://www.ib.usp.br/cbro>> Accessed on: Apr. 6, 2013.
- Gage K.L., Schrupf M.E., Karstens R.H., Burgdorfer W. & Schwan T.G. DNA typing of rickettsiae in naturally infected ticks using a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism system. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 50:247-260, 1994.

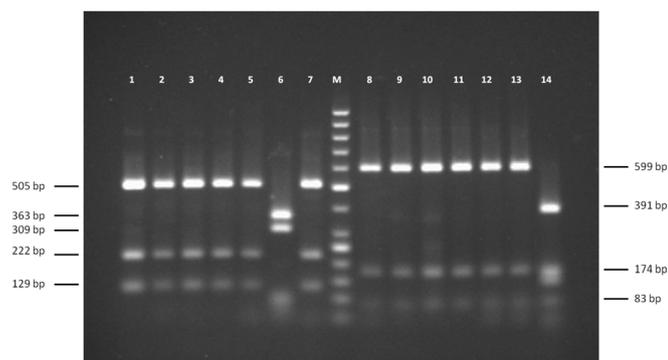


Figure 1. Ethidium bromide-stained agarose (2%) gel analysis of PCR-RFLP banding patterns produced by *MspI* and *RsaI* digestion of *ompB* amplicons generated from 4 *Amblyomma longirostre* larvae using the 120-M59 and 120-807 primer pair. Lanes 1, 2, 3 and 4 = patterns of bird tick DNA samples, lane 5 = *Rickettsia amblyommii* (strain ARANHA), lane 6 = *Rickettsia felis*, Lane 7 = *Rickettsia parkeri* (strain NOD), each digested with *MspI* restriction endonuclease. Lane M = DNA size marker (Thermo scientific GeneRuler; 50 bp DNA ladder). Lanes 8, 9, 10 and 11 = patterns of bird tick DNA samples, lane 12 = *Rickettsia amblyommii* (strain ARANHA), lane 13 = *Rickettsia felis*, lane 14 = *Rickettsia parkeri* (strain NOD), each digested with *RsaI*. Band sizes are indicated in base pairs (bp).

- Labruna M.B., Mattar S., Nava S., Bermudez C.S., Venzal J.M., Dolz G., Abarca K. & Romero L. Rickettsiosis in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev. Med. Vet. Zootec.*, 16:2435-2457, 2011.
- Labruna M.B., McBride J.W., Bouyer D.H., Marcelo L., Camargo A., Camargo E.P. & Walker H. Molecular Evidence for a Spotted Fever Group *Rickettsia* Species in the Tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *J. Med. Entomol.*, 41:533-537, 2004a.
- Labruna M.B., Whitworth T., Horta M.C., Bouyer D.H., McBride J.W., Pinter A., Popov V., Gennari S.M. & Walker D.H. *Rickettsia* species Infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.*, 42:90-98, 2004b.
- 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 Meastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol. Res.*, 84:478-484, 1998.
- Martins T.F., Onofrio V.C., Barros-Battesti D.M. & Labruna M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. *Ticks Tick Borne Dis.*, 1:75-99, 2010.
- Matsumoto K. & Inokuma H. Identification of spotted fever group *Rickettsia* Species by polymerase chain reaction-restriction fragment length. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 9:747-749, 2009.
- Melo A.L.T., Martins T.F., Horta M.C., Moraes-Filho J., Pacheco R.C., Labruna M.B. & Aguiar D.M. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, 2:213-218, 2011.
- Ogrzewalska M., Pacheco R.C., Uezu A., Labruna M.B. & Ferreira F. Ticks (Acari: Ixodidae) Infesting wild birds in an Atlantic Forest area in the state of São Paulo, Brazil, with isolation of *Rickettsia* from the tick *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.*, 45:770-774, 2008.
- Ogrzewalska M., Uezu A. & Labruna M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitol. Res.*, 106:809-816, 2010.
- Ogrzewalska M., Uezu A., Jenkins C.N. & Labruna M.B. Effect of forest fragmentation on tick infestations of birds and tick infection rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. *Ecohealth*, 8:320-331, 2011a.
- Ogrzewalska M., Uezu A. & Labruna M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitol. Res.*, 108:665-70, 2011b.
- Ogrzewalska M., Saraiva D.G., Moraes-Filho J., Martins T.F., Costa F.B., Pinter A. & Labruna M.B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology*. 139:1283-1300, 2012.
- Ogrzewalska M., Martins T., Capek M., Literak I. & Labruna M.B. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.*, 4:145-147, 2013.
- Pacheco R.C., Arzua M., Nieri-Bastos F.A., Moraes-Filho J., Marcili A., Richtzenhain L.J., Barros-Battesti D.M. & Labruna M.B. Rickettsial Infection in Ticks (Acari: Ixodidae) collected on birds in southern Brazil. *J. Med. Entomol.*, 49:710-716, 2012.
- 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. *Clin. Microbiol. Rev.*, 26:657-702, 2013.
- Peniche-Lara G., Zavala-Velazquez J., Dzul-Rosado K., Walker D.H. & Zavala-Castro J. Simple method to differentiate among *Rickettsia* species. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 23:203-208, 2013.
- Rameshkumar N., Ayyadurai N., Kayalvizhi N. & Gunasekaran P. Genotypic and phenotypic diversity of PGPR fluorescent pseudomonads isolated from the rhizosphere of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *J. Microbiol. Biotechnol.* 22:13-24, 2012.
- Roux V. & Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50:1449-1455, 2000.
- Saraiva D.G., Nieri-Bastos F.A., Horta M.C., Soares H.S., Nicola P.A., Pereira L.C. & Labruna M.B. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, northeastern Brazil: isolation, transovarial transmission, and transstadial perpetuation. *Vector Borne Zoonotic Dis.*, 13:615-8, 2013.
- Szabó J.M., Pinter A. & Labruna M.B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front Cell Infect. Microbiol.*, 3:1-9, 2013.
- Vincze T., Posfai J. & Roberts R.J. NEBcutter: a program to cleave DNA with r restriction enzymes. *Nuc. Acid. Res.*, 31:3688-91, 2003.