



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Especialização em Entomologia Médica

Pesquisa e identificação molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos (Acari: Ixodidae) em área silenciosa para Febre Maculosa no Nordeste do Brasil

Michellin Pereira de Albuquerque

Orientadores

Dra. Marinete Amorim
Dra. Karla Bitencourth Garcia

Rio de Janeiro
2019

Michellin Pereira de Albuquerque

Pesquisa e identificação molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos (Acari: Ixodidae) em área silenciosa para Febre Maculosa no Nordeste do Brasil

Monografia submetida como requisito parcial para obtenção do grau de especialista em Entomologia Médica, Curso de Especialização em Entomologia Médica, pelo Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ.

Rio de Janeiro

Data: ___/___/___

Assinatura do 1º membro da banca

Assinatura do 2º membro da banca

Assinatura do 3º membro da banca

Pereira de Albuquerque, Michellin.

Pesquisa e identificação molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos (Acari: Ixodidae) em área silenciosa para Febre Maculosa no Nordeste do Brasil / Michellin Pereira de Albuquerque. - Rio de Janeiro, 2019.
45 f.; il.

Monografia (Especialização) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Entomologia Médica, 2019.

Orientadora: Marinete Amorim.

Co-orientadora: Karla Bitencourth Garcia.

Bibliografia: f. 38-45

1. Doenças transmitidas por carrapato. 2. PCR nested. 3. Filogenia molecular. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Muitos são os motivos para agradecer, e primeiramente agradeço a Deus que sempre está comigo e me permitiu chegar até aqui. Todo mérito seja dado a Ele por essas conquistas.

Em segundo lugar agradeço aos meus pais, Antonio e Cleusir, que sempre contribuíram para minha formação. Sem o apoio deles não seria possível chegar até aqui. Obrigada pai e mãe por tudo o que fizeram e ainda fazem por mim.

À coordenação de Pós-Graduação *Lato sensu* de Entomologia Médica, principalmente ao Dr. Rubens Pinto de Mello e a Dr^a Catarina Macedo, que me deram a oportunidade de participar deste programa que me abriu portas para outras coisas na minha carreira profissional.

Agradeço a minha orientadora Dr^a Marinete Amorim pela oportunidade de desenvolver este trabalho, e Dr^a Karla Bitencourth Garcia, que como co-orientadora me auxiliou durante todo o desenvolvimento do projeto. E também ao Dr. Gilberto Gazêta pelo acolhimento e suporte nos experimentos realizado no Laboratório de Referência Nacional em Vetores de Riquetsioses (LIRN).

Também agradeço a Dr^a Nicole Moura Martiniano, que teve um papel importante para minha decisão através das aulas de genética aplicada a vigilância de vetores de riquetsioses, e MSc. Ana Beatriz Borsoi juntamente com a Karla, através das aulas de Ixodídeos.

Viviane, Tayra, Ingrid e todos do Laboratório de Referência Nacional em Vetores de Riquetsioses (LIRN) muito obrigada por todo apoio.

E não esquecendo dos meus colegas de classe: Leiane, Laura, Thiago, Cristovão, Felipe, Edgar e os demais pelo apoio, pelos momentos de estudos e discussão em sala e fora de sala, meu muito obrigada! Espero que todos tenham muito sucesso em suas carreiras!

E a todos que também contribuíram de forma direta ou indireta para a conclusão deste trabalho, meus agradecimentos infinitos!

RESUMO

Os carrapatos por serem ectoparasitos hematófagos podem transmitir diversos patógenos durante a alimentação, incluindo bactérias do gênero *Rickettsia*. Nesse gênero estão os bioagentes da Febre Maculosa (FM), doença infecciosa febril aguda de gravidade variável. No Brasil, a FM é a principal doença humana associada aos carrapatos. No Estado do Rio Grande do Norte (RN), área silenciosa para FM, alguns casos suspeitos da doença foram reportados, porém sem confirmação. Adicionalmente, estudo prévio identificou ectoparasitos positivos para presença de riquetsias do Grupo Febre Maculosa no Estado. Entretanto, o conhecimento sobre a história natural, vetores e bioagentes da FM no RN ainda é incipiente. O objetivo do presente estudo foi investigar a presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos oriundos de áreas de interesse epidemiológico para FM no RN, Brasil. Inicialmente, os carrapatos foram identificados utilizando chaves dicotômicas específicas. Parte das amostras foi submetida à extração de DNA, amplificação e sequenciamento: para a identificação molecular dos carrapatos foi utilizado fragmento do gene 16S rDNA; e para pesquisa de riquetsias foram usados fragmentos dos genes *gltA*, *ompA*, *htrA*, e *ompB*. As sequências obtidas foram identificadas por análise comparativa com sequências do “GenBank” e submetidas à reconstrução filogenética através de análise de máxima verossimilhança. Foram coletados 1463 carrapatos, sendo 882 espécimes de *Dermacentor nitens*, 466 exemplares de *Rhipicephalus sanguineus* linhagem Tropical e 115 indivíduos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Das 383 amostras submetidas à pesquisa de riquetsia, foi identificada a presença de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em uma fêmea de *R. sanguineus* linhagem Tropical e em um macho de *D. nitens*, e a *Rickettsia felis* foi detectada em um macho de *R. sanguineus* linhagem Tropical. Apesar da ausência de casos confirmados de FM no RN, a detecção de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica e *R. felis*, bioagentes reconhecidos da doença no Brasil, evidencia o potencial risco da área para ocorrência de casos de FM, bem como a chance de casos da doença estarem sendo subnotificados. Os resultados do presente estudo serão utilizados para sensibilizar o Sistema de Saúde do RN quanto a essa possibilidade. Dessa forma, mais estudos devem ser realizados para um melhor entendimento do cenário da FM no RN, incluindo os bioagentes, vetores e reservatórios envolvidos no ciclo das riquetsioses.

Palavras-chave: Doença transmitida por carrapatos; PCR *nested*; filogenia molecular.

ABSTRACT

Ticks for being hematophagous ectoparasites can transmit several pathogens during feeding, including bacteria of the genus *Rickettsia*. In this genus are the bioagents of Spotted Fever (SF), an acute febrile infectious disease of variable severity. In Brazil, SF is one of the main complaints related to ticks. In the state of Rio Grande do Norte (RN), silent area for SF, some suspected cases of the disease have been reported but not confirmed. Additionally, a previous study identified positive ectoparasites for the presence of rickettsiae of the Spotted Fever Group in the State. However, knowledge about the natural history, vectors and bioagents of SF in the RN is still incipient. The aim of the present study was to investigate the presence of *Rickettsia* spp. in ticks from areas of epidemiological interest for SF in the RN, Brazil. Initially, ticks were identified using specific taxonomic keys. Part of the samples was submitted to DNA extraction, amplification and sequencing: for the molecular identification of ticks the 16S rDNA gene fragment was used; and fragments of the *gltA*, *ompA*, *htrA*, and *ompB* genes were used to investigate the presence of rickettsiae. The sequences obtained were identified by comparative analysis with GenBank sequences and subjected to phylogenetic reconstruction by maximum likelihood analysis. A total of 1463 ticks were collected, of which 882 were *Dermacentor nitens* specimens, 466 specimens of *Rhipicephalus sanguineus* strain Tropical and 115 specimens of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Of the 383 samples submitted to the rickettsia research, the presence of *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest was identified in a female of *R. sanguineus* strain Tropical and in a male of *D. nitens*, and *Rickettsia felis* was detected in a male of *R. sanguineus* strain Tropical. Despite the absence of confirmed cases of SF in the RN, the detection of *R. parkeri* strain Atlantic rainforest and *R. felis*, recognized bioagents of the disease in Brazil, highlights the potential risk of the area for the occurrence of SF cases, as well as the chance of cases of the disease being underreported. The results of this study will be used to sensitize the RN Health System about this possibility. Thus, further studies should be performed to better understand the SF scenario in the RN, including bioagents, vectors and reservoirs involved in the rickettsial cycle.

Keywords: Tick-borne disease; PCR *nested*; molecular phylogeny.

SUMÁRIO

RESUMO	iv
ABSTRACT	v
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. A Febre Maculosa no Brasil e sua Transmissão	1
1.2. Riquetsias do Grupo Febre Maculosa de Patogenicidade Conhecida.....	2
1.3. Principais vetores de <i>Rickettsia</i> sp. no Brasil	3
1.4. O Estado do Rio Grande do Norte como área silenciosa para Febre Maculosa	5
2. OBJETIVOS.....	7
2.1. Objetivo Geral.....	7
2.2. Objetivos Específicos	7
3. MATERIAL E MÉTODOS	8
3.1. Delineamento do Estudo	8
3.2. Área e período de estudo	8
3.5. Extração Total de DNA dos carrapatos	10
3.6. Pesquisa de <i>Rickettsia</i> spp.	11
3.7. Identificação molecular das linhagens de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	12
3.8. Análise eletroforética dos produtos amplificados.....	12
3.9. Sequenciamento dos fragmentos amplificados de DNA	12
3.9.1. Purificação dos produtos da PCR.....	12
3.9.2. Sequenciamento do DNA	12
3.9.3 Análise das sequências nucleotídicas.....	13
3.10. Análises Filogenéticas.....	13
4. RESULTADOS.....	14
4.1. Espécies de carrapatos identificadas.....	14
4.2. Identificação e reconstrução filogenética de linhagens de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ...	16
4.3. Identificação e reconstrução filogenética para <i>Rickettsia</i> spp. detectadas nos carrapatos.....	18
5. DISCUSSÃO.....	21
6. CONCLUSÕES.....	25
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa do Brasil, no canto superior esquerdo, com o estado do Rio Grande do Norte destacado em branco. No centro da imagem, ressaltado em amarelo, está o mapa do Estado do Rio Grande do Norte com indicação dos municípios analisados. 1) Natal; 2) Parnamirim; 3) Santa Cruz e 4) São Gonçalo do Amarante. Fonte: Albuquerque M. P., 2019.9
- Figura 2.** Filogenia de fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% “cut-off”)..... 17
- Figura 3.** Mapa do Rio Grande do Norte, com destaque para o município de Natal, indicando a localização das amostras nas quais foram detectadas a presença de fragmentos dos genes *ompB* e *htrA* de riquetsia. Fonte: Albuquerque, M. P., 2019. 18
- Figura 4.** Filogenia concatenada de fragmentos dos genes *htrA* e *ompB* de riquetsias, detectados em carrapatos coletados durante vigilância da Febre Maculosa no Estado do Rio Grande do Norte/ Brasil, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92+G. Os números nos ramos apontam valores de apoio estatístico (70% “cut-off”). As estrelas (★) indicam sequências obtidas no presente trabalho.21

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Iniciadores e referências dos protocolos de amplificação utilizados na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a pesquisa de riquetsias nas amostras de carrapatos coletados no Rio Grande do Norte/ Brasil..... 11
- Tabela 2.** Frequência absoluta e relativa de potenciais vetores de riquetsias coletados por municípios analisados do Rio Grande do Norte/ Brasil, no período de 2014 a 2016..... 14
- Tabela 3.** Espécies de potenciais vetores coletadas, no período de 2014 a 2016, para pesquisa de riquetsias em áreas silenciosas para Febre Maculosa no Estado do Rio Grande do Norte/ Brasil..... 15
- Tabela 4.** Dados das amostras de carrapatos coletados no Rio Grande do Norte/ Brasil que amplificaram fragmentos de genes de riquetsias e a identificação molecular dessas riquetsias através do BLASTN (“Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide”)..... 19
- Tabela 5.** Espécies de carrapatos detectadas infectadas com riquetsias nos municípios estudados do Estado do Rio Grande do Norte/ Brasil, no período de 2014 a 2016.20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL - Microlitro

°C – Graus Celsius

16S rDNA – Gene Mitocondrial 16S DNA ribossômico

CO₂ – Dióxido de Carbono (gás carbônico)

DNA- Do inglês, “Deoxyribonucleic Acid”- Ácido Desoxirribonucléico

DNAg- Do inglês, “genomic Deoxyribonucleic Acid”- Ácido Desoxirribonucléico genômico

Dnase- Desoxirribonuclease

dNTP- Do inglês, “Deoxynucleotide Triphosphates”- Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EDTA- Do inglês, “Ethylenediaminetetraacetic acid”- Ácido etilenodiamino tetra-acético

FIOCRUZ- Fundação Oswaldo Cruz

FM- Febre Maculosa

FMB- Febre Maculosa Brasileira

GA – Grupo Ancestral

GFM- Grupo Febre Maculosa

gltA – Gene Citrato Sintase

GT- Grupo Tifo

H₂O – Água

htrA - Do inglês, “High-temperature requirement A”

LIRN- Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses

M- Molar

Mg - Magnésio

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM - miliMolar

N₂ - Nitrogênio

NaCl- Cloreto de Sódio

ompA - Do inglês, Gene “Outer Membrane Protein A” – Gene da Proteína Externa de Membrana A

ompB - Do inglês, Gene “Outer Membrane Protein B” – Gene da Proteína Externa de Membrana B

P.A.- Para Análise

pb – Pares de base

PCR- Do inglês, “Polymerase Chain Reaction”- Reação em Cadeia da Polimerase

pH – potencial Hidrogeniônico

Rnases - Ribonucleases

rpm – Rotações por minuto

SDS – Do inglês, “Sodium Dodecyl-Sulfate” - Dodecil-Sulfato de Sódio

sp.- Espécie

spp.- Espécies

TAE- Tris-acetato-EDTA

Taq- *Thermus aquaticus*

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, a Febre Maculosa (FM) é considerada uma doença emergente devido ao aumento de casos confirmados e a expansão das áreas de ocorrência (OLIVEIRA et al., 2016a). A transmissão dos bioagentes da doença ocorre em pelo menos 13 unidades da federação no Brasil (OLIVEIRA et al., 2016a), sendo relacionada a diferentes espécies de agentes etiológicos e de carrapatos. Dessa forma, a FM pode ser caracterizada como um problema de saúde pública e, o entendimento do cenário da doença no país torna-se complexo pela ocorrência de casos confirmados em diversas regiões e em diferentes biomas.

1.1. A Febre Maculosa no Brasil e sua Transmissão

A FM é uma riquetsiose emergente de caráter zoonótico, transmitidas por vetores ápteros (principalmente carrapatos). Ela está presente em todos os continentes (com exceção da Antártica), e, em cada região possui nomenclaturas diferentes, espécies de riquetsias e vetores distintos envolvidos nos ciclos da FM (WOOD & ARTSOB, 2012).

A doença é causada por riquetsias, bactérias gram negativas intracelulares obrigatórias que apresentam tropismo por células endoteliais (WALKER et al., 2003; MEIRA et al., 2013; PAROLA et al., 2013; PINTER et al., 2016; BRASIL, 2017). No Brasil ocorrem três espécies de maior relevância para saúde pública: *Rickettsia rickettsii* (agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira - FMB), espécie patogênica de maior importância devido a sua alta letalidade em humanos; *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica e *Rickettsia felis* responsáveis por casos mais brandos da doença (RAOULT et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2002; SPOLIDORIO et al., 2010; PINTER et al., 2016; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018). A FM, independente do bioagente causador, é doença de notificação compulsória obrigatória em até 24 horas (BRASIL, 2017; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018).

A transmissão do agente etiológico ocorre durante o repasto sanguíneo de um carrapato ou ácaro infectado ou pelas fezes da pulga infectada. Durante a alimentação do ectoparasito, as bactérias são inoculadas na pele do hospedeiro e os microrganismos são fagocitados por células dendríticas, se replicam e se disseminam na corrente sanguínea para infectar a microcirculação endotelial (WALKER, 2007; BLANTON, 2019). A disseminação da infecção pelo endotélio leva ao aumento da permeabilidade vascular, que por sua vez resulta em manifestações exantemáticas, em casos de FMB, podendo levar a pneumonia intersticial, meningoencefalite, lesão renal aguda, falência de múltiplos órgãos e morte (WALKER, 2007; BLANTON, 2019).

Sendo assim, a gravidade é variável, com manifestações leves e atípicas podendo apresentar formas graves, e, até levar o indivíduo a óbito.

O período de incubação da doença, até a manifestação dos primeiros sintomas, geralmente, é de 2 a 14 dias (BRASIL, 2017). As manifestações clínicas da doença tem início abrupto e os sintomas iniciais são inespecíficos, como por exemplo, febre alta, cefaléia, mialgia intensa, mal-estar generalizado, náuseas e vômitos (PINTER et al., 2016). Sinais estes que são comuns a outras doenças, como gripe, dengue, leptospirose, meningite, dentre outras. Tardamente pode surgir o exantema máculo-papular, que é um sinal clínico característico da FMB, porém pode estar ausente em alguns casos, o que dificulta e retarda o diagnóstico clínico e o tratamento (ANGERAMI et al., 2008; BRASIL, 2017).

Em contrapartida, as manifestações clínicas dos casos associados à *R. parkeri* cepa Mata Atlântica tendem a ser menos graves do que os casos clássicos de FMB acometidos por *R. rickettsii*. Os casos de FM ocasionados por *R. parkeri* apresentam os sinais clássicos da doença (febre, mialgia, cefaléia e exantema maculopapular), porém ocorrem de forma mais branda, evoluindo para cura. Um sinal característico dessa forma de riquetsiose é a escara de inoculação no local da picada do carrapato e linfadenopatia (SPOLIDORIO et al., 2010; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; ARMITANO et al., 2019). Alguns casos podem apresentar plaquetopenia, leucopenia discreta, e as aminotransferases (AST/TGO, ALT/TGP) podem estar levemente aumentadas em exames laboratoriais (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018).

O conhecimento sobre sinais clínicos da FM associada a *R. felis* é escasso, com indicativo de quadro brando parecido com o ocasionado por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Adicionalmente, em algumas regiões do país (e.g. região Centro-Oeste, região Norte e parte da região Nordeste) ainda é incipiente o conhecimento agregado sobre FM. Nesse contexto, são observados casos com notada diferença clínica na região Centro-Oeste do Brasil (OLIVEIRA et al., 2016a), sem confirmação das espécies de vetores e riquetsias envolvidas. Da mesma forma, em outros locais do país, assinalados como novos focos de FM (e.g. Rondônia e Pernambuco), o conhecimento sobre a história natural, bioagentes, vetores e reservatórios envolvidos nos ciclos das riquetsioses é escasso (AGUIRRE et al., 2018; SILVA et al., 2018).

1.2. Riquetsias do Grupo Febre Maculosa de Patogenicidade Conhecida

As riquetsias são bactérias classificadas como alfa-proteobactéria, sendo pertencentes à ordem Rickettsiales, da família Rickettsiaceae e do gênero *Rickettsia*, o qual se subdivide geneticamente em quatro grupos: Grupo Ancestral (GA) – composto por riquetsias de patogenicidade desconhecida, com a *Rickettsia bellii*, *Rickettsia monteiroi* e *Rickettsia*

canadensis; Grupo Transicional - composto por *Rickettsia akari* (transmitida por ácaros), *Rickettsia australis* (transmitida por carrapatos), *Rickettsia aseboensis* (transmitida por pulgas) e *Rickettsia felis* (associada à pulgas e carrapatos); Grupo Tifo (GT) - composto por *Rickettsia prowazekii* (transmitida por piolhos) e *Rickettsia typhi* (transmitida por pulgas); e Grupo Febre Maculosa (GFM) (ANGERAMI, 2015; SILVA et al., 2017; BLANTON, 2019).

As espécies do GFM têm ampla distribuição geográfica e infectam diversas espécies de carrapatos. Este grupo compreende o maior número de espécies, possuindo cerca de 30 espécies descritas até o momento, das quais pelo menos 15 são de patogenicidade conhecida no mundo. Dentre essas espécies estão: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia heilongjiangensis*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia raoultii*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia philippii*, *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia monacensis*, *Rickettsia helvetica* e *Rickettsia amblyommatis* (BLANTON, 2019). Ocorrendo, pelo menos, seis espécies do gênero *Rickettsia* com patogenicidade conhecida na América do Sul: *R. rickettsii*, *Rickettsia parkeri sensu stricto (s.s.)*, *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, *R. felis*, *R. typhi*, *R. prowazeki* e *R. massiliae* (LABRUNA et al., 2009; PAROLA et al., 2013; MARTINS et al., 2014;). Dessas, *R. rickettsii* e *R. parkeri* cepa Mata Atlântica são espécies comprovadamente de maior importância em saúde pública no Brasil (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; PINTER et al., 2016).

1.3. Principais vetores de *Rickettsia* sp. no Brasil

Os carrapatos, assim como outros invertebrados (*e.g.* insetos, aranhas e ácaros), pertencem ao filo Arthropoda, compõem a classe Arachnida, sendo considerados pertencentes à subclasse Acari. Estes artrópodes são cosmopolitas e relatados parasitando diversos vertebrados terrestres, tais como os anfíbios, répteis, aves e mamíferos - incluindo o ser humano (hospedeiro acidental) (CAMARGO-NEVES et al., 2004).

Os ixodidas são classificados em três famílias (Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae), sendo 951 espécies descritas no mundo (DANTAS-TORRES et al., 2019). No Brasil, até o momento, sabe-se que ocorrem 70 espécies de carrapatos, sendo 47 espécies da família Ixodidae (KOCH, 1844) distribuídas em cinco gêneros: *Amblyomma* (KOCH, 1844) com 32 espécies; *Ixodes* (LATREILLE, 1795) com nove espécies; *Haemaphysalis* (KOCH, 1844) com três espécies; *Rhipicephalus* (KOCH, 1844) com duas espécies; e *Dermacentor* (KOCH, 1844) que é monotípica (DANTAS-TORRES et al., 2019). Já a família Argasidae (CANESTRINI, 1887) possui 23 espécies distribuídas nos gêneros *Ornithodoros* (KOCH, 1844) com 18 espécies;

Antricola (COOLEY & KOHLS, 1942) com três espécies; *Argas* (LATREILLE, 1795) e *Nothoaspis* (KEIRANS & CLIFFORD, 1975) representados por uma única espécie cada (DANTAS-TORRES et al., 2019). É importante ressaltar que no Brasil os carrapatos são encontrados em todos os biomas. Entretanto, a distribuição desse ectoparasito apresenta particularidades de acordo com a espécie, por exemplo: algumas espécies são relatadas apenas em áreas de Mata Atlântica enquanto outras são encontradas em regiões do Cerrado (NAVA et al., 2014; RAMOS et al., 2017).

Por realizarem hematofagia, os carrapatos podem transmitir agentes infecciosos para seus hospedeiros durante o processo de alimentação, sendo vetores de patógenos, como: vírus, bactérias, protozoários e helmintos para os animais, incluindo o homem (LABRUNA, 2004a). Nas últimas décadas, as doenças associadas [e.g. Erliquioses, Babesioses, Doença de Lyme, e a Febre Maculosa (FM)] aos agentes etiológicos vetorados por esse ectoparasito ganharam um crescente interesse médico-veterinário e importância para a saúde pública (PAROLA & RAOULT, 2001; LEIBY & GILL, 2004).

Diversas espécies de carrapatos têm sido associadas à transmissão dos bioagentes da FM em diferentes regiões do país. O carrapato é considerado um reservatório natural, pois pode permanecer infectado durante todo o seu ciclo de vida e ainda manter a circulação da bactéria através da transmissão transovariana (da fêmea infectada para os ovos) e/ou transestadial (de um estágio de vida para o outro), o que garante um ciclo endêmico prolongado (CAMARGO-NEVES et al., 2004). Durante seu repasto sanguíneo, o ixodídeo infectado pode transmitir riquetsias para uma grande diversidade de hospedeiros mamíferos, e acidentalmente infectar o homem (CAMARGO-NEVES et al., 2004; SZABÓ et al., 2013). Devido suas características biológicas, carrapatos monoxenos tem sua importância para a manutenção do ciclo enzoótico da FM, já os carrapatos heteroxenos e antropofílicos estão envolvidos na formação de ciclos epidêmicos pela facilidade de transmitir a bactéria entre diferentes hospedeiros (MOURA, 2011; CAMARGO-NEVES et al., 2004), sendo vetores de maior importância para saúde pública pelo alto potencial de transmissão de bioagentes patogênicos.

O principal vetor incriminado nos ciclos epidêmicos da FM são carrapatos do gênero *Amblyomma* [*Amblyomma sculptum* BERLESE, 1888; *Amblyomma ovale* KOCH, 1844 e *Amblyomma aureolatum* (PALLAS, 1772)]. Nas regiões Sudeste e em parte do Sul do Brasil (região sul do Estado do Paraná), onde se observa os casos mais graves de FM ocasionados por *R. rickettsii*, o vetor incriminado são carrapatos da espécie *A. sculptum*, exceto na região Metropolitana de São Paulo onde o carrapato *A. aureolatum* é reconhecido como vetor desse

bioagente (PINTER et al., 2016). Em áreas de Pampa e Mata Atlântica do Sul, Sudeste e Nordeste do país, onde há relatos de casos mais brandos de FM relacionados com *R. parkeri* s.s. e *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, são reconhecidos como vetores os carrapatos das espécies *Amblyomma tigrinum* KOCH, 1844 e *A. ovale*, respectivamente (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018). Mas isso não significa que outras espécies não possam estar envolvidas na transmissão dos agentes etiológicos da FM no país (SZABÓ et al., 2013). Espécies de outros gêneros de carrapato (e.g. *Rhipicephalus* spp., *Dermacentor* sp., dentre outros) podem ser potenciais vetores dos bioagentes da doença, visto que já foram observadas naturalmente infectadas por riquetsias do GFM (PAROLA et al., 2005).

A espécie *Dermacentor nitens* (NEUMANN, 1897) é parasito habitual de equinos, muares, asinos e, eventualmente, bovinos, caprinos, caninos, cervídeos e felinos silvestres. Já a espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CANESTRINI, 1887) parasita, preferencialmente, bovinos, mas outros animais servem de hospedeiros para essa espécie e, eventualmente, humanos podem ser parasitados devido à proximidade com o hospedeiro infestado (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Outro ixodídeo de relevância para a saúde pública é o *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (s.l.) (LATREILLE, 1806), conhecido como carrapato do cão. Atualmente esse carrapato compõe um complexo com duas espécies descritas na América Latina (MORAES-FILHO et al., 2011). É um carrapato cosmopolita encontrado em áreas tropicais e subtropicais, e também em regiões do sul da América do Sul. Por este motivo, as espécies do complexo *R. sanguineus* encontradas no país foram denominadas como linhagem “Temperada” e “Tropical” (MORAES-FILHO et al., 2011; CAETANO et al., 2017). Ainda é investigado o potencial desse ixodídeo como vetor dos bioagentes da FM no Brasil, pois em outras regiões do mundo esse carrapato possui relatos de parasitismo humano e é incriminado como vetor principal de riquetsias causadoras de FM (BARROS-BATTESTI et al., 2006; LOULY et al. 2006, DANTAS-TORRES et al. 2006, SERRA-FREIRE 2009, 2010, 2014, SERRA-FREIRE et al. 2011; SERRA-FREIRE 2012, BORSOI, 2015; MENTZ et al. 2016).

1.4. O Estado do Rio Grande do Norte como área silenciosa para Febre Maculosa

Áreas silenciosas para FM são definidas como regiões para a qual não existem informações sobre a ocorrência do vetor, e também o conhecimento sobre a história natural e a distribuição da doença ainda é incipiente (PINTER et al., 2011). No entanto, a inexistência de casos nem sempre é indicativo de que a FM não esteja ocorrendo em uma determinada região.

A falta de conhecimento sobre a patologia, a dificuldade de diagnóstico pelos médicos e a precariedade de acesso da população aos serviços de saúde contribuem para a existência de áreas silenciosas para FM (PINTER et al., 2011).

Até o momento, em algumas regiões do Estado do Rio Grande do Norte, foram detectados carrapatos potenciais vetores com a presença de fragmentos de genes de riquetsias do GFM, bem como alguns casos suspeitos de FM foram reportados, mas sem confirmação dos mesmos (OLIVEIRA et al., 2016). Diante deste fato, o conhecimento sobre dinâmica das riquetsioses na região ainda é incipiente. Dessa forma, é necessário a realização de estudos em potenciais vetores e reservatórios, empregando técnicas como as de biologia molecular, para determinar o real grau de endemicidade dessas áreas, assim como entender os vetores e reservatórios envolvidos no ciclo epidemiológico das riquetsioses.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Investigar a presença de *Rickettsia* spp. em carrapatos oriundos de áreas de interesse epidemiológico para Febre Maculosa no Estado do Rio Grande do Norte, Brasil.

2.2. Objetivos Específicos

- Determinar as espécies de carrapatos presentes na área de estudo;
- Utilizar análises de biologia molecular para concluir o diagnóstico específico dos ixodídeos quando as ferramentas morfológicas não forem suficientes;
- Pesquisar e identificar, molecularmente, a presença de riquetsias nos carrapatos coletados;
- Verificar a frequência de ixodídeos infectados na área de estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Delineamento do Estudo

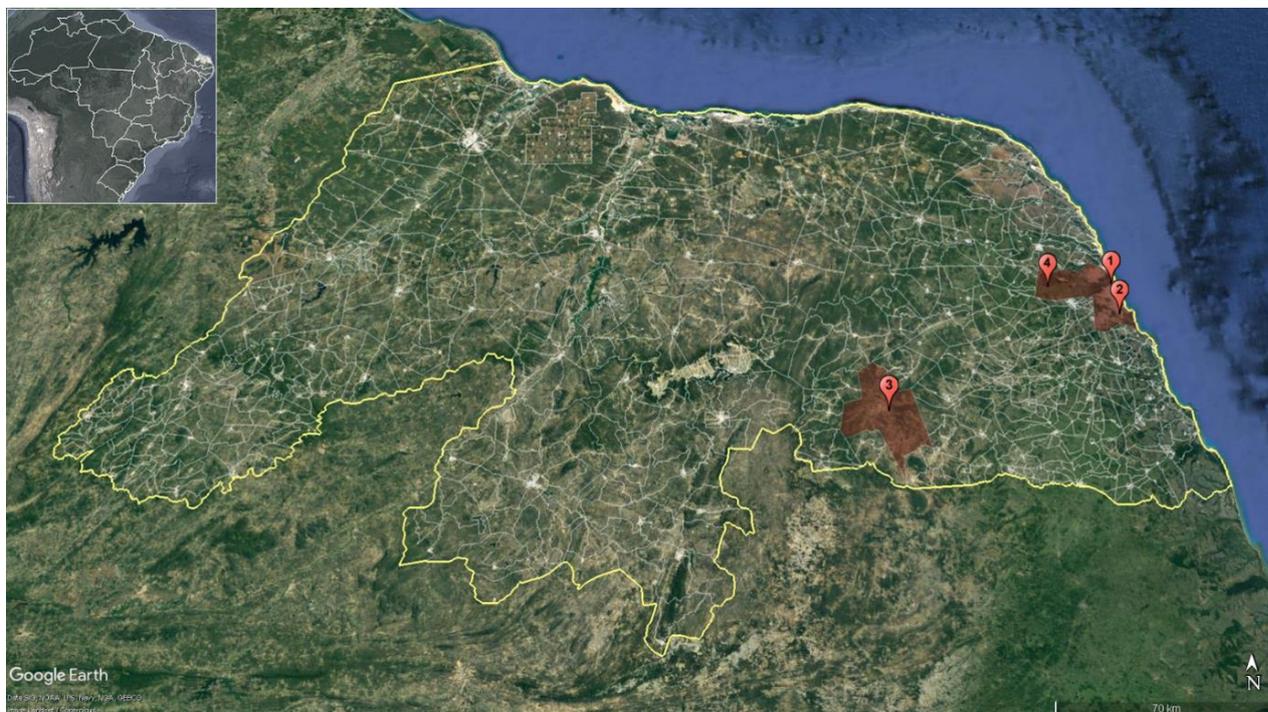
Trata-se de um estudo de detecção molecular de *Rickettsia* spp. em potenciais vetores da FM oriundos de quatro municípios do Estado Rio Grande do Norte/ Brasil. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN) do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) – Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) /Rio de Janeiro (RJ).

3.2. Área e período de estudo

O Rio Grande do Norte (RN) é um Estado situado na região nordeste do Brasil, com extensão territorial de 52.809,602 km², e é composto por 167 municípios, com população estimada em 3.479.010 habitantes (IBGE, 2019). O Estado é dividido em quatro macrorregiões: Agreste Potiguar, Leste Potiguar, Central Potiguar e Oeste Potiguar. No Estado estão presentes os biomas Mata Atlântica e Caatinga. A Mata Atlântica está distribuída pelo litoral potiguar, enquanto a Caatinga ocupa o restante do território do Estado. O clima predominante é semiárido quente, exceto no litoral oriental onde o clima é tropical úmido. Devido à ação antrópica, a área vegetal vem sendo cada vez mais destruída, causando desertificação e o enfraquecimento da biodiversidade (BRASIL, 2018).

Os carrapatos foram coletados, no período de 2014 a 2016, nos municípios de Natal, Parnamirim e São Gonçalo do Amarante (pertencentes ao Leste Potiguar) em bioma de Mata Atlântica, e no município de Santa Cruz (Agreste Potiguar) no bioma Caatinga do Estado do Rio Grande do Norte, no nordeste do Brasil (Figura 1). As coletas foram realizadas por equipes das Secretarias Municipais e Estadual de Saúde do Rio Grande do Norte em áreas públicas ou privadas-como parques, canis, haras, fazendas, residências e abrigos de animais domésticos e silvestres. Essas amostras foram obtidas durante vigilância de ambiente para FM, realizadas após o Estado ter participado do treinamento de capacitação técnica em investigação de casos e vigilância de ambiente da FM em áreas consideradas silenciosas para doença através da Rede Nacional de Vigilância de Ambientes para Febre Maculosa e outras Rickettsioses, do Ministério da Saúde do Brasil, em parceria com o LIRN/FIOCRUZ.

Figura 1. Mapa do Brasil, no canto superior esquerdo, com o estado do Rio Grande do Norte destacado em branco. No centro da imagem, ressaltado em amarelo, está o mapa do Estado do Rio Grande do Norte com indicação dos municípios analisados. 1) Natal; 2) Parnamirim; 3) Santa Cruz e 4) São Gonçalo do Amarante. Fonte: Albuquerque M. P., 2019.



3.3. Coleta e acondicionamento de ixodídeos

As coletas dos ixodídeos foram realizadas em hospedeiros (cães, bois, cavalos e asnos) e nos ambientes onde esses vertebrados viviam. No ambiente, os espécimes foram coletados com auxílio da técnica de arrasto de flanela, armadilha de CO₂ ou por busca ativa, e nos hospedeiros por torção contínua em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma. As amostras foram definidas por espécimes coletados em um mesmo hospedeiro ou ambiente. Após a coleta, os ectoparasitos foram armazenados em tubos plásticos contendo isopropanol P.A. e encaminhados ao LIRN/FIOCRUZ, juntamente com as fichas de encaminhamento das amostras.

3.4. Triagem e identificação morfológica dos carrapatos

As amostras de carrapatos foram triadas e identificadas seguindo o Procedimento Operacional Padrão para a Identificação Taxonômica de Vetores das Riquetsioses (POP-LIRN-017), elaborado e implementado pelo laboratório.

Para a identificação morfológica dos carrapatos, foram utilizados estereomicroscópio, chaves dicotômicas e descrições de AMORIM et al., (1997) para larvas de *D. nitens* e YUNKER et al., (1986) para ninfas dessa espécie; NAVA et al., (2018) para larvas e ninfas do gênero *Rhipicephalus*; ARAGÃO & FONSECA (1961) e BARROS-BATTESTI et al., (2006) para adultos de ixodídeo.

Posteriormente, os espécimes coletados foram separados em alíquotas para serem submetidas às análises moleculares. Para cada amostra, aproximadamente 30% de seus exemplares foram preparados em alíquotas, de acordo com a espécie, estágio (larvas, ninfas e adultos) e sexo (fêmea e macho). As alíquotas foram compostas por exemplares unitários (ninfas e adultos) ou em “pool” (10 larvas de carrapatos). Todas as alíquotas elaboradas foram submetidas à extração de DNA total pela técnica de extração por sal NaCl (ALJANABI & MARTINEZ, 1997).

3.5. Extração Total de DNA dos carrapatos

Para obtenção de DNA genômico (DNAg), inicialmente, cada alíquota foi macerada em nitrogênio líquido (N₂) com o auxílio de bastão de vidro. Em seguida, foi adicionado 400µL de Buffer A (NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM pH 8,0), 40 µL de SDS 20% e 8 µL de Proteinase K 20 mg/mL (Invitrogen, Califórnia, EUA). Cada amostra foi homogeneizada no vórtex e incubada em banho Maria a 55-56° C por 1 hora.

Após a incubação, foi adicionado ao tubo 300 µL de solução de NaCl 6M e as amostras foram homogeneizada no vórtex. Em seguida, os tubos contendo as amostras foram centrifugados a 10000 rpm por 30 minutos a 4°C. Aproximadamente 600 µL do sobrenadante foram transferidos para um novo tubo, e foi adicionado volume igual de isopropanol P.A. para a precipitação do DNA por 1 hora a -20 °C. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm/ 10 minutos a 4 °C e o sobrenadante foi descartado.

Para a lavagem do pellet foi adicionado 600 µL de Etanol 70% e centrifugado a 10000 rpm/ 10 min. O sobrenadante foi desprezado, os tubos foram invertidos em papel toalha e deixados abertos para secagem. Por fim, o DNAg extraído foi ressuspenso em 25 µL de H₂O MiliQ livre de DNases e RNases e armazenado à 20 °C negativos para posterior análise (ALJANABI & MARTINEZ, 1997).

3.6. Pesquisa de *Rickettsia* spp.

Todas as amostras que tiveram seu DNAg extraído foram submetidas a pesquisa de *Rickettsia* spp. através da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posterior visualização dos fragmentos de DNA amplificados.

Para essa pesquisa foram utilizados oligonucleotídeo gênero-específicos como o *gltA* (gene citrato sintase) e grupos-específicos tais como o *htrA* (do inglês, “High-temperature requirement A”) que codifica a proteína estrutural de membrana de 17 kilodaltons, o gene da proteína externa de membrana B (*ompB*- do inglês, “outer membrane protein B”) e o gene da proteína externa de membrana A (*ompA*- do inglês, “outer membrane protein A”). Todos os oligonucleotídeos e protocolos de amplificação utilizados estão disponíveis na literatura (Tabela 1). Em todas as reações foi utilizado como controle positivo DNA de *R. rickettsii* e água Milli-Q livre de DNases e RNases como controle negativo.

As amplificações, através da PCR, foram realizadas no termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA).

Tabela 1. Iniciadores e referências dos protocolos de amplificação utilizados na PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para a pesquisa de riquetsias nas amostras de carrapatos coletados no Rio Grande do Norte/ Brasil.

Alvo da detecção	Gene	Técnica utilizada	Iniciador	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência
	<i>gltA</i>	PCR	CS2-78 CS2-323	5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3' 5'-GCTTCCTTAAAATTCATAAATCAGGAT-3'	401	LABRUNA et al., 2004a
<i>Rickettsia</i> sp. (Gênero específico)	<i>htrA</i>	PCR nested	1 ^o round 17k-5 17k-3 2 ^o round 17Kd1 17Kd2	5'-GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA-3' 5'-TGCTCTATCAATTCACAACCTGCC-3' 5'-GCTCTTGCAACTTCTATGTT-3' 5'-CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG-3'	549 434	LABRUNA et al., 2004b WEBB et al., 1990
<i>Rickettsia</i> sp. (GFM + GT)	<i>ompB</i>	PCR nested	1 ^o round <i>ompB</i> -OF <i>ompB</i> -OR 2 ^o round <i>ompB</i> SFG-IF <i>ompB</i> SFG/TG-IR	5'-GTA-ACC-GGA-AGT-AAT-CGT-TTC-GTA-A-3' 5'-CTT-TAT-AAC-CAG-CTA-AAC-CAC-C-3' 5'-GTT-TAA-TAC-GTG-CTG-CTA-ACC-AA-3' 5'-GGT-TTG-GCC-CAT-ATA-CCA-TAA-G-3'	511 425	CHOI et al., 2005
<i>Rickettsia</i> sp. GFM	<i>ompA</i>	PCR	<i>Rr</i> 190.70p <i>Rr</i> 190.602n	5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3' 5'-AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT-3'	532	REGNERY et al., 1991

GFM, Grupo Febre Maculosa; GT, Grupo Tifo.

3.7. Identificação molecular das linhagens de *Rhipicephalus sanguineus*

Para determinar a qual linhagem os exemplares de *R. sanguineus s.l.* do Rio Grande do Norte pertencem, foram analisadas 21 amostras de três municípios (Natal, Parnamirim e Santa Cruz) estudados. Esses indivíduos foram submetidos à amplificação de fragmento parcial (aproximadamente 460 pb) do gene mitocondrial 16S rDNA utilizando os oligonucleotídeos 16S+1 (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT-3') e 16S-1 (5'-GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT-3') (MANGOLD et al., 1998).

3.8. Análise eletroforética dos produtos amplificados

Após a amplificação, de cada gene, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 2%, em cuba horizontal com tampão TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA, pH 8,0), em voltagem aproximada de 89 volts por 60 minutos. Utilizou-se marcador de peso molecular de 100 bp DNA Ladder (Ludwig Biotec). Posteriormente, os géis foram corados em solução de TAE 1X com brometo de etídio por 10 minutos (SAMBROOK & RUSSELL, 2001).

A visualização dos géis e a fotodocumentação dos mesmos foram efetuadas utilizando o equipamento MiniBis Pro (DNR Bio- Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel).

3.9. Sequenciamento dos fragmentos amplificados de DNA

Todos os produtos da PCR (amplicons) obtidos correspondendo ao tamanho de DNA esperado, para cada gene, foram selecionados para a purificação e sequenciamento.

3.9.1. Purificação dos produtos da PCR

A purificação dos produtos da PCR foi realizada com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean up System (Promega, Corp., Madison, WI, EUA), de acordo com o manual do fabricante. Os amplicons purificados foram encaminhados para o sequenciamento do DNA.

3.9.2. Sequenciamento do DNA

O sequenciamento do DNA foi realizado na Plataforma de sequenciamento de DNA (PDTIS) da FIOCRUZ/ RJ. As reações de sequenciamento foram executadas utilizando o BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Nessas reações, foram empregados os mesmos oligonucleotídeos utilizados na PCR para determinação das sequências em ambas as

direções (3'-5' e 5'-3'). Posteriormente, as amostras foram precipitadas, ressuspendidas em formamida e aplicadas em sequenciador automático ABI 3730 xl (Applied Biosystems, Carlsbad, Califórnia, EUA) para leitura das sequências.

3.9.3 *Análise das sequências nucleotídicas*

Todas as sequências obtidas foram editadas manualmente e as sequências consenso geradas no programa ChromasPro 1.5 (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Qld, Austrália). Inicialmente essas sequências foram identificadas, por avaliação de similaridade, através de análise comparativa com as sequências depositadas no “GenBank”, com auxílio do BLASTN (“Basic Local Alignment Search Tool- Nucleotide”).

As sequências obtidas e sequências disponíveis no “GenBank”, para cada gene analisado, foram automaticamente alinhadas através do algoritmo de alinhamento múltiplo ClustalW (THOMPSON et al., 1994), disponível no programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente e os genes codificantes de proteínas foram traduzidos para aminoácidos para verificar a presença de pseudogenes e confirmar a existência de homologia, onde nenhum códon de parada foi observado.

3.10. Análises Filogenéticas

Para investigar as relações evolutivas entre as amostras de carrapatos identificadas molecularmente, bem como entre as riquétsias detectadas, foram realizadas análises filogenéticas, separadamente, para as sequências dos marcadores obtidos dos carrapatos e das riquétsias. Para isso, foram utilizadas sequências geradas no atual trabalho e sequências disponíveis no “GenBank”.

Nas análises concatenadas, o programa SeaView (GOUY et al., 2009) foi utilizado para concatenar os alinhamentos dos genes investigados de cada organismo estudado. As inferências filogenéticas, através de análise de máxima verossimilhança, foram realizadas no programa PhyML 3.0 (GUINDON et al., 2010) utilizando o modelo evolutivo (através do “Bayesian Information Criterion”) indicado pelo programa MEGA 6.0 (TAMURA et al., 2013) que melhor se ajustava ao conjunto de dados analisados (para o alinhamento do gene 16S rDNA dos carrapatos foi utilizado o modelo evolutivo T92 e para o alinhamento dos marcadores *htrA*+*ompB* das riquétsias foi empregado o modelo evolutivo T92+G). Valores de apoio estatístico dos ramos internos foram estimados com o teste aLRT (“approximate likelihood ratio test”) com 1000 réplicas (ANISIMOVA & GASCUEL, 2006).

4. RESULTADOS

4.1. Espécies de carrapatos identificadas

Foram analisados 1463 carrapatos e identificadas três espécies de ixodídeo: *D. nitens* com 882 espécimes, *R. sanguineus s.l.* com 466 exemplares e *R. microplus* com 115 indivíduos. A espécie mais abundante foi *D. nitens* (60,29% dos espécimes analisados) e a menos abundante foi *R. microplus* (7,86% dos carrapatos estudados) (Tabela 2).

Nos municípios de Santa Cruz e Parnamirim só foram coletados exemplares de *R. sanguineus s. l.*, nos outros dois municípios (São Gonçalo do Amarante e Natal) estudados foram observadas a presença de *D. nitens*, *R. microplus* e *R. sanguineus s.l.* (Tabela 2). A maior parte dos carrapatos coletados nos municípios correspondeu ao estágio adulto, sendo fêmeas com 593 espécimes (40,53%), seguido por macho com 442 espécimes (30,21%). Os estádios imaturos totalizaram 428 espécimes, sendo 336 (22,97%) ninfas e 92 (6,29%) larvas (Tabela 3).

No município de Natal foi observado o maior número de vetores coletados (1097 indivíduos – 74,98%), seguido de São Gonçalo do Amarante (175 ixodídeos – 11,96%), Parnamirim (142 exemplares – 9,71%) e Santa Cruz (49 indivíduos – 3,35%) (Tabela 3).

Tabela 2. Frequência absoluta e relativa de potenciais vetores de riquétsias coletados por municípios analisados do Rio Grande do Norte/ Brasil, no período de 2014 a 2016.

Espécie	Agreste Potiguar		Leste Potiguar		Total espécimes (%)
	Santa Cruz	Parnamirim	São Gonçalo do Amarante	Natal	
<i>Dermacentor nitens</i>	0	0	120	762	882 (60,29)
<i>Rhipicephalus microplus</i>	0	0	53	62	115 (7,86)
<i>Rhicephalus sanguineus s.l.</i>	49	142	2	273	466 (31,85)
Total de carrapatos por município (%)	49 (3,35)	142 (9,71)	175 (11,96)	1097 (74,98)	1463 (100,00)

Legenda: *s.l.* - *sensu lato*

Tabela 3. Espécies de potenciais vetores coletadas, no período de 2014 a 2016, para pesquisa de riquetsias em áreas silenciosas para Febre Maculosa no Estado do Rio Grande do Norte/ Brasil.

Região	Espécies identificadas por município	Estádio				Total de espécimes
		L	N	Macho	Fêmea	
Agreste Potiguar	Santa Cruz	0	9	26	14	49
	<i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i>	0	9	26	14	49
Natal	Natal	87	252	312	446	1097
	<i>Dermacentor nitens</i>	87	216	209	250	762
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	0	19	13	30	62
	<i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i>	0	17	90	166	273
Leste Potiguar	Parnamirim	0	34	57	51	142
	<i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i>	0	34	57	51	142
	São Gonçalo do Amarante	5	41	47	82	175
	<i>Dermacentor nitens</i>	5	30	39	46	120
	<i>Rhipicephalus microplus</i>	0	11	8	34	53
	<i>Rhipicephalus sanguineus s.l.</i>	0	0	0	2	2
Total por estádio (%)		92 (6,29)	336 (22,97)	442 (30,21)	593 (40,53)	1463 (100,00)

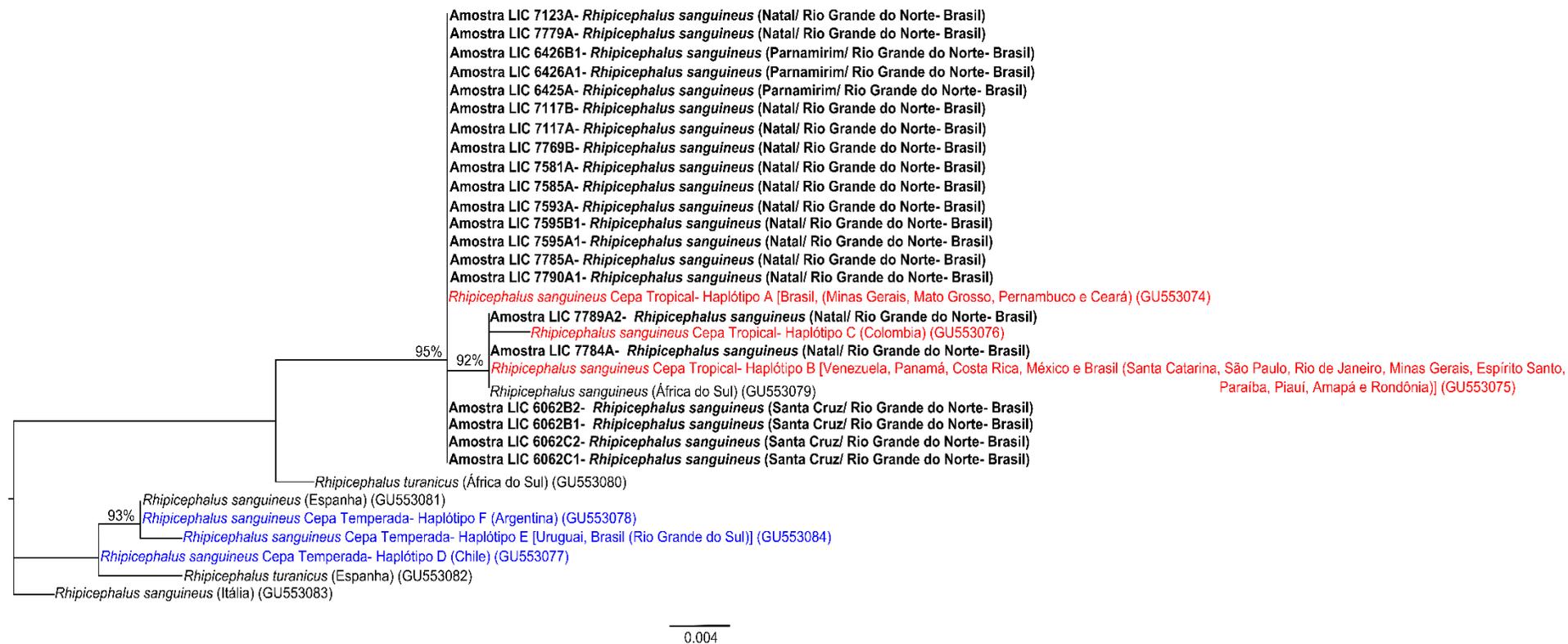
Legenda: L - Larva, N - Ninfa, s.l.- *sensu lato*.

4.2. Identificação e reconstrução filogenética de linhagens de *Rhipicephalus sanguineus*

As sequências obtidas de *R. sanguineus* apresentaram 100% de identidade (359/359) com diversas outras sequências desse ixodídeo disponíveis no “GenBank”(e.g. GU553074, MG793429, KT382448, KR653222, KR909459, KR909459, JX997392, JX997391, JX206981, JX206980, MG651947, MH018802, MF351575, MF351574, MF351572, KX632154, KX793745, KT382446, KP866201, KP830114, KR909458, KC170744, JX416325, JX997388, JX997387, MG651947, MH018824, MH018820, MH018816, MH018809, MH018826, MH018832, MH018836 e MH018841) de diferentes países (e.g. Brasil, Paraguai, Colômbia, Chile, México, Cuba, Polinésia, Estados Unidos, Rússia, Tailândia, África e China).

Na reconstrução filogenética, baseada em dados de análises anteriores (MORAES-FILHO et al., 2011), foi possível observar que todos os exemplares de *R. sanguineus* do Rio Grande do Norte pertencem a linhagem Tropical dessa espécie. Das amostras analisadas desse Estado, 15 exemplares dos municípios de Natal e Parnamirim ficaram no mesmo grupo do Haplótipo A de *R. sanguineus* linhagem Tropical anteriormente identificado para o Brasil (Minas Gerais, Mato Grosso, Pernambuco e Ceará). Uma amostra de Natal (LIC 7789A2) ficou próxima do Haplótipo C de *R. sanguineus* linhagem Tropical identificado previamente na Colômbia e outra amostra do município de Natal (LIC 7784A) agrupou com o Haplótipo B de *R. sanguineus* linhagem Tropical detectado na Venezuela, Panamá, Costa Rica, México e Brasil. As amostras do município de Santa Cruz (Caatinga) formaram um grupo isolado dentro das sequências de *R. sanguineus* linhagem Tropical, não agrupando com nenhum Haplótipo previamente identificado para essa linhagem (Figura 2).

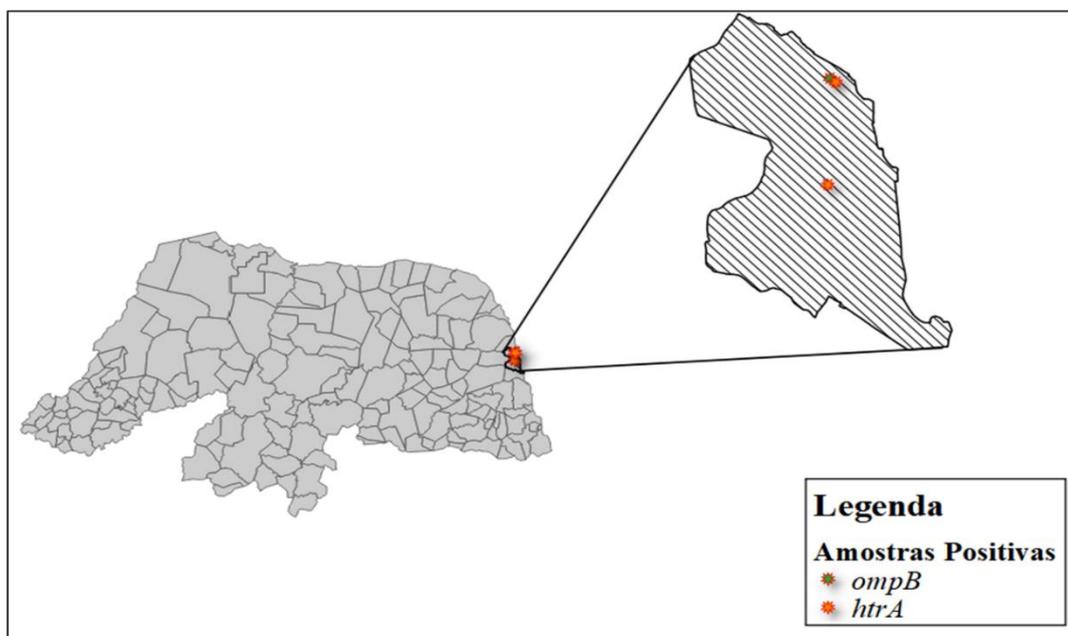
Figura 2. Filogenia de fragmento do gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% “cut-off”).



4.3. Identificação e reconstrução filogenética para *Rickettsia* spp. detectadas nos carrapatos

Das 383 amostras de carrapatos submetidas à pesquisa de riquetsia, foi possível detectar a presença de fragmentos de genes dessa bactéria apenas através da PCR nested (genes *htrA* e *ompB*) em três amostras procedentes do município de Natal: em um macho (LIC 7589A1, detecção de fragmento do gene *htrA*) e em uma fêmea (LIC7761B1, detecção de fragmento do gene *ompB*) de *R. sanguineus* linhagem Tropical, e em um macho de *D. nitens* (LIC7772A2, detecção de fragmento do gene *htrA*) (Figura 3; Tabelas 4 e 5).

Figura 3. Mapa do Rio Grande do Norte, com destaque para o município de Natal, indicando a localização das amostras nas quais foram detectadas a presença de fragmentos dos genes *ompB* e *htrA* de riquetsia. Fonte: Albuquerque, M. P., 2019.



A sequência do fragmento do gene *htrA* do macho de *R. sanguineus* linhagem Tropical apresentou 100% de identidade com *R. felis*, já a fêmea de *R. sanguineus* linhagem Tropical e o macho de *D. nitens* tiveram identidade com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (Tabela 5). Na reconstrução filogenética, essas amostras agruparam com as mesmas espécies e cepas de riquetsias com as quais tiveram identidade (Figura 4).

A frequência de vetores infectados com riquetsia em todos os municípios estudados foi de 0,78% (3/383) e no município detectado foi de 0,96% (3/314). Já a frequência por espécies

segundo o sexo foi de 1,47% (1/68) para macho e fêmea de *R. sanguineus* linhagem Tropical, respectivamente, e 1,72% (1/58) para macho de *D. nitens* (Tabela 5).

Tabela 4. Dados das amostras de carrapatos coletados no Rio Grande do Norte/ Brasil que amplificaram fragmentos de genes de riquetsias e a identificação molecular dessas riquetsias através do BLASTN (“Basic Local Alignment Search Tool Nucleotide”).

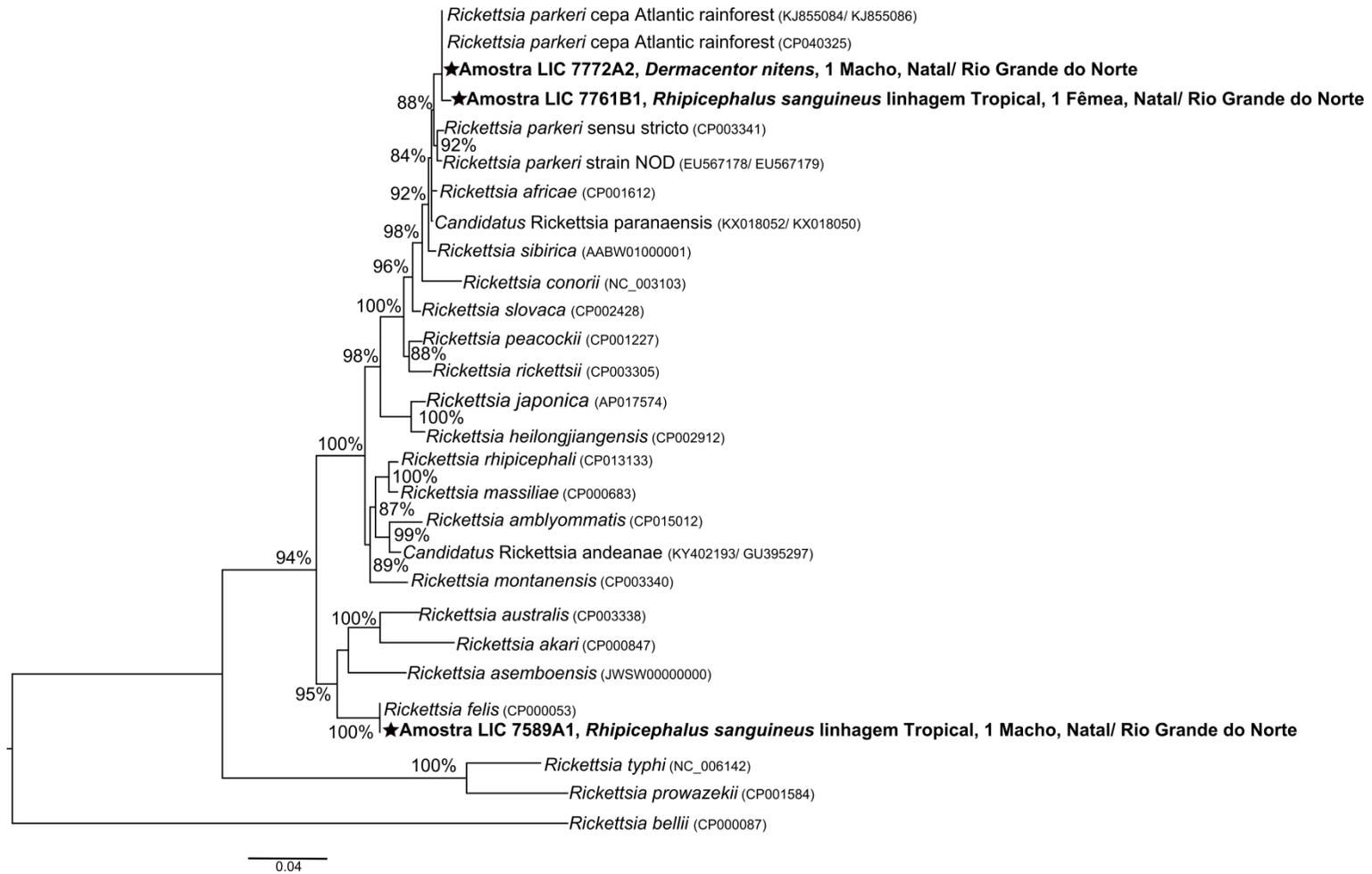
Amostra analisada		Identificação Molecular da riquetsia utilizando o BLASTN para pesquisar no "GenBank"			
Amostras LIC	Identificação	Gene	Espécie identificada	Identidade	Número de Acesso "GenBank"
LIC 7589A1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , 1 Macho	<i>htrA</i>	<i>Rickettsia felis</i>	100% (376/376)	CP000053
LIC 7772A2	<i>Dermacentor nitens</i> , 1 Macho	<i>htrA</i>	<i>Rickettsia parkeri</i> cepa Mata Atlântica	100% (427/427)	KJ855084
LIC 7761B1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> , 1 Fêmea	<i>ompB</i>	<i>Rickettsia parkeri</i> cepa Mata Atlântica	99,51% (403/405)	CP040325

Tabela 5. Espécies de carrapatos detectadas infectadas com riquetsias nos municípios estudados do Estado do Rio Grande do Norte/ Brasil, no período de 2014 a 2016.

Região	Município	Espécie	Estádio	Nº de carrapatos coletados	Nº de carrapatos testados	Amostras Positivas (%)
Agreste Potiguar	Santa Cruz	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> linhagem Tropical	L	-	-	-
			N	9	-	-
			M	26	3	-
			F	14	3	-
			Sub Total	49	6	-
Leste Potiguar	Natal	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> linhagem Tropical	L	-	-	-
			N	17	12	-
			M	90	68	1 (1,47)
			F	166	68	1 (1,47)
			L	-	-	-
			N	19	-	-
			M	13	-	-
			F	30	3	-
			L	87	20	-
			N	216	32	-
	M	209	58	1 (1,72)		
	F	250	53	-		
	Sub Total	1097	314	3 (0,96)		
	Parnamirim	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> linhagem Tropical	L	-	-	-
			N	34	5	-
			M	57	11	-
			F	51	11	-
			Sub Total	142	27	-
	São Gonçalo do Amarante	<i>Rhipicephalus sanguineus</i> linhagem Tropical	L	-	-	-
			N	-	-	-
			M	-	-	-
			F	2	2	-
			L	-	-	-
N			11	-	-	
M			8	3	-	
F			34	6	-	
L			5	-	-	
N			30	6	-	
M	39	9	-			
F	46	10	-			
Sub Total	175	36	-			
Total				1463	383	3 (0,78)

Legenda: L - Larva, N - Ninfa, F - Fêmea, M - Macho.

Figura 4. Filogenia concatenada de fragmentos dos genes *htrA* e *ompB* de riquetsias, detectados em carrapatos coletados durante vigilância da Febre Maculosa no Estado do Rio Grande do Norte/ Brasil, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92+G. Os números nos ramos apontam valores de apoio estatístico (70% “cut-off”). As estrelas (★) indicam sequências obtidas no presente trabalho.



5. DISCUSSÃO

Apesar de estudo prévio ter detectado a presença de fragmentos de genes de riquetsia em carrapatos *R. microplus* do Rio Grande do Norte, tal estudo não identificou as riquetsias presentes nesses ixodídeos (Oliveira et al., 2016b). Portanto, o atual trabalho faz a primeira identificação de espécies de riquetsias em carrapatos no Estado do Rio Grande do Norte, área até então considerada silenciosa para FM.

As espécies de carrapatos identificadas no presente estudo, *D. nitens*, *R. microplus* e *R. sanguineus s. l.*, são as mesmas relatadas por Oliveira e colaboradores (2016) para o Estado durante treinamentos para vigilância de ambiente e investigação de casos de FM. A presença de apenas três espécies de carrapatos, indica que as coletas foram realizadas em determinados hospedeiros e em ambientes próximos a eles, por este motivo observa-se a baixa diversidade de espécies de carrapatos. Vale ressaltar que o esforço de captura empregado entre os municípios podem ser diferentes e, conseqüentemente, o total de espécimes coletados entre regiões analisadas são diferentes.

Tendo em vista que as amostras foram obtidas durante vigilância de ambiente para FM, após um recém treinamento de capacitação técnica em investigação de casos e vigilância de ambiente da FM, observa-se que a vigilância de ambientes no Estado ainda é rudimentar. E, por isso, é de fundamental importância a uniformização e intensificação de diferentes formas e métodos de coleta de ixodídeos em diferentes hospedeiros e ambientes dos locais prováveis de infecção para FM. Dessa forma, ampliaria a diversidade e distribuição da fauna de carrapatos e, conseqüentemente, auxiliaria no entendimento dos ciclos da FM através de análises futuras no Rio Grande do Norte.

Dentre as espécies identificadas no presente estudo, *R. sanguineus s. l.* foi a única espécie coletada em todos os municípios (Tabela 2), isto pode estar atrelado ao fato da coleta ter sido realizada em cães. Também cabe ressaltar, que *R. sanguineus* é o carrapato mais disseminado em cães e possui maior alcance zoogeográfico, se comparado a outras espécies de carrapatos (GUIMARÃES et al., 2001).

No presente estudo, observa-se que não foram encontradas espécies do gênero *Amblyomma* (*A. sculptum*, *A. ovale* e *A. aureolatum*) que são consideradas as principais espécies relacionadas à transmissão de bioagentes da FM. A espécie *A. sculptum* encontra-se distribuída na região Nordeste (Pernambuco, Piauí), Centro Oeste, Sudeste, e no Norte do Paraná (NAVA et al., 2014), parasita preferencialmente equídeos, porém possuem baixa especificidade parasitária. A ausência de *A. sculptum* pode estar relacionado aos métodos de

captura, como também, a baixa especificidade parasitária dessa espécie, já que foram feitas coletas em equinos e nenhum *A. sculptum* foi coletado.

O reconhecimento e a identificação das espécies de potenciais vetores que ocorrem em uma determinada região é importante para o entendimento do seu papel epidemiológico no cenário da saúde pública, pois a competência vetorial pode diferir entre as linhagens de uma mesma espécie. Diante disso, alguns exemplares de *Rhipicephalus sanguineus s. l.* foram submetidos a identificação molecular e foi observado que todos os exemplares coletados no Estado do Rio Grande Norte pertenciam a linhagem Tropical dessa espécie.

As análises filogenéticas para essa espécie de carrapato agruparam as amostras do Rio Grande Norte em clado composto apenas por exemplares da linhagem Tropical desse ixodídeo, Haplótipos A – C (Figura 2). Esse dado corrobora o estudo de MORAES-FILHO e colaboradores (2011), onde foi observado que os exemplares de *R. sanguineus* oriundos da região norte da América do Sul pertenciam a linhagem Tropical desse carrapato (MORAES-FILHO et al., 2011). Alguns estudos correlacionam a dispersão dessas espécies a fatores ambientais e biológicos, onde a ausência de linhagens temperadas em regiões tropicais do Brasil é correlacionada a diapausa apresentada por carrapatos adultos logo após a muda de ninfas; e a ausência das linhagens tropicais nas regiões temperadas do país pode estar relacionada à linhagem tropical não entrar em diapausa, tornando essa linhagem mais sensível aos efeitos letais do inverno nessas regiões (ZEMTSOVA et al., 2016; CAETANO et al., 2017; LABRUNA et al., 2017).

Das amostras de *R. sanguineus* linhagem Tropical analisadas do Rio Grande Norte, a maioria é geneticamente relacionada com o Haplótipo A, mostrando-se próximas a exemplares previamente estudados do Brasil (Minas Gerais, Mato Grosso, Pernambuco e Ceará). Apenas duas amostras agruparam com Haplótipos B (identificado anteriormente na Venezuela, Panamá, Costa Rica, México e Brasil) e com o Haplótipo C (já relatado para Colômbia). Entretanto, as amostras do município de Santa Cruz (bioma Caatinga) não agruparam com nenhum Haplótipo previamente identificado para linhagem Tropical de *R. sanguineus*. Evidenciando, assim, que a diversidade dessa linhagem de carrapato pode ser maior do que previamente relatado (MORAES-FILHO et al., 2011; CAETANO et al., 2016). O que pode ser indicativo que na Caatinga a linhagem Tropical de *R. sanguineus* possui peculiaridades em relação à carrapatos oriundos de área de Mata Atlântica.

A identificação de carrapatos da espécie *R. sanguineus* linhagem Tropical - parasitando cães - infectados por *R. felis* e *R. parkeri* cepa Mata Atlântica é fato inédito no Estado do Rio

Grande do Norte. O mesmo observa-se para o carrapato da espécie *D. nitens*, parasitando asno, infectado por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Vale ressaltar que essas espécies de ixodídeos já foram reportadas parasitando humanos (DANTAS-TORRES et al., 2006; GUGLIELMONE et al., 2006; LOULY et al. 2006, SERRA-FREIRE 2009, 2010, 2014, SERRA-FREIRE et al. 2011 ; SERRA-FREIRE 2012, BORSOI, 2015; MENTZ et al. 2016). Devido suas características biológicas, carrapatos monoxenos (e.g. *D. nitens*) tem sua importância para a manutenção do ciclo enzoótico da FM, já os carrapatos heteroxenos (e.g. *bbR. sanguineus s.l.*) e antropofílicos estão envolvidos na formação de ciclos epidêmicos pela facilidade de transmitir a bactéria entre diferentes hospedeiros. A detecção desses bioagentes da FM em carrapatos antropofílicos, além de demonstrar a circulação de riquetsias do GFM e Grupo Transicional em área de Mata Atlântica no Município de Natal, evidencia a possibilidade de ocorrência de surtos epidêmicos de FM na região.

Alguns estudos reforçam a relação de áreas com expansão urbana e desmatamento na dinâmica epidemiológica de FM (MARTINIANO-MOURA et al., 2014; MONTENEGRO et al., 2017). Nesse sentido, a Mata Atlântica é um dos maiores biomas do Brasil que sofre intensas transformações devido à ação antrópica. O município de Natal exhibe esse perfil, com áreas degradadas e urbanizadas por intensas ações antrópicas. Nesse contexto, o município estudado torna-se um local potencial para ocorrência de casos de FM.

Neste estudo foi possível detectar riquetsias em carrapatos do município de Natal (Figura 4) apenas pelo método de “PCR nested”, que é mais sensível à detecção de cópias do DNA alvo do que a PCR convencional. Evidenciando, assim, que a infecção de ixodídeos por riquetsias no Rio Grande Norte não deve ser alta. De maneira geral, as infecções de carrapatos por riquetsias causam efeitos deletérios aos artrópodes, e isso já foi observado na infecção de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica e *Rickettsia parkeri* cepa NOD nos carrapatos *R. microplus* e *Amblyomma triste* KOCH, 1844, respectivamente (NIERI-BASTOS et al., 2013; CORDEIRO, et al., 2017). Os autores PINTER & LABRUNA (2006) consideraram esse fator primordial para baixa taxa de infecção entre artrópodes, o que reforça a ideia do Estado estudado ser considerado área silenciosa para FM. Entretanto, mesmo não havendo registros de casos confirmados da doença no Rio Grande Norte, a detecção de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica e *R. felis*, bioagentes reconhecidos da FM no Brasil, evidencia o potencial risco da área para ocorrência de casos de FM.

A identificação de *R. sanguineus* linhagem Tropical infectado por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica é um dado relevante já que esse artrópode é comumente observado parasitando cães

domésticos. Esse hospedeiro pode desempenhar um papel importante no ciclo enzoótico da FM, atuando como hospedeiro amplificador de riquetsias (PINTER et al., 2008; SCINACHI, et al. 2016). Além disso, cães possuem contato direto com humanos, podendo levar ectoparasitos de onde caminham para o domicílio, possibilitando um cenário de transmissão de bioagentes da FM para humanos.

Entretanto, em outras regiões de área de Mata Atlântica do Sul, Sudeste e Nordeste do país o carrapato *A. ovale* é relacionado como vetor competente da FM causada por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018). Além disso, outro cenário de transmissão da doença foi relatado no Estado do Rio Grande do Sul, onde foram coletados carrapatos *Amblyomma tigrinum* KOCH, 1844 infectados por *R. parkeri* s.s. com relatos de FM em humanos. Sendo assim, a chance de que um possível ciclo epidêmico de FM em Natal/RN seja distinto do que é conhecido para outras áreas de Mata Atlântica no país não pode ser descartado, visto que nenhum exemplar de *A. ovale*, *A. sculptum* e *A. aureolatum* foram encontrados na região. E ainda, o perfil do município é mais urbanizado do que o cenário conhecido da FM para outras áreas de Mata Atlântica no Brasil, o que poderia favorecer o envolvimento de *R. sanguineus* no ciclo epidêmico da FM. Dessa forma, são necessários mais estudos na região para confirmar a real etiologia dessa riquetsiose e a importância dos potenciais vetores da FM encontrados na região.

Nesse contexto, a detecção molecular de riquetsias patogênicas em potenciais vetores, como *R. sanguineus* e *D. nitens*, apontam a necessidade de manter um sistema de vigilância epidemiológica no local e na região, visto que as espécies detectadas são relevantes para a saúde pública, por serem espécies que parasitam animais com quais o homem possui contato muito próximo, como cães e equinos.

A FM causada por *R. felis* é de ampla ocorrência geográfica, transmitida por pulgas e carrapatos, e com alguns registros em humanos, incluindo no Brasil (RAOUL et al., 2001; REIF, 2009; BLANTON, 2019). Em contrapartida, a FM causada por *R. parkeri* ocorre, predominantemente, em regiões de Mata Atlântica com a veiculação do bioagente a humanos realizado apenas por carrapatos (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; ARMITANO et al., 2019). As manifestações clínicas da FM causada por *R. felis* e *R. parkeri* são similares, apresentando sintomas mais brandos do que os casos da doença acometidos pela bactéria *R. rickettsii*. Entretanto, na região estudada, a história natural sobre a FM causada por *R. felis* e *R. parkeri* ainda é incipiente (REIF, 2009; BLANTON, 2019).

Atualmente, a Nota Técnica Nº 03/2015 SUVIGE/CPS/SESAP-RN esclarece que “as doenças com manifestações exantemáticas de notificação compulsória e/ou imediata são: sarampo, rubéola, dengue e chikungunya, as demais doenças como eritema infeccioso, escarlatina e exantema súbito, entre outras, devem ser notificadas em situações de surtos”. Nesta nota não há menção sobre a FM ser uma doença exantemática, e muito menos é citada como doença de notificação compulsória em até 24 horas. Nesse contexto, os casos de FM poderiam estar sendo subnotificados e/ou não diagnosticados, visto que os sintomas são inespecíficos, o que dificulta a captação dos possíveis registros da doença. Adicionalmente, a existência de arboviroses e doenças exantemáticas mais incidentes na região tornam a capacidade de resposta dos serviços de saúde voltada para essas doenças. Dessa forma, os casos de FM podem passar despercebidos. Portanto, a inclusão da FM entre o escopo das doenças sob a vigilância efetiva em áreas silenciosas como estas, e, a intensificação de atividades rotineiras da vigilância de FM nessas áreas são extremamente necessárias. Assim sendo, o serviço de vigilância epidemiológica ativo e integrado com vigilância ambiental no Rio Grande do Norte são imprescindíveis para entender a história natural da doença no Estado.

Diante dos resultados apresentados neste estudo, a detecção de bactérias patogênicas do GFM (*R. parkeri* cepa Mata Atlântica) e do Grupo Transicional (*R. felis*) no Estado do Rio Grande do Norte são relevantes para saúde pública. Portanto, é imprescindível que a Secretaria de Saúde do Rio Grande Norte investigue a possibilidade de transmissão dos bioagentes detectados bem como a ocorrência de casos de FM no Estado. Mais estudos devem ser realizados para um melhor entendimento do cenário da FM no Rio Grande Norte, incluindo os bioagentes, vetores e reservatórios envolvidos no ciclo epidemiológico das riquetsioses.

6. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo pode-se concluir que:

- ✓ As espécies de carrapatos presentes durante vigilância de ambiente para FM no Rio Grande Norte foram morfológicamente identificadas como: *D. nitens*, *R. microplus* e *R. sanguineus*;
- ✓ Os exemplares de *R. sanguineus* do Rio Grande Norte pertencem a linhagem Tropical;
- ✓ No Rio Grande do Norte, *R. sanguineus* linhagem Tropical possui diversidade genética na Caatinga;
- ✓ Riquétsias patogênicas foram detectadas em carrapatos do Rio Grande do Norte.
- ✓ *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica foi detectada pela primeira vez, em *R. sanguineus* linhagem Tropical e em *D. nitens*, no Rio Grande do Norte;
- ✓ *Rickettsia felis* foi detectada pela primeira vez em *R. sanguineus* linhagem Tropical, no Rio Grande Norte;
- ✓ Há possibilidade de ocorrência do ciclo epidêmico da FM em Natal, Rio Grande Norte, porém mais estudos são necessários para entender o cenário da FM no Estado.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE, AAR et al. New records of ticks- associated spotted fever group Rickettsia in Amazon-Savannah ecotone, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, 2018, 9 (4): 1038-44.
- ALJANABI, SM; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- AMORIM, M et al. Morphological description of tick larval stage (Acari: Ixodidae) *Anocentor nitens* (Neumann.1897). **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v.6, p.143-156, 1997.
- ANISIMOVA, M; GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. **Systematic Biology**, v. 55, n. 4, p. 539-552, 2006.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de Ixodologia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-129, 1961.
- ARMITANO, RI et al. Fiebre manchada en Argentina. Descripción de dos casos clínicos. **Revista Argentina de Microbiología**, 2019.
- BARROS-BATTESTI, DM et al. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 2006.
- BLANTON, LS. The Rickettsioses: A Practical Update. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 213-229, 2019.
- BRASIL. GOVERNO DO ESTADO DO RIO GRANDE. SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE PÚBLICA. Assunto: Síndrome exatêmica a esclarecer. Nota Técnica Nº 03/2015 SUVIGE/CPS/SESAP-RN, 2015. Disponível em: <http://adcon.rn.gov.br/ACERVO/sesap/DOC/DOC00000000073554.PDF>>. Acesso em: 02 de Jun de 2019.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Febre maculosa brasileira e outras riquetsioses. **Guia de vigilância em saúde: volume único**, p. 445-455, 2017.s

BRASIL. SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO. Inventário Florestal Nacional: principais resultados: Rio Grande do Norte. Brasília, DF: MMA, 2018. 64 p. (Série Relatórios Técnicos - IFN). Disponível em: <http://www.florestal.gov.br/documentos/informacoes-florestais/inventario-florestal-nacional-ifn/resultados-ifn/3991-resultados-ifn-rn-2018/file>>. Acesso em: 02 de Jun de 2019.

BORSOI, ABP. Investigação sobre espécies de Ixodida em interação trófica com humanos no Município de Belford Roxo, Rio de Janeiro. Dissertação de Mestrado. 2015.

CAETANO, RL et al. Ultrastructural morphology and molecular analyses of tropical and temperate “species” of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 54, n. 5, p. 1201-1212, 2017.

CAMARGO-NEVES, VLF et al. Manual de vigilância acarológica. In: **Manual de vigilância acarológica**. 2004.

CARDOSO, LD et al. Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.

CHOI, YJ et al. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. **Emerging infectious diseases**, v. 11, n. 2, p. 237, 2005.

CORDEIRO, MDs et al. Experimental infection of *Rickettsia parkeri* in the *Rhipicephalus microplus* tick. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 1, p. 93-96, 2018.

DANTAS-TORRES, F et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

- DANTAS-TORRES, F et al. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 14, p. 30-46, 2009.
- DANTAS-TORRES, F et al. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2019.
- FACCINI-MARTÍNEZ, AA. et al. Febre maculosa por *Rickettsia parkeri* no Brasil: Conduas de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 299-312, 2018.
- GALVÃO, MA et al. *Rickettsia felis* in the Americas. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078: 156–158. 2006.
- GUGLIELMONE, A.A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental Applied Acarology**, n.40, p.83-100, 2006.
- GUINDON, S et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.
- GOUY, M et al. Sea View version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2009.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<https://cidades.ibge.gov.br/brasil/rn/panorama>>. Acesso em: 02 de Jun de 2019.
- LABRUNA, MB et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004a.
- LABRUNA, MB et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004b.

- LABRUNA, MB. et al. Ecology of rickettsia in South America. **Ann NY Acad Sci**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.
- LEIBY, DA.; GILL, JE. Transfusion-transmitted tick-borne infections: a cornucopia of threats. **Transfusion medicine reviews**, v. 18, n. 4, p. 293-306, 2004.
- LOULY, CCB et al. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.
- MANGOLD, AJ et al. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1998.
- MARTINS, MEP; SOUSA-MARTINS, KC. Riquetsioses (*Rickettsia* spp.) transmitidas por carrapatos. **Encicl. Biosf**, v. 10, n. 18, p. 2735-56, 2014.
- MEIRA, AM et al. Febre maculosa: dinâmica da doença, hospedeiros e vetores. **ESALQ/USP**. 2013.
- MENTZ, Marcia Bohrer et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) biting a human being in Porto Alegre city, Rio Grande do Sul, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, 2016.
- MONTENEGRO, DC et al. Spotted fever: epidemiology and vector-rickettsia-host relationship in Rio de Janeiro state. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 505, 2017.
- MORAES-FILHO, J et al. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **Acta tropica**, v. 117, n. 1, p. 51-55, 2011.
- MOURA, NO. Detecção e caracterização molecular de riquetsias em potenciais vetores procedentes de focos ativos de febre maculosa do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2011.

- MOURA-MARTINIANO, NO et al. Rickettsia and vector biodiversity of spotted fever focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 498, 2014.
- NAVA, S et al. Ticks of the southern cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance. **Academic Press**, 2017.
- NAVA, S et al. *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806): neotype designation, morphological re-description of all parasitic stages and molecular characterization. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 6, p. 1573-1585, 2018.
- NIERI-BASTOS, FA et al. Comparative evaluation of infected and noninfected *Amblyomma triste* ticks with *Rickettsia parkeri*, the agent of an emerging rickettsiosis in the new world. **BioMed research international**, v. 2013, 2013.
- OLIVEIRA, RP et al. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 317, 2002.
- OLIVEIRA, SV et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 22, 2016a.
- OLIVEIRA, SV et al. Vigilância de ambientes da febre maculosa: explorando as áreas silenciosas do Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 7, n. 3, p. 65-72. 2016b.
- PAROLA, P et al. Atualização sobre rickettsioses transmitidas por carrapatos em todo o mundo: uma abordagem geográfica. *Clinical microbiology reviews* , v. 26, n. 4, p. 657-702, 2013.
- PAROLA, P; PADDOCK, CD.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.
- PAROLA, P; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical infectious diseases**, v. 32, n. 6, p. 897-928, 2001.

- PINTER, A et al. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.
- PINTER A et al. Febre Maculosa Brasileira. **Bol. Epidemiol. Paulista**, 8, 1-30, 2011.
- PINTER, A et al. A Febre maculosa brasileira na região Metropolitana de São Paulo. **Bol. Epidemiol. Paulista**, v. 13, p. 1-45, 2016.
- PINTER, A; LABRUNA, MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 523-529, 2006.
- RAMOS, VN et al. Ticks on humans in the Pantanal wetlands, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 5, p. 497-499, 2014.
- RAOULT, D et al. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. **Emerging infectious diseases**, v. 7, n. 1, p. 73, 2001.
- REIF, K et al. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. **Journal of medical entomology**, v. 46, n. 4, p. 723-736, 2009.
- REGNERY, RL et al. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.
- ROUX, V et al. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 252-261, 1997.
- ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, n. 4, p. 1449-1455, 2000.

- SAMBROOK, J et al. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- SCINACHI, CA et al. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta tropica**, v. 166, p. 225-233, 2017.
- SEKEYOVA, Z et al. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 51, n. 4, p. 1353-1360, 2001.
- SERRA-FREIRE, NM. Parasitismo humano por carrapatos: a necessidade de transformação do paradigma diagnóstico. **Revista Vetores & Pragas**, v. 12, n. 22, p. 23-27, 2009.
- SERRA-FREIRE, Nicolau Maués. Occurrence of ticks (Acari: Ixodidae) on human hosts, in three municipalities in the State of Pará, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p. 141-147, 2010.
- SERRA-FREIRE, et al. Parasitismo humano por carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 4, n. 2, p. 69-72, 2011.
- SERRA-FREIRE, NM; BORSOI, ABP. Relações parasitárias entre humanos e carrapatos no município de Volta Redonda, Estado do Rio de Janeiro. **Revista Uniabeu**, v. 5, n. 11, p. 306-317, 2012.
- SILVA, AB et al. *Rickettsia amblyommatis* infecting *Amblyomma pseudoconcolor* in area of new focus of spotted fever in northeast Brazil. **Acta Tropica**, 2018, 182: 305-8.
- SILVA, AB et al. First report of a *Rickettsia asembonensis* related infecting fleas in Brazil. **Acta Tropica**, v.566, n.172, p.44-9, 2017.
- SPOLIDORIO, MG et al. "Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging infectious diseases** vol. 16,3: 521-3, 2010.

SZABÓ, MPJ *et al.* Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 3, p. 27, 2013.

TAMURA, K *et al.* MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.

THOMPSON, J *et al.* CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**. 22: 4673-90, 1994.

WALKER, DH. Rickettsiae and Rickettsial Infections: The Current State of Knowledge, **Clinical Infectious Diseases**, Volume 45, Issue Supplement_1, Pages S39–S44, 2007.

WEBB, L. *et al.* Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 3, p. 530-534, 1990.

YUNKER, CE *et al.* *Dermacentor* ticks (Acari: Ixodoidea: Ixodidae) of the New World: a scanning electron microscope atlas. **Proceedings of the Entomological Society of Washington (USA)**, 1986.

ZEMTSOVA, GE *et al.* Phylogeography of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato and its relationships with climatic factors. **Experimental and Applied Acarology**, v. 69, n. 2, p. 191-203, 2016.