

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

DISSERTAÇÃO

LEVANTAMENTO MOLECULAR DE
***Mycobacterium leprae* E *Rickettsia* spp. EM**
GÊNERO *Amblyomma* spp. ASSOCIADOS A
TATUS (*Euphractus sexcinctus* e *Priodontes*
***maximus*) NO BRASIL**

Keity Kelly Vianna Benetti

2023



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

**LEVANTAMENTO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* E *Rickettsia*
spp. EM *Amblyomma* spp. ASSOCIADOS A TATUS (*Euphractus*
sexcinctus e *Priodontes maximus*) NO BRASIL**

KEITY KELLY VIANNA BENETTI

Sob a orientação do Professor
Douglas McIntosh

Dissertação submetida como requisito
parcial para obtenção do grau **de**
Mestre em Ciências, no curso de Pós-
Graduação em Ciências Veterinárias.

Seropédica, RJ
Agosto de 2023

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

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

B4611 Benetti, Keity Kelly Vianna, 05/05/1995-
LEVANTAMENTO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* E
Rickettsia spp. EM GÊNERO *Amblyomma* spp. ASSOCIADOS A
TATUS (*Euphractus sexcinctus* e *Priodontes maximus*) NO
BRASIL / Keity Kelly Vianna Benetti. - Rio de
Janeiro, 2023.
96 f.: il.

Orientador: Douglas McIntosh.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós Graduação em
Ciências Veterinárias , 2023.

1. Biologia molecular. 2. *Rickettsia*. 3. PCR-RFLP
. I. McIntosh, Douglas, 1964-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias
III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



ATA Nº 3960/2023 - PPGCV (12.28.01.00.00.00.50)

Nº do Protocolo: 23083.065205/2023-68

Seropédica-RJ, 27 de setembro de 2023.

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

KEITY KELLY VIANNA BENETTI

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre(a) em Ciências**, no Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 27/09/2023

(Assinado digitalmente em 27/09/2023 15:40)

DOUGLAS MCINTOSH
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DeptPA (12.28.01.00.00.00.55)
Matricula: ###549#3

(Assinado digitalmente em 19/10/2023 12:14)

HERMES RIBEIRO LUZ
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.417-##

(Assinado digitalmente em 27/09/2023 15:53)

GILBERTO SALLES GAZETA
ASSINANTE EXTERNO
CPF: ###.###.766-##

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrrj.br/public/documentos/index.jsp> informando seu número: **3960**, ano: **2023**, tipo: **ATA**, data de emissão: **27/09/2023** e o código de verificação: **78051e8a5a**

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, pois sem ele nada seria possível. Por me ajudar mesmo nos momentos em que não via saída, quando estava cansada demais para continuar e achei que estava tudo perdido. Por me conceder força, coragem, graça e saúde pra chegar até onde estou hoje.

Ao meu pai, **José Luiz**, que esteve presente em todos os momentos da minha vida, principalmente quando mais precisei, me ajudando e guiando. A pessoa que mais me ajudou nesses dois anos de mestrado de todas as formas possíveis. A minha mãe, **Mônica** (*in memorian*), que faleceu um mês antes da minha jornada no mestrado, apesar de não ter participado fisicamente durante esses anos, sempre foi um exemplo de força, coragem, determinação e bondade, demonstrando carinho e ofertando sua vida para os que estavam em sua volta.

A **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, que se fez meu lar ao longo da graduação em medicina veterinária e durante o mestrado. Sempre sendo uma fonte de esperança e a realização de um sonho.

Ao meu orientador, professor **Douglas McIntosh** pela eximia orientação ao longo desses 2 anos de trabalho no laboratório LBIOMOL, pela imensa dedicação à pesquisa e ciência, sempre nos estimulando a sermos alunos e profissionais melhores. Pelo paciência, compreensão e dedicação dedicadas a mim e meus colegas.

Ao professor **João Horácio Faccini** e Dr. **Thiago Martins** pela realização da identificação morfológica dos carrapatos, que possibilitaram o início do presente estudo.

Aos companheiros de laboratório **Lucas Aguiar** e **Tássia Furtado**, pela companhia ao longo do tempo de laboratório e auxílio na confecção dos géis apresentados no presente trabalho.

Aos membros da banca **Claudia Bezerra**, **Katia Famadas**, **Hermes Luz** e **Gilberto Gazeta**.

A todos os meus familiares, **irmãs, avós, sobrinhos, cunhados e tias**, que estiveram sempre me apoiando e criando uma base sólida de amor, companheirismo e dedicação. Por perdoarem a minha ausência e distância durante esse período e, ainda assim, sempre presentes e solícitos.

À minha afilhada e sobrinha, **Emmanuelle**, que apesar de tão jovem se torna a cada dia um exemplo de ser humano, carinho e bondade. Agradeço por todos os anos de amor, companheirismo e amizade, por me fazer querer a cada dia ser alguém e um exemplo melhor. Por me ensinar tantas coisas apesar de tão pouca idade, principalmente que o amor vem nas menores embalagens.

A todos os meus amigos, **Matheus Assis**, **Giovanna Maria**, **João Marcos**, **Letícia Lima**, **Matheus de Souza**, **Roxanne Marina**, **Ricardo Guedes**, que apesar da distância e minha ausência, nunca deixaram de estar ao meu lado, apoiando e estando ao meu lado em cada momento dessa e de muitas outras fases da minha vida.

Um agradecimento em especial a minha amiga, **Lívia Fernandes**, um exemplo de mulher, amiga, profissional e companheira. Agradeço pelos longos anos de amizade e companheirismo, que desde muito nova esteve comigo em todos os momentos da minha vida, servindo como alicerce nos momentos difíceis, com palavras amigas ou apenas um abraço.

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

“Algumas vezes, procuramos por algumas coisas e encontramos outras.”
How I met your mother

RESUMO

BENETTI, Keity Kelly Vianna. **LEVANTAMENTO MOLECULAR DE *Mycobacterium leprae* E *Rickettsia* spp. EM *Amblyomma* spp. ASSOCIADOS A TATUS (*Euphractus sexcinctus* e *Priodontes maximus*) NO BRASIL.** 2023. 126p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

A descoberta da transmissão zoonótica do *Mycobacterium leprae* por tatus-galinha (*Dasyus novemcinctus*) nos Estados Unidos da América (EUA) desafiou as perspectivas de erradicação da lepra, e as evidências estão se acumulando para apoiar um papel semelhante para os tatus brasileiros, incluindo *D. novemcinctus* e o tatu peba (*Euphractus sexcinctus*). Associações entre carrapatos do gênero *Amblyomma* e diversas espécies de tatu foram registradas no Brasil. Porém, poucos estudos investigaram a possível infecção de carrapatos associados a tatus por bactérias do gênero *Rickettsia* e nenhum avaliou a presença de *M. leprae*. A justificativa para realizar tais investigações é fornecida por dados recentes que implicam *Rickettsia amblyommatis*, infectando *Amblyomma pseudoconcolor* (recuperado de *E. sexcinctus*), como o provável agente etiológico de um surto de febre maculosa em Pernambuco (PE), e pela observação de que, após infecção de fêmeas adultas de carrapatos *Amblyomma sculptum* por meio de alimentação artificial, as células de *M. leprae* persistiram no intestino médio e puderam ser detectadas nos ovários dos carrapatos. Além disso, as bactérias foram detectadas na progênie (ovos e larvas), sugerindo um papel dos carrapatos como reservatórios e/ou vetores do *M. leprae*. O presente projeto examinou 30 carrapatos recuperados de espécimes de *E. sexcinctus*, sabidamente infectados por *M. leprae*, coletados no Rio Grande do Norte (RN) e mais 44 carrapatos coletados de tatus gigantes (*Priodontes maximus*), no Mato Grosso do Sul (MS). Os carrapatos do RN foram identificados como *Amblyomma auricularium* (14 ninfas e 16 adultos), com base no sequenciamento do 16S rDNA e caracteres morfológicos, e amostras do MS foram identificadas como *Amblyomma sculptum* (41 adultos e 3 ninfas). O DNA foi extraído de carrapatos por homogeneização usando um aparelho “bead-beater”, seguido de purificação com fenol e clorofórmio. O DNA foi examinado em uma bateria de ensaios de reação em cadeia da polimerase (PCR), projetada para amplificar sequências de DNA de carrapatos (16S rDNA, COI e ITS2) e sequências presentes em *Rickettsia* (*htrA*, *ompA*, *ompB*, *sca1*, *sca2*, *sca9*, *sca14*, *atpA* e *coxA*). Além disso, dois ensaios utilizaram a sequência RLEP do *M. leprae* como alvo. Nenhuma evidência foi encontrada da presença de DNA de *M. leprae* em nenhum dos 74 carrapatos examinados. Da mesma forma, não houve evidência da presença de DNA de *Rickettsia* nos carrapatos *A. sculptum* (n=44). Em contraste, 24/30 *A. auricularium* foram infectados com pelo menos uma espécie de *Rickettsia* com base em dados gerados por polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição de PCR (PCR-RFLP) e confirmados por sequenciamento de nucleotídeos. Um total de 13 (44,3%) amostras foram classificadas como coinfectadas com *R. amblyommatis* e *R. bellii*, e um único carrapato (3,33%) foi designado como coinfectado com *Rickettsia parkeri* (baseado apenas em PCR-RFLP dados) e *R. bellii*. Oito carrapatos (26,6%) foram infectados somente com *R. bellii* e as duas amostras restantes foram classificadas como infectadas com *R. amblyommatis*. A análise da sequência dos “amplicons” *ompA* mostrou que as cepas de *R. amblyommatis* eram idênticas entre si e a análise BLASTn mostrou que elas tinham 100% de similaridade de nucleotídeos com sequências *ompA* derivadas de cepas de *R. amblyommatis* identificadas em carrapatos *A. auricularium* e *A. pseudoconcolor* recuperado de espécimes de *E. sexcinctus* em Pernambuco. A ausência de níveis detectáveis de DNA de *M. leprae*, em *A. auricularium* recuperado de espécimes de *E. sexcinctus* naturalmente infectados com o patógeno, indicou que a transmissão de *M. leprae* a humanos através de carrapatos é improvável. A detecção de *A. auricularium* infectado com *R. amblyommatis* e *R. bellii* confirma observações anteriores. Entretanto, a detecção de espécimes coinfectados foi inédita para esta espécie de carrapato. Os sistemas PCR-RFLP utilizados forneceram uma abordagem alternativa, rápida e econômica (em relação às estratégias baseadas em sequenciamento ou PCR em tempo real) para avaliar coinfeções, um fenômeno potencialmente significativo que provavelmente permanece subestimado.

Palavras chave: Biologia molecular, acarologia, PCR-RFLP, hanseníase, *Rickettsia*

ABSTRACT

BENETTI, Keity Kelly Vianna. **MOLECULAR SURVEY OF *Mycobacterium leprae* E *Rickettsia* spp. IN TICKS OF THE GENUS *Amblyomma* spp. ASSOCIATED WITH ARMADILLOS (*Euphractus sexcinctus* and *Priodontes maximus*) IN BRASIL.** 2023. 126p. Thesis (Master of Sciences in Veterinary Science). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2023.

The discovery of zoonotic transmission of *Mycobacterium leprae* by nine-banded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in the United States of America (USA) has challenged the prospects for eradication of leprosy, and evidence is cumulating to support a similar role for Brazilian armadillos including *D. novemcinctus* and the six-banded armadillo (*Euphractus sexcinctus*). Associations between ticks of the genus *Amblyomma* and various species of armadillo have been recorded in Brazil. Yet, few studies investigated the possible infection of ticks associated with armadillos for bacteria of the genus *Rickettsia* and none evaluated the presence of *M. leprae*. Justification to perform such investigations is provided by recent data implicating *Rickettsia amblyommatis*, infecting *Amblyomma pseudoconcolor* (recovered from *E. sexcinctus*), as the probable etiologic agent of a spotted fever outbreak in Pernambuco (PE), and by the observation that, after infection of adult female *A. sculptum* ticks via artificial feeding, *M. leprae* cells persisted in the midgut and could be detected in the ovaries of the ticks. In addition, the bacteria were detected in the progeny (eggs and larvae), suggesting a role for ticks as reservoirs and/or vectors of *M. leprae*. The current project examined 30 ticks recovered from specimens of *E. sexcinctus*, known to be infected with *M. leprae*, collected in Rio Grande do Norte (RN) and an additional 44 ticks collected from giant Armadillos (*Priodontes maximus*), in Mato Grosso do Sul (MS). Ticks from RN were identified as *Amblyomma auricularium* (14 nymphs and 16 adults), based on sequencing of 16SrDNA and morphological characters, and samples from MS were identified as *Amblyomma sculptum* (41 adults and 3 nymphs). DNA was extracted from ticks by homogenization using a bead-beater apparatus, followed by phenol chloroform purification. DNA was examined in a battery of polymerase chain reaction (PCR) assays, designed to amplify tick DNA sequences (16SrDNA, COI and ITS2) and sequences present in *Rickettsia* (*htrA*, *ompA*, *ompB*, *sca1*, *sca2*, *sca9*, *sca14*, *atpA* and *coxA*). In addition, two assays used the RLEP sequence of *M. leprae* as target. No evidence was found for the presence of *M. leprae* DNA in any of the 74 ticks examined. Similarly, there was no evidence for the presence of *Rickettsia* DNA in the *A. sculptum* ticks (n=44). In contrast, 24/30 *A. auricularium* ticks were infected with at least one species of *Rickettsia* based on data generated by PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and confirmed by nucleotide sequencing. A total of 13 (44,3%) samples were classified as coinfecting with *R. Amblyommatis* and *R. belli*, a single tick (3,33%) was designated as co-infected with *Rickettsia parkeri* (based solely on PCR-RFLP data) and *R. bellii*, 8 ticks (26,6 %) were infected solely with *R. bellii* and the two remaining samples were classified as infected with *R. amblyommatis*. Sequence analysis of *ompA* “amplicons” showed the *R. amblyommatis* strains to be identical to each other and BLASTn analysis showed them to have 100% nucleotide similarity with *ompA* sequences derived from strains of *R. amblyommatis* identified in *A. auricularium* and *A. pseudoconcolor* ticks recovered from specimens of *E. sexcinctus* in Pernambuco. The absence of detectable levels of *M. leprae* DNA, in *A. auricularium* recovered from specimens of *E. sexcinctus* naturally infected with the pathogen, indicated that transmission of *M. leprae* to humans via ticks is improbable. The detection of *A. auricularium* infected with *R. amblyommatis* and *R. bellii* confirms previous observations. However, the detection of co-infected specimens was inedited for this species of tick. The PCR-RFLP systems used herein provided an alternative, rapid and cost-efficient (relative to strategies based on sequencing or real-time PCR), approach to evaluate co-infections (a potentially significant phenomenon) that has most likely been underestimated to date.

Keywords: Molecular biology, acarology, PCR-RFLP, leprosy, *Rickettsia*

LISTA DE ABREVIações, SIGLAS E SÍMBOLOS

°C - Graus Celsius
μg - Micrograma
μl - Microlitro
μM - Micromolar
AG - Grupo Ancestral ou “Ancestral Group”
BARR - Bacilo Álcool Ácido Resistente
BB - Borderline
BG - Grupo Bellii
BL - Borderline lepromatosa
BT - Borderline tuberculoide
cm - Centímetro
CG - Grupo Canadensis
COI - Citocromo C Oxidase I
dDNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados
DNA - Ácido desoxirribonucleico ou “Deoxyribonucleic Acid”
DPA - Departamento de Parasitologia Animal
EDTA - Ácido etileno diamino-tetra-acético
h - Hora
htrA - Antígeno de membrana externa 17-kDa
H₂O - Água
ITS2 - Espaçador interno transcrito do DNA ribossomal nuclear 2
LBIOMOL - Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular
LL - Lepromatosa
MB - Multibacilares
Mg - Miligrama
MgCl₂ - Cloreto de Magnésio
Min - Minuto
mL – Mililitro
ms - Milisegundos
MS - Mato Grosso do Sul
ompA - Proteína de membrana externa A 190-kDa
ompB - Proteína de membrana externa B 135-kDa
OMS - Organização Mundial de Saúde
pb - Pares de base
PB - Paucibacilar
PCR - Reação em Cadeia de Polimerases ou “Polymerase Chain Reaction”
PCR-RFLP - Reação em Cadeia de Polimerases-Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição ou “Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism”
rDNA - DNA ribossomal ou “Ribossomal DNA”
RN – Rio Grande do Norte
s - Segundo
Sca - Antígeno celular de superfície
GFM - Grupo Febre Maculosa ou “Spotted Fever Group”
TAE - Tris-Acetato EDTA
TBE - Tris-Borato EDTA
TG – Grupo Tifo
TRG - Grupo Transicional ou “Transitional Group”

TT - Tuberculoide

U - Unidade

UFRRJ - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

v - voltagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de tatus por código, sexo, local e data de coleta e dos carrapatos recuperados (Estagio de vida e composição de armazenamento) de exemplares <i>E. sexcinctus</i> coletados em Mossoró, Rio Grande do Norte.	19
Tabela 2. Carrapatos coletados de Tatus da espécie <i>Priodontes maximus</i> do projeto Tatu-canastra durante inspeção no município de Baía das Pedras, Mato Grosso do Sul, fixados em etanol.	20
Tabela 3. Primers específicos para cada alvo, mistura para PCR e condições do ciclo de amplificação da PCR utilizando os amplificadores para carrapatos 16S rDNA mitocondrial, COI mtDNA mitocondrial e ITS2.	25
Tabela 4. Alvos para identificação de <i>Rickettsia</i> spp. e seus respectivos tamanhos de amplicons, primers, mistura para PCR e referências.....	26
Tabela 5. Primers espécie-específico para <i>M. leprae</i> , mistura para PCR e condições do ciclo de amplificação da PCR utilizando os amplificadores para usando alvos RLEP e RLEP nested.	29
Tabela 6. Exemplificação de esquema de classificação de intensidade de bandas em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x) para diferenciar os amplicons gerados a partir de PCRs.....	31
Tabela 7. Alvo molecular específico para carrapatos, com suas endonucleases de restrição e seus respectivos tamanhos de fragmentos de DNA esperados.	32
Tabela 8. Alvo molecular específico para <i>Rickettsia</i> spp., com suas endonucleases de restrição e seus respectivos tamanhos de fragmentos de DNA esperados.	32
Tabela 9. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras identificadas morfologicamente como <i>A. auricularium</i> em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5X). *Amostras fixadas em formol; a= DNA gerado na primeira extração; b= DNA gerado na segunda extração.....	33
Tabela 10. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras de <i>A. auricularium</i> para identificação de espécies de <i>Rickettsia</i> spp. com alvo <i>htrA</i> em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5X). *Amostras fixadas em formol; a= DNA gerado na primeira extração; b= DNA gerado na segunda extração.....	37
Tabela 11. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras de <i>A. auricularium</i> usando alvo espécie-específico para <i>R. bellii</i> em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x). *Amostras fixadas em formol; a= DNA gerado na primeira extração; b= DNA gerado na segunda extração.	38
Tabela 12. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras de <i>Amblyomma auricularium</i> para identificação de <i>Rickettsia</i> spp. do grupo GFM em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x). Amostras fixadas em formol; a= DNA gerado na primeira extração; b= DNA gerado na segunda extração.	44
Tabela 13. Detecção e identificação de <i>Rickettsia</i> do GFM infectando <i>A. auricularium</i> com base na análise PCR-RFLP de amplicons (357 pb) de <i>ompA</i> *=carrapatos classificados como infectados apenas com uma espécie indeterminada de <i>Rickettsia</i> GFM; **= carrapatos classificados como coinfectados com espécie indeterminada de <i>Rickettsia</i> do GFM e com <i>R. bellii</i>	45
Tabela 14. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras de <i>A. sculptum</i> para os alvos COI e ITS2 em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x).	47
Tabela 15. Dados comparativos de amplificação para o gene COI, <i>ompA</i> e <i>Sca9</i> das duas extrações realizadas no DNA dos carrapatos em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x). *Amostras fixadas em formol; ** DNA da terceira extração para essa amostra.....	53

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Pintura rupestre que retrata a atividade de caça de tatus, onde a figura retrata um humano capturando um tatu *Pampatherium sp.*, considerado tatu gigante – Toca do Boqueirão da Pedra Furada – PNSC. Fonte: Acervo FUMDHAM.....8
- Figura 2.** Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo utilizado para exemplificar o método de análise da intensidade de bandas, usando como exemplo amostras de DNA de espécies de *Rickettsia*. Para controles foram usadas amostras de *Rickettsia monteiroi* em diluição seriada onde é possível ver a redução da intensidade das bandas de acordo com o aumento da diluição, gerando um padrão degradê. C1= Banda de alta intensidade, caracterizada com “+++”; C2= Banda de intensidade moderada, caracterizada como “++”; C3= Banda de intensidade fraca, caracterizada como “+”. N1 e N2= Sem amplicon, sendo caracterizado como “-“.....30
- Figura 3.** Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador COI (COI forward/COI reverse – 709 pb) usando DNA extraído de carrapatos preservados em formalina ou em RNALater. 1=TC1; 2=TC2; 3=TC3; 4=TC4; 5=TC5; 6=TC6; 7=TC7; 8=TC8; 9=TC9; 10=TC10; 11=TC11; 12=TC12; 13=TC19; 14=TC24; 15=TC28; 16=TC30; 17 e 18= *A. sculptum* (controle de extração em RNALater); 19 e 20= *T. pretiosum*; 21=Ninfa reextraída (TC27b); 22= TC27a (DNA da primeira extração diluída 1:10); C1= *A. romarioi* (diluído 1:100); C2= *A. romarioi* (diluído 1:50); L=100pb ladder. Amostras 1 a 9 preservadas em formalina e 10 a 16 em RNALater, mostrando a diferença na conservação do material pelos diferentes métodos de fixação.34
- Figura 4.** Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição de *DraI* em fragmentos de 16S (16S forward/16S reverse – 407pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus. 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC29. C= *A. auricularium*; L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).35
- Figura 5.** Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *MboI* em fragmentos de COI (COI forward/COI reverse – 709 pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC29 e C= *A. auricularium*; L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).36
- Figura 6.** Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *MspI* em fragmentos de *htrA* (*htrA* forward/*htrA* reverse – 548 pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus. 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC29. C1 e C2= *R. bellii*; C3 e C4= *R. amblyommatis*; L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)..38
- Figura 7.** Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *AluI* em fragmentos de *Sca9* (*Sca9* forward/*Sca9* reverse – 727 pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus usando como medidor um GeneRuler 50 bp

DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC27; 14=TC29. C1 controle positivos de *R. bellii*. Todas as amostras tiveram perfil compatível com *R. bellii*, apresentando um perfil de bandas compatível com o esperado, sendo esse 396bp, 185bp, 82bp.40

Figura 8. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *EcoRV* em fragmentos de *Sca14* (*Sca14* forward/*Sca14* reverse – 724 pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus usando como medidor um GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=TC20; 2=TC21; 3= TC22; 4=TC23; 5=TC25; 6=TC26; 7=TC27; 8=TC2; 9=TC4; 10=TC9; 11=TC10; 12=TC12; C1 controle positivos de *R. bellii*; C2= Controle positivo de *R. amblyommatis* (amplicon integro). Todas as amostras tiveram perfil compatível com *R. bellii*, apresentando um perfil de bandas compatível com o esperado, sendo esse 532pb e 192pb.40

Figura 9. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *AluI* em fragmentos de *Sca2* (*Sca2* forward/*Sca2* reverse – 764pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus usando como medidor um GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC27; 14=TC29. C1 controle positivos de *R. bellii*. As amostras apresentaram um perfil diferente do esperado e diferente do padrão de bandas observado no DNA controle, onde esperava-se um perfil de 410pb; 187pb; 105pb.....41

Figura 10. Tabela de Variância, comparando as bases do amplicon sca2 (detectado em carrapatos *A. auricularium* infectados com *R. bellii*) com sequências depositadas no GeBank como sca2 derivadas de quatro cepas de *R. bellii*. A coluna 1 fornece o número de bases e a identificação das bases na nova sequência. A coluna 2 forneceu detalhes do número de sequências que compartilham a mesma variação em uma base específica. A coluna A = nova sequência de sca2, coluna B = CP000087, C= AY355372 D= AY970506 e E= CP015010...42

Figura 11. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *PstI* em fragmentos de *OmpA dog* (*OmpA dog* forward/*OmpA dog* reverse – 357 pb. 1 =TC14; 2=TC15; 3=TC17; 4=TC20; 5= TC21; 6=TC22; 7=TC23. C1 e C2 = *R. amblyommatis* C3= *R. parkeri* (cepa ARF). Eletroforese executada em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x), revelado em brometo de etídeo. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Amostras apresentam padrão de banda do tamanho esperado para a espécie *Rickettsia amblyommatis* (291pb; 66pb), de acordo com os controles C1 e C2.45

Figura 12. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *RsaI* em fragmentos de *OmpA dog* (*OmpA dog* forward/*OmpA dog* reverse – 357 pb). 1 =TC14; 2=TC15; 3=TC17; 4=TC20; 5= TC21; 6=TC22; 7=TC23. C1 e C2 = *R.*

amblyommatis; C3= *R. parkeri* (cepa ARF). Eletroforese executada em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x), revelado em brometo de etídio. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Amostras apresentam padrão de banda do tamanho esperado para a espécie *Rickettsia amblyommatis* (156pb; 108pb; 93pb), de acordo com os controles C1 e C2.46

Figura 13. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador (COI forward/COI reverse – 709 pb) usando DNA extraído de carrapatos preservados em etanol, para demonstrar a baixa intensidade de amplificação comparando com as amostras fixadas em RNALater. 1 a 22 correspondem as amostras de carrapato do Mato Grosso do Sul presentes na Tabela 2a, 23 e 24 *T. pretiosum*, C1 e C2= amostra de DNA de controle positivo (diluído 1:50 e 1:100) amostras, N1 e N2 =controles negativos água dentro e fora); L= GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).....47

Figura 14. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *AluI* em fragmentos de COI (COI forward/COI reverse – 709 pb) de carrapatos associados a tatus canastra no MS. 1=MS31; 2=MS32; 3=MS34; 4=MS35; 5=MS37; 6=MS38; 7=MS39; 8=MS41; 9=MS44; C1= *A. sculptum*; C2= *A. romarioi* L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).48

Figura 15. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *PstI* em fragmentos de ITS2 (ITS2 forward/ITS2 reverse – 800 a 1200 pb) dos carrapatos associados a tatus. 1=MS3; 2=MS5; 3=MS6; 4=MS7; 5=MS8; 6=MS10; 7=MS11; 8=MS12; 9=MS13; 10=MS14; 11=MS15; 12=MS16; 13=MS17; 14=MS18; *A. sculptum*; L= GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). A amostra MS13 apresenta digestão parcial, como mostrado na figura e amostras MS16 apresentando um padrão diferente do conhecido para *A. sculptum* em ITS2, enquanto as demais amostras apresentaram um padrão de bandas já conhecido para essa espécie de carrapato em ITS2.48

Figura 16. Padrões Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *PstI* em fragmentos de ITS2 (ITS2 forward/ITS2 reverse – 800 a 1200pb) dos carrapatos associados a tatus canastra no MS. 1=MS26; 2=MS27; 3=MS28; 4=MS29; 5=MS30; 6=MS31; 7=MS33; 8=MS35; 9=MS36; 10=MS37; 11=MS38; 12=MS39; 13=MS40; 14=MS41; 15=MS42; 16=MS43; 17=*A. sculptum*; 18= *A. sculptum*; C1= *A. romarioi*; L= GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). As amostras 2, 8 e 12 (MS27, MS35 e MS39) tiveram um padrão diferente do esperado, onde foi possível observar a perda da banda dupla de 210pb, passando a ter um perfil de 700pb; 310pb; 280pb.49

Figura 17. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador *htrA* (*htrA*forward/*htrA* reverse –407 pb) dos carrapatos identificados tatus canastra no no MS, usando como medidor um GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=MS11; 2=MS12; 3=MS13; 4=MS14; 5=MS15; 6=MS16; 7=MS17; 8=MS18; 9=MS19; 10=MS20; 11=MS21; 12=MS22; 13= *Trichogramma pretiosum*; 14= *Trichogrammapretiosum*; C1= *Rickettsia felis* 10⁻⁴; C2= *Rickettsia felis* 10⁻⁵;

C3= *Rickettsia felis* 10⁻⁶; N1 e N2= Controles negativos. As amostras 2 e 5 e (MS12 e MS15) tiveram *amplicons* do tamanho esperado para o alvo *htrA* comparando com as amostras controles e demais amostras gerando produto inespecífico de PCR 49

Figura 18. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador *R-lep*(*R-lep*forward/*R-lep* Reverse) dos carrapatos associados a *Euphractus sexcinctus* no RN. 1=TC; 2=TC12; 3=TC19; 4=TC24; 5=TC28; 6=TC30; 7= *A. sculptum*; 8=*A. sculptum*; 9 e 10= *T. pretiosum*; 11=TC27 reextraído; C1= 1 pg de DNA *M. leprae*; C2= 500 fg de DNA *M. leprae*; C3= 50 fg de DNA *M. leprae*; C4= 5 fg de DNA *M. leprae*. N1 e N2 controles negativos; L= GeneRuler 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 50

Figura 19. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo da amplificação baseada em PCR do marcador *R-lep* nested (*R-lepnested*forward/ *R-lepnested* Reverse –278) dos carrapatos associados a *Euphractus sexcinctus* no RN, usando como medidor um GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=TC11; 2=TC12; 3=TC19; 4=TC24; 5=TC28; 6=TC30; 7= *A. sculptum*; 8=*A. sculptum*; 9 e 10= *T. pretiosum*; 11=TC27 reextraído; C1= 500 fg de DNA *M. leprae*; C2= 50 fg de DNA *M. leprae*; C3= 5 fg de DNA *M. leprae*; C4= 0,5 fg de DNA *M. leprae*. N1 e N2 controles negativos; L= GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific)..... 51

Figura 20. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador *R-lep* (*R-lep*forward/ *R-lep*Reverse –278pb) dos carrapatos associados a *Euphractus sexcinctus* no RN, usando como medidor um GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) para teste de inibição de PCR. 1=TC10; 2=TC11; 3=TC12; 4=TC19; 5=TC24; 6=TC28; 7= TC30; 8=*A. sculptum*; 9= *A. sculptum*; 10 e 11= *T. pretiosum*; 12=TC27 Reextraído; 13= TC13; 14= TC14; 15= TC15; 16=TC16; 17=TC17; 18=TC18; 19= TC20; 20=TC21; 21=TC22; 22=TC23; 23=TC25; C1, C2, C3, C4, C5 e C6= Controles 50fg de DNA genômica de *M. leprae*. 52

Figura 21. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *RsaI* em fragmentos de *ompA* dog (*ompA* dog forward/*ompA* dog reverse – 357 pb) das *Rickettsia* spp. 1=TC1; 2=TC3; 3= TC9; 4=TC12; 5=TC14; 6=TC15; 7=TC16; 8=TC19; 9=TC20; 10=TC21; 11=TC22; 12=TC23 e 14=TC24; C1=controle positivo de *Rickettsia montei*; L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). As amostras 3, 4 e 7, referentes aos carrapatos TC9, TC12 e TC 16, respectivamente apresentaram perfil compatível com coinfeção de *Rickettsia amblyommatis* e *Rickettsia parkeri*, enquanto as demais amostras (TC1, TC3, TC 14, TC15, TC17, TC19, TC20, TC21, TC22, TC23 e TC24) apresentam perfil compatível apenas de infecção com *Rickettsia amblyommatis*, confirmando os resultados obtidos da primeira extração..... 54

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 One Health.....	4
2.2 Vetores.....	8
2.2.1 Relação hospedeiro x carrapato.....	11
2.2.2 Relação ambiental.....	14
2.3 <i>Rickettsia</i> spp.....	18
2.4 <i>Mycobacterium leprae</i>	23
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
3.1 Localização do estudo.....	28
3.2 Carrapatos empregados.....	28
3.3 Delineamento experimental.....	33
3.4 Extração de DNA.....	33
3.5 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	35
3.6 Visualização de Resultado em Gel de Agarose.....	42
3.7 Esquema de diferenciação da intensidade dos amplicons gerados nos diferentes PCRs.....	42
3.8 Reação em Cadeira de Polimerases-Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição (PCR-RFLP).....	43
3.9 Sequenciamento.....	45
4. RESULTADOS.....	46
4.1 Identificação de carrapatos recuperados de espécimes de <i>E. sexcinctus</i> utilizando os marcadores moleculares 16S rDNA, COI e ITS2.....	46
4.2 Detecção e caracterização de DNA de <i>Rickettsias</i> presente em carrapatos <i>A. auricularium</i> coletados de espécimes de <i>E. sexcinctus</i> empregando análise PCR-RFLP baseada na amplificação do marcador específico do gênero <i>htrA</i>	50
4.3 Análise de DNA derivado de carrapatos <i>A. auricularium</i> coletados de espécimes de <i>E. sexcinctus</i> com base em PCR, PCR-RFLP e sequenciamento de marcadores específicos de <i>R. bellii</i>	52
4.4 Análise de DNA derivado de carrapatos <i>A. auricularium</i> coletados de espécimes de <i>E. sexcinctus</i> com base em PCR, PCR-RFLP e sequenciamento de marcadores específicos para <i>Rickettsia</i> do GFM.....	58
4.5 Identificação de carrapatos recuperados de espécimes de <i>P. maximus</i> utilizando os marcadores moleculares COI e ITS2.....	62
4.6 Detecção e caracterização de DNA de bactéria do gênero <i>Rickettsia</i> presente em carrapatos <i>A. sculptum</i> coletados de espécimes de <i>P. maximus</i> empregando análise PCR-RFLP baseada na amplificação do marcador específico do gênero <i>htrA</i>	62
4.7 Detecção e caracterização de DNA de bactéria do gênero <i>Rickettsia</i> em <i>Amblyomma sculptum</i> coletados de espécimes de <i>Priodontes maximus</i> empregando análise baseada em PCR para os marcadores <i>ompA</i> e <i>sca9</i>	62
4.8 Detecção e caracterização de DNA de <i>M. leprae</i> em <i>A. auricularium</i> coletado de espécimes de <i>E. sexcinctus</i> e em <i>A. sculptum</i> coletado de espécimes de <i>P. maximus</i> usando ensaios de PCR convencional e “nested” empregando a sequência multicópia RLEP como alvo.....	65
4.9 Amplificação de amostras de DNA derivadas de carrapatos <i>Amblyomma auricularium</i> coletadas de espécimes de <i>Euphractus sexcinctus</i> , (extraídas usando uma segunda procedimento de tratamento com fenol clorofórmio), com base em ensaios de PCR para os marcadores COI, <i>ompA</i> e <i>sca9</i> e posterior identificação de membros do GFM de <i>Rickettsia</i> por PCR-RFLP.....	68

5. DISCUSSÃO.....	71
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82

1. INTRODUÇÃO

A relação entre seres humanos, animais e o meio ambiente retoma diversas discussões a respeito de patógenos emergentes e reemergentes ao longo de diversas décadas. A necessidade de buscar métodos para intermediar esse problema é um assunto que apesar de já ser discutido há tempos, ainda é um problema sem solução eminente, já que cada vez mais se aumentam as barreiras entre esses três polos. À medida que a ação antropogênica aumenta o desequilíbrio entre animais, homens e meio ambiente se torna evidente e cada vez mais problemático.

O deslocamento humano em direção a ambientes rurais e periurbanos aumenta o contato de humanos e animais domésticos com animais silvestres e os potenciais patógenos que eles possam albergar, principalmente os transmitidos por vetores. Assim, cada vez mais os humanos ficam expostos a reservatórios silvestres de diversos agentes conhecidos e, em alguns casos, desconhecidos, como o caso do SARS-CoV-2, ao qual o contato com animais silvestres promoveu a infecção e propagação desse agente viral, responsável pela pandemia de COVID-19, que devastou grande parte do mundo.

Diversos artrópodes são considerados vetores de uma ampla variedade de vírus, bactérias e protozoários. Ao longo dos anos estudos foram elaborados para entender a ecologia, biologia e relação entre hospedeiro e seus parasitos, sendo possível elucidar o papel desses artrópodes, como mosquitos e carrapatos, na transmissão de agentes patogênicos. Através de um extenso levantamento de dados é possível identificar ampla diversidade de gêneros e espécies da família Ixodidae, que estão amplamente distribuídos por todo mundo. Dentro dessa família é possível destacar o gênero *Amblyomma*, com a maior quantidade de espécies.

Os carrapatos são responsáveis pela transmissão de diversos agentes patogênicos capazes de infectar seres humanos e animais, como *Babesia* spp., *Ehrlichia* spp. e *Rickettsia* spp. Assim, *Rickettsia* spp. é uma bactéria intracelular obrigatória, responsável por causar doenças em humanos, como Tifo causadas por espécies como *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi* e Febre Maculosa causada por *Rickettsia rickettsii*. Além disso, recentemente foi vista a possibilidade de uma doença semelhante à Febre Maculosa, com sintomatologia mais branda, causada por *Rickettsia parkeri*. Além dessas espécies já mencionadas, algumas outras já foram associadas à sintomatologia semelhantes às descritas em pacientes com doenças rickettsiais, como aparecimento de escara próxima ao local de fixação do carrapato, levantando a hipótese de outros agentes, principalmente do Grupo Febre Maculosa (GFM), como possíveis patógenos para humanos e animais.

A transmissão e manutenção desses patógenos transmitidos por vetores dependem principalmente de hospedeiros e amplificadores silvestres, como tatus. Esses animais por possuírem hábitos de escavação estão propensos a se infectarem no momento que estão se escondendo em tocas, ainda mais em tocas compartilhadas, onde é possível se infectar por carrapatos. Por isso, diversas espécies de tatus já foram identificadas como hospedeiros de carrapato do gênero *Amblyomma* e até infectado com patógenos, como *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* e *Mycobacterium leprae*.

Mycobacterium leprae é o principal agente etiológico da Hanseníase, apesar de já ter sido elucidada a hipótese dessa doença também estar associada à *Mycobacterium lepromatosis*. A hanseníase é uma doença conhecida desde tempos remotos, onde acredita-se que esse patógeno tenha vindo para o Novo Mundo através de navios negreiros, onde os escravos tinham contato direto com tatus infectados. Tendo como principal fonte de contaminação o contato direto de pacientes infectados ou fômites com o bacilo de Hansen e indivíduos que apresentem uma lesão, já que essa bactéria não tem a capacidade de adentrar tecidos íntegros, necessitando de uma lesão de continuidade. Assim, esse agente é capaz de

produzir sintomatologia dermatológica e neurológica, iniciando em nervos periféricos podendo chegar até o Sistema Nervoso Central.

Alguns métodos alternativos de contaminação vêm sendo elucidados para o *M. leprae* como, por exemplo, a possibilidade de contaminação mediante a ingestão de carne de tatus e manuseio desses animais. Embora seja ilegal no país, a caça desses animais é uma atividade comum, principalmente em regiões de vulnerabilidade socioeconômica, onde esses animais são caçados para consumo próprio ou até comércio. Como essa atividade está relacionada a regiões de carência a caça possui um caráter mais rudimentar, aumentando os riscos de contaminação dos indivíduos e animais, uma vez que geralmente cães são levados para o auxílio dessas atividades.

Embora ainda não esteja completamente comprovado há hipótese de transmissão desse agente pela picada de carrapatos, pacientes de hanseníase relataram não terem tido contato com outros pacientes sabidamente infectados ou contato direto com tatus. Assim, surgiu a hipótese da vetorização desse agente através de carrapatos em regiões onde há um alto índice de tatus infectados. Para elucidar melhor essa hipótese foram feitos dois principais estudos que mostraram a viabilidade de manutenção e transmissão vertical *in vitro* desse bacilo por carrapatos infectados artificialmente.

Visando a confirmação ou exclusão completa dessa hipótese é fundamental a utilização de métodos moleculares, sendo esse incontestavelmente o melhor método de identificação de agentes patogênicos ou não em artrópodes. Através dos avanços no aprimoramento de métodos como PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) e sequenciamento genômico possibilita a identificação desses agentes de forma rápida e eficiente. E embora o sequenciamento não seja um método viável para utilização em grande escala pelo seu alto custo, já é possível a utilização de métodos que contornam essa situação de escassez econômica, como a utilização de PCR-RFLP (Reação em Cadeia de Polimerases-Polimorfismo no Comprimento de Fragmentos de Restrição), utilizando endonucleases de restrição para auxiliar nesse diagnóstico e de outros agentes a partir do perfil de bandas gerados pelas clivagens feitas nos sítios de restrição do agente.

Sendo assim, o presente estudo tem como objetivo a identificação de *Rickettsia* spp. e *M. leprae* em carrapatos coletados de tatus infectados naturalmente por *M. leprae*, distribuídos por regiões de Mossoró, no Rio Grande do Norte e carrapatos associados a tatus do projeto Tatu Canastra, em Baía das Pedras, no Mato Grosso do Sul, utilizando métodos moleculares convencionais.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 One health

“One medicine”, proposto em 1960, significava a ligação entre saúdes humana e animal, onde a percepção de doença individual dessas duas esferas evoluiu para uma idéia de saúde coletiva, resultado de um modelo multifatorial. Esse conceito que originou a ideia de “One health”, que somente no século XXI passou a integrar a face ambiental, passando a relacionar tanto saúde humana e animal, quanto o ambiente ao qual esses indivíduos estão inseridos. Nesse sentido, a ideia de “One Health” vai muito além de apenas cuidado com saúde e zoonoses, abrange ecossistemas, segurança alimentar, bem-estar, biodiversidade e outros. Assim nasceu o “One World One Health” sob o guarda-chuva da Wildlife Conservation Society (WCS) (ORTEGA; ORTEGA; SIMÓN, 2022).

O conceito de saúde única ou “One health” é relativamente novo, sendo discutido desde meados de 2003, com o surgimento da doença respiratória aguda grave (SARS), hoje conhecida como SARS original e a disseminação da gripe aviária (H5N1), altamente patogênica. Posteriormente e mais amplamente discutido, a partir das estratégias holísticas para prevenção de epidemias ou epizooticas estabelecidas e conhecidas como “Princípios de Manhattan” que ficaram conhecidas a partir da reunião da Wildlife Conservation Society, realizada em 2004, visando focar em diversas doenças relacionadas a humanos e animais domésticos e selvagens. A partir desse momento, com o reconhecimento da interconexão entre saúde humana e animal, o conceito de “One health” ficou mais famoso. Sendo assim, fez-se ainda mais necessária a abordagem de saúde humana e animal, bem como sua relação com o ambiente em que estão inseridos, como um único assunto (MACKENZIE; JEGGO, 2019).

Cinco anos depois, houve um esforço maior para promover o “One Health Concept” pela American Veterinary Medical Association (AVMA), a partir da formação de uma força-tarefa visando estabelecer uma colaboração entre profissionais de saúde, instituições acadêmicas e governamentais em busca de uma série de estratégias para tratamento e prevenção de doenças humanas e animais. Esse movimento finalmente deu início para a formação da One Health Commission (<https://www.onehealthcommission.org/>), unindo diversas organizações com o propósito de estabelecer interações e colaborações entre profissionais de diversas áreas em busca do mesmo propósito, melhorar a saúde humana, animal e ambiental, além de propagar ao público a necessidade de abordar “One Health” (ATLAS, 2012).

Apesar de “One health” ser um termo que começou a ser muito abordado nos últimos anos, esse assunto já vinha sendo datado desde o século XIX com importantes estudiosos da medicina humana, que foram pioneiros na abordagem da medicina humana colaborativamente com a medicina animal, onde é possível notar a questão de saúde única desde a adoção de métodos de drenagem de pântano e uso de proteção contra moscas para prevenção contra malária, defendida por Giovanni Maria Lancisi. Só então, Rudolf Virchow, responsável por delimitar e reduzir as barreiras entre saúde humana e animal e pelo termo “zoonose”, foi importante impulsionador da patologia veterinária, principalmente, a partir do desenvolvimento de práticas relacionadas à inspeção de carnes, além de ser determinante no reconhecimento dos fatores ambientais relacionados à saúde. Assim, o responsável pelo estudo da peste suína clássica e outras doenças relacionadas a animais, Sir William Osler, um médico, também auxiliou para o desenvolvimento primordial da saúde única a partir dos conceitos de medicina comparativa e integração entre saúde humana e animal (EVANS; LEIGHTON, 2014).

É importante salientar que o estreitamento das relações entre o homem, o meio ambiente e os animais, principalmente animais silvestres associados à degradação do meio ambiente por atividades antrópicas favoreceu a disseminação de parasitos e patógenos que antes não estavam associados a determinadas espécies ou que sequer passavam a barreira animal, fato que deixa o Brasil no epicentro de zoonoses (BAKER et al., 2022). O aumento dessa interconexão eleva os casos de surgimento de novas espécies de patógenos ou até patógenos que eram considerados controlados ou que não havia número de casos consideráveis, tais como malária, febre amarela e leishmaniose (YU; CHENG, 2022; TAZERIJI et al., 2022; DOS ANJOS; SILVA, 2023). Nesse sentido, um dos maiores desencadeadores do aumento de zoonoses a serem considerados é o massivo processo de urbanização que as cidades vêm sofrendo, além de outros fatores que associados levam ao aumento de doenças transitando entre homens e animais, tais como a mudança no uso de terra e consequentemente o crescente aumento do contato entre humanos e animais e, assim seus patógenos (MEURENS et al., 2022; FERREIRA et al., 2022).

Cerca de 60% das doenças que assolam o mundo moderno são zoonoses e entre eles, 72% se originam de animais selvagens, como é o caso de HIV/AIDS, Ebola, diversas influências, vírus da raiva, zika e dengue e até mesmo SARS-CoV-2, o vírus da COVID-19, que assolou o planeta recentemente, com alta taxa disseminação e infecção. Sendo assim, é importante ressaltar que o expressivo processo de mudança no uso de terras esta diretamente relacionada ao transbordamento ou “spillover” de doenças para seres humanos (FERREIRA et al., 2021; HAYEKA, 2022).

Outro fator que propicia a proliferação de patógenos zoonóticos é a forma de obtenção de renda de diversas famílias, onde famílias em situação de maior vulnerabilidade socioeconômica possuem como renda extra ou até mesmo renda fixa a caça e comercialização de animais silvestres, principalmente em regiões mais carentes e com escassez. Esse fator é uma importante correlação entre a proliferação de doenças zoonóticas e vetorizadas por ectoparasitos (POWER et al., 2022). A falta de regulamentação e vigilância sanitária para comercialização e transporte desses produtos, bem como as questões mais básicas como higiene na manipulação e preparo desses produtos é o principal problema para transmissão desses patógenos, que em muitos casos são importados e exportados para diferentes países, levando a migração de diferentes patógenos (BEZERRA-SANTOS et al., 2021).

O aumento expressivo na área de produção animal, que é responsável pela grande concentração de animais e, muitas vezes, em espaços pequenos, bem como produtos de origem animal vem sendo cada vez mais um desafio para métodos profiláticos contra zoonoses, bem como transporte desses animais e produtos, que influencia o trânsito de possíveis doenças e vetores entre animais e o homem, desde a produção em fazendas ou criadouros até o momento do transporte e recebimento de carga, podendo envolver diversas .s na cadeia produtiva (ISLAM et al., 2022). Assim, há um maior contato entre o homem e esses animais, além do contato desses animais com animais silvestres, que relacionados podem influenciar no transbordamento de diversas doenças, ultrapassando a barreira espécie-específica de diversos patógenos (HAYEK, 2022).

As mudanças climáticas pelas quais o mundo vem passando são importantes fatores que influenciam no surgimento de novas doenças, principalmente pela alteração de temperatura e precipitação, que influenciam ciclo de diversos hospedeiros e vetores (THOMAS, 2020; ROMANELLO et al., 2021). Além do aumento de temperatura, outro fator para alteração nos padrões de transmissão de doenças infecciosas é o desmatamento, que pode ser considerado fator desencadeador principal para as alterações nesses padrões climáticos. Essas alterações pelas quais o ambiente vem passando desencadeiam alterações nas dinâmicas e ciclos biológicos de diversos vetores, causando a sua maior proliferação ou até migração pra outras regiões, aumentando seu contato com hospedeiros potenciais, como por exemplo, no

caso da febre amarela, zika vírus e dengue, transmitidas por mosquitos (ELLWANGER et al., 2020; ROCKLÖV; DUBROW, 2020) e febre maculosa, transmitidas por carrapatos.

O papel do desmatamento vai muito além das alterações climáticas, ele é responsável pela fragmentação de solo de habitat natural de diversas espécies. Muito além da perda de seu nicho ecológico está a falta de recursos, já que esses animais passam a não ter abastecimento adequado de água e alimentos, induzindo o êxodo desses animais e maior contato deles com outros indivíduos e, assim a transmissão de diversos parasitos e patógenos (LORENZ; DE OLIVEIRA; CHIARAVALLLOTI-NETO, 2021; TAJUDEEN et al., 2022).

O processo de urbanização massivo pelo qual o mundo vem passando, responsável pela maior aglomeração de indivíduos e animais em um mesmo ambiente faz com que haja uma maior propensão a transmissão de patógenos, principalmente em situações onde há o surgimento de favelas (MILAGRES et al., 2022). Esses locais com alta taxa de aglomeração, em muitos casos, estão relacionados a condições insalubres, como falta de saneamento e água potável, por exemplo, que associados com a falta de medidas de higiene básica aumentam a proliferação de microrganismos e agravos de saúde (ANMED et al., 2019; DUBEY; KAYLAN; PATHAK, 2023).

O surgimento de novos patógenos é um dos maiores desafios do “One Health” desde os primórdios da história em todos os aspectos, principalmente pela forma e a rapidez que eles surgem, sendo importante discutir e encontrar métodos profiláticos e de manejo para esse problema (VUITIKA et al., 2022). Um exemplo prático disso foi à pandemia de gripe espanhola, responsável por dizimar boa parte da população no século passado e, devido a esforços com relação à prevenção e atribuição de boas práticas, por anos não houve relatos de um problema de tamanha escala. Ainda assim, hoje, o surgimento de doenças infecciosas ainda é um problema de difícil enfrentamento, como podemos com o surgimento de diversas doenças aos longos dos anos como Ebola, Zika, dengue, SARS e, principalmente, com a pandemia de COVID-19 (BLOOM; CADARETTE, 2019).

Os carrapatos são importantes vetores de uma série de microrganismos patogênicos, como vírus, bactérias e protozoários, tais como *Anaplasma*, *Babesia*, *Borrelia*, *Ehrlichia* e *Rickettsia*, onde algumas delas vão apresentar alta relevância para a saúde humana e animal por acometerem diversas espécies espalhadas pelo mundo, incluindo o homem. Esses patógenos vão desencadear diversas doenças, com sintomas diferentes e, que muitas vezes, podem ser inespecíficos, dificultando seu diagnóstico e posterior tratamento (EISEN, 2020).

2.2 Vetores

Carrapatos são artrópodes da classe Arachnida e ordem Acari, classificados em 3 famílias distintas: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae, sendo as duas primeiras as consideradas de maior importância pela maior diversidade de espécies, conhecidos popularmente como “carrapatos moles” e “carrapatos duros”, respectivamente (DOS SANTOS et al., 2022).

A família Ixodidae possui o maior número de carrapatos com maior importância para a saúde pública e econômica no mundo, incluindo o maior número espécies de carrapatos. Dentre os gêneros dessa família presentes no Brasil estão: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*. Ixodídeos são conhecidos popularmente como carrapatos duros, principalmente pela presença do escudo dorsal rígido, composto por quitina, onde em fêmeas adultas este é restrito apenas até o idiossoma, possibilitando sua dilatação após repasto sanguíneo. Membros desse gênero são os principais vetores da maioria dos patógenos transmitidos por carrapatos, assim são responsáveis por parasitar uma grande variedade de hospedeiros vertebrados e com ampla distribuição geográfica mundial, facilitando sua disseminação e de diversas doenças pelo mundo (BARROS-BATTESTI;

ARZUA; BECHARA, 2006; ONOFRIO et al., 2006; ANDREOTTI; KOLLER; GARCIA, 2016).

Os carrapatos são parasitos obrigatórios e hematófagos de enorme importância para saúde única uma vez que sua relação com hospedeiro interfere intimamente com a circulação de patógenos no ambiente. Parasitam uma ampla variedade de vertebrados, necessitando desses para continuarem seus ciclos biológicos e se manterem viáveis e para reprodução (MASSARD; FONSECA, 2004). No contexto da medicina veterinária, vão influenciar a saúde animal por danos diretos ao animal, deixando lesão no couro, espoliação sanguínea, incômodo ao animal, diversas perdas econômicas, principalmente quando se fala em animais de produção, levando a redução na produção, reprodução, ganho de peso e desenvolvimento, além de infecções secundárias, que sucedem a partir da lesão primária (ANDREOTTI; KOLLER; GARCIA, 2016).

Eles são capazes de funcionar como vetores de uma ampla espécies de patógenos de importância para saúde humana e animal, como *Borrelia burgdoferi*, responsável pela Doença de Lyme, *R. rickettsii*, causadora da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, *Babesia* spp., responsáveis pela babesiose, *Ehrlichia chaffeensis* e *Erlichia ewingii*, responsáveis por causar erliquiose, entre outros. Para a transmissão de patógenos por parasitos, principalmente quando se fala de carrapatos, é fundamental a parasitemia, ou seja, quanto maior a quantidade de parasitos na superfície corporal de um indivíduo se alimentando, maior será a probabilidade de patógenos circulantes na corrente sanguínea e a conseqüentemente o sucesso na infecção, bem como o desenvolvimento de doenças. Além disso, quanto maior o grau de parasitemia do hospedeiro, maior a probabilidade de transmissão de patógenos para indivíduos amplificadores e, assim, circulação de microrganismos entre esses parasitos (MACEDO, et al., 2021; RICHARDSON et al., 2023).

Os carrapatos de importância para a veterinária podem ser divididos em três grandes grupos de acordo com seus hospedeiros. Carrapatos de importância para os animais de companhia, como *Rhipicephalus sanguineus* e, dependendo da região, algumas espécies de *Amblyomma*, pela associação com animais silvestres na região (DOS SANTOS et al., 2022). Carraoatis de importância para animais de produção, tais como *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma cajennense* (OSHIRO et al., 2021; ZAGO et al., 2023). Por fim, os carrapatos de animais silvestres, que abrange uma ampla quantidade de espécies, tais como *Amblyomma americanum*, *Amblyomma auricularium*, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma varium*, *Amblyomma sculptum*, *Haemopysalis longicornis*, *Ixodes scapularis* e outras espécies (TSAO et al., 2021; NOGUEIRA et al., 2022).

Durante o período de vida livre desses parasitos alguns fatores podem influenciar na redução do sucesso em completar seu ciclo biológico. Dentre os principais fatores pode-se destacar a temperatura e umidade relativa do ar, responsáveis diretamente para oviposição, incubação, eclosão e ecdise desses parasitos (OSHIRO et al., 2021). Em locais com baixas temperaturas os carrapatos demoram mais dias para completar seu ciclo biológico (VERÍSSIMO, 2015). De maneira geral, as condições climáticas vão influenciar na sobrevivência e distribuição desses hospedeiros ao longo do ano e suas diferentes estações, onde durante períodos com a temperatura mais elevada e mais umidos, há maior propensão para eclosão das larvas e desenvolvimento larval. Nesse sentido, há uma tendência a maior proliferação de carrapatos e, conseqüentemente, a maior transmissão de patógenos (CANEVARI et al., 2017).

A distribuição dos carrapatos está relacionada diretamente com a distribuição espacial de seus hospedeiros, sendo imprescindível conhecer bem a biologia deles no intuito de conhecer o ciclo e biologia dos possíveis parasitos que possam estar associados a eles. Além disso, como já mencionado, outra importante característica a ser explorada são as diversas condições

climáticas da região, tais como temperatura, umidade e precipitação, que influenciam o ciclo e sobrevivência dos carrapatos, visando sua manutenção no ambiente e transmissão de possíveis patógenos (DANTAS-TORRES, 2015).

Devido à baixa especificidade de algumas espécies e a alta possibilidade de infecção durante o repasto sanguíneo em animais altamente infestado, principalmente no caso de carrapatos que utilizam mais de um hospedeiro para completar seu ciclo, há uma alta circulação de diversos patógenos (DHARMAJAN et al., 2021). Além disso, apresentam ampla diversidade de possíveis hospedeiros, podendo infestar vertebrados terrestres, aquáticos, semiaquáticos ou voadores com a maior concentração de hospedeiros mamíferos (LABRUNA et al, 2004; GOMES et al., 2015). Os animais de vida selvagem servem de hospedeiro para uma enorme quantidade de espécies de ecto e endoparasitos de importância para saúde animal, que podem estar relacionados com diversos patógenos e, consequentemente, a manutenção de doenças que circulam na natureza, funcionando como amplificadores desses microrganismos (TSAO et al., 2021; GONZÁLES-BARRIO, 2022).

Os animais silvestres são considerados como potencial reservatório para agentes patogênicos, que surgem ou, em alguns casos, ressurgem ao longo dos anos. O surgimento de zoonoses que possuem um reservatório silvestre acontece a partir da mudança demográfica do homem ou comportamento do mesmo, que altera a relação parasito-hospedeiro, aumentando a transmissão de patógenos entre eles e, a possibilidade da transmissão entre animais selvagens e a espécie humana (DASZAK; CUNNINGHAM; HYATT, 2001; BLOOM; CADARETTE, 2019).

Esses hospedeiros funcionam bem como reservatórios, onde na maioria dos casos o patógeno não causaria efeitos deletérios a eles, alcançando uma relação equilibrada de simbiose, quando ocorrem mudanças ecológicas e na dinâmica desses hospedeiros, responsáveis pela introdução desses animais no meio próximo aos seres humanos ou animais domésticos, que não possuem relação equilibrada com esse possível patógeno albergado pelos animais silvestres, sendo eles responsáveis pela amplificação e transmissão de patógenos (CARVER; PETERS; RICHARDS, 2022; HOFMEISTER et al., 2022).

A manutenção desses animais na natureza é cada vez mais ameaçada pelo aumento desenfreado da população humana e avanço do homem para espaços menos urbanos, que seriam habitats naturais de animais silvestres. Esses fatores relacionados com o aumento da poluição, de áreas agrícolas, de trânsito desses animais e principalmente a introdução de espécies exóticas, que antes não existiam naquela região, muda a dinâmica do habitat de vida selvagem, a partir da destruição ou invasão de seus habitats, aumentando bruscamente sua relação com o homem (BLOOM; CADARETTE, 2019; TAZERKJI et al., 2022; CALERO-BERNAL; GARCÍA-BOCANEGRA, 2023).

Os carrapatos associados a animais selvagens, principalmente os de vida livre, ainda são bastante desconhecidos. De forma geral, o que se sabe é muito pouco quando se fala de taxonomia, biologia e relação parasito-hospedeiro, comparando com os carrapatos domésticos e de produção (SPARAGANO et al., 2022). Ainda assim, apesar de serem menos estudados já se conhece uma gama de espécies de Ixodídeos que são associados com animais silvestres tanto de vida livre quanto em cativeiro, dentre eles estão as espécies *Amblyomma auricularium*, *A. cajennense*, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma pseudoconcolor*, *A. sculptum* e *Amblyomma parvum* (MARTINS et al., 2020a).

2.2.1. Relação tatu x carrapato

Os tatus são animais pertencentes à ordem Cingulata, superordem Xenarthra, que abriga 21 espécies, onde 11 dessas já foram identificadas no país (MACEDO et al., 2021). Esses animais estão relacionados a diversos patógenos infectocontagiosos, principalmente agentes considerados zoonóticos, aos quais esses animais participam da cadeia epidemiológica como hospedeiro ou reservatório, como a Hanseníase (KLUYBER et al., 2021). Além dessa, os tatus já foram descritos associados à *Trypanosoma cruzi* (MORALES et al., 2023), *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii* (BARBOSA et al., 2020) e *Leptospira* (KIN et al., 2015).

Apesar de possuírem a pele espessa, são responsáveis por auxiliar diretamente na manutenção natural de parasitos no meio ambiente, isso acontece pela criação de buracos, que funcionam como comunidade ou espaço para que diversas espécies coabitarem, sendo chamado de biocenoses, que auxilia na interação ecológica de diversos hospedeiros e parasitos (MACEDO et al., 2021).

Para entender melhor seu papel como hospedeiro de carrapatos, reservatórios e amplificadores de doenças, é importante entender um pouco a respeito desses animais. Para isso, um dos mais importantes hábitos a ser compreendido é o alimentar. Esses animais são considerados onívoros uma vez que se alimentam de variadas fontes e de baixo teor energético, baseado principalmente em folhas e insetos, podendo consumir até frutos, carniça e vertebrados de pequeno a médio porte (BATISTA, 2019). De modo geral, não são animais agressivos, geralmente quando encurralados preferem fugir ou, no caso de algumas espécies, fechar sua carapaça, formando uma bola, porém em alguns casos podem atacar seus possíveis agressores como forma de defesa, como no caso da espécie *Euphractus sexcinctus* (KERR et al., 2015; DESBIEZ et al., 2022).

Os tatus são grandes alvos de caça, sendo relatado desde os primórdios da história, possivelmente como um fator associado a taxas de transmissão de doenças (**Figura 1**). Culturalmente, durante a caça são utilizados animais domésticos, como cães, que em contato com tatus aumenta a possibilidade de troca de parasitos, além da transmissão de patógenos entre eles. A caça desses animais está associada a consumo próprio da carne ou venda, diretamente ligada a questões socioeconômicos (KERR et al., 2015; DEPS et al., 2020).



Figura 1. Pintura rupestre que retrata a atividade de caça de tatus, onde a figura retrata um humano capturando um um tatu *Pampatherium* sp., considerado tatu gigante – Toca do Boqueirão da Pedra Furada – PNSC. Fonte: Acervo FUMDHAM

Algumas espécies de tatus já foram associadas com diversas espécies de carrapato em todo mundo, sendo elas: *A. auricularium*, *A. parvum*, *A. pseudoconcolor*, *A. cajennense*, *A. ovale* e *A. fuscum* associados a *Dasypus novemcinctus* (FONSECA et al., 2013; GOMES; PESENTI; MÜLLER, 2015), *A. cajennense*, associados às espécies *E. sexcinctus* (tatu-peba) e *Dasypus septemcinctus* (tatu-galinha), *A. fuscum* em *D. septemcinctus* e *A. parvum*, *A. cajennense* associado a *E. sexcinctus* (GOMES; PESENTI; MÜLLER, 2015). Para alguns carrapatos, como *A. pseudoconcolor* e *A. auricularium*, durante a fase de vida adulta tem como seu hospedeiro primário o tatu, podendo também parasitar outros hospedeiros inespecíficos (FONSECA et al., 2013; GARCIA et al., 2012).

A espécie *E. sexcinctus*, conhecido popularmente também como tatu-peba, tatu-pelado ou tatu-cascudo é a única espécie do seu gênero e o terceiro maior da ordem Cingulata, superordem Xenarthra, família Dasypodidae. Essa espécie possui hábito diurno, apesar de ter maior atividade no final da tarde, sendo capaz de armazenar grande quantidade de gordura, fator que interfere diretamente na escassez de alimentos de forma sazonal. Encontrado exclusivamente na América do Sul, essa espécie está em grande parte do Brasil, com ampla distribuição territorial, sendo considerada uma das espécies mais caçadas. Seu hábito de escavação é responsável por auxiliar a procura por alimentos, refúgio e abrigo para os filhotes (CHAHUD, 2021; DESBIEZ et al., 2022).

No país foi comprovada pela primeira vez em 1989 a associação de *E. sexcinctus* com *A. pseudoconcolor* e *A. calcaratum* no Estado de Minas Gerais (BOTELHO et al., 1989). Outra espécie de carrapato associada ao tatu *E. sexcinctus* é o *A. auricularium*, encontrado associado a essa espécie em Pernambuco, no Nordeste do país (PAIVA et al., 2017). Além dessas, já foi comprovada a associação de *E. sexcinctus* com *A. cajennense*, *A. parvum* e *A. sculptum* (MACEDO et al., 2021).

Amblyomma auricularium, conhecido também como “carrapato vermelho do tatu”, é um importante ectoparasito desses animais. Essa espécie de carrapato já foi encontrada parasitando diversas outras espécies distribuídas pelo do Brasil, como *Dasypus unicinctus*, *D. septemcinctus*, *E. sexcinctus* e *Cabassou sunicinctus* (FONSECA et al., 2013). Até o momento, há pouquíssimos relatos de infestação de animais domésticos e relatos de estágios imaturos em roedores, porém eles tem capacidade de infestar tatus em todos os seus estágios parasitários. Essa espécie possui ampla distribuição, ocorrendo em regiões neotropicais e neoártica, com ampla distribuição entre países como Estados Unidos, Brasil, Colômbia, México, Costa Rica, Paraguai, Trindade e Tobago, Venezuela e outros. Não apresenta predileção por vegetação, podendo estar distribuída por diversos biomas e tipo de vegetação, desde que haja presença de seu hospedeiro (GUGLIELMONE et al., 2003; MARTINS et al., 2020a).

No caso de seres humanos, não há na literatura dados suficientes que embasem sua relação como hospedeiros para carrapatos, exceto o caso de parasitismo acidental, geralmente relacionado a pessoas com animais de estimação ou com relativo risco ocupacional ou profissional, que é responsável pela transmissão e perpetuação de variados patógenos na espécie humana. Recentemente, houve o primeiro relato de infestação em seres humanos por *A. auricularium*, decorrente de parasitismo acidental durante período de coleta de carrapatos para estudos, diferente de tudo que havia sido relatado na literatura até então. Tal relato levanta a grande hipótese da possibilidade desse carrapato transmitir patógenos aos seres humanos, principalmente agentes rickettsiais, sendo um importante carrapato para saúde pública (LOPES et al., 2018; SZABÓ et al., 2020).

2.3 *Rickettsia* spp.

Rickettsiales é uma ordem de bactérias que abrange três famílias principais, sendo elas Anaplasmataceae, Bartonellaceae e Rickettsiaceae. As bactérias do gênero *Rickettsia*, da família Rickettsiaceae são intracelulares obrigatórias gram negativas, transmitidas por vetores invertebrados, que na maioria dos casos são carrapatos do gênero *Amblyomma*. Evolutivamente, houve uma redução no tamanho genômico desses microrganismos, culminando na perda de genes de diversas vias metabólicas, necessitando de nutrientes oriundos no metabolismo do hospedeiro, assim, essas bactérias são incapazes de sobreviver em um meio extracelular (HELMINIYAK; MISHRA; KIM, 2022). Possuem tropismo por glândulas salivares, ovários e intestino dos artrópodes. Os seres humanos são conhecidos como hospedeiros acidentais desses microrganismos, responsáveis por danos diretos à saúde humana (ROUX & RAOULT, 1995; BILLINGS et al., 1998).

De acordo com análises filogenéticas e moleculares foi possível classificar diversas espécies de *Rickettsia* e assim, separá-las em três principais grupos, de acordo com suas características morfológicas, antigênicas e metabólicas, sendo eles: grupo Febre Maculosa (GFM), composto por mais de 23 espécies, transmitidas, em sua maioria, por carrapatos, incluindo *R. rickettsii* agente da febre maculosa das Montanhas Rochosas e *Rickettsia conorii* causadora de febre maculosa do Mediterrâneo. Grupo Tifo (TG), incluindo as espécies *Rickettsia prowazekii*, agente do tifo epidêmico, transmitida por piolho e *R. typhi* causadora de tifo murino, transmitida por pulga. Grupo Ancestral (AG), cujos membros são considerados não patogênicos para os vertebrados, incluindo as espécies *Rickettsia canadensis* e *Rickettsia bellii* (WEINERT et al., 2009; SOARES, 2013). Sendo, por fim, sugerido a presença de um quarto grupo, denominado de grupo de transição ou transicional (TRG), que consistiria na presença das *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*, após subdivisão do GFM (SHPYNOV et al., 2018; EL KARKOURI et al., 2022).

Rickettsia bellii é uma espécie do grupo basal que, como já mencionado foi separada de grupos patogênicos GFM e TG. Essa espécie foi descrita a primeira vez em 1983, associada espécies pertencentes às famílias Ixodidae e Argasidae. Na América do Sul ela já foi descrita associada a pelo menos *Ixodes loricatus*, *Haemophysalis juxtakochi*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma neumanni*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma naponense*, *A. nodosum*, *A. ovale*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *A. parvum*, *A. pseudoconcolor*, *Amblyomma rotundatum*, *Amblyomma sabanerae*, *Amblyomma scalpturatum*, *Amblyomma tigrinum* e *A. varium* (KRAWCZAK et al., 2018). Até o momento *R. bellii* possui patogenicidade desconhecida, mas acredita-se que é possível que haja a infecção de seres humanos por estarem relacionados a carrapatos que parasitam acidentalmente o homem. Já foi visto a formação de escaras em regiões de inóculo desse agente e a capacidade natural de infecção em capivaras, cães e cavalos, ainda assim a patogenicidade dessa espécie é incerta. Essa espécie também está associada em condições naturais a co-infecção de agentes rickettsiais, sendo relatado associado a diversas espécies (DE ABREU et al., 2019b; SNELLGROVE et al., 2021; ASPINWALL et al., 2023). Acredita-se que essa espécie tenha um importante papel na patogenicidade de outras espécies de *Rickettsia* GFM no continente americano (KRAWCZAK et al., 2018).

Com ampla distribuição mundial, espécies de *Rickettsia* se mantêm viável na natureza através de vetores, sendo eles artrópodes, principalmente ácaros, piolhos, pulgas e carrapatos, que infectam hospedeiros vertebrados, como pequenos roedores e funcionando como amplificadores e, assim, vão funcionar como fonte de infecção para novos vetores (SOARES, 2013; PAROLA et al., 2013). O ser humano é hospedeiro acidental desse patógeno, geralmente não participando da transmissão e manutenção de *Rickettsia* spp. no ambiente,

exceto no caso da *R. prowazekii*, transmitida por piolho do ser humano, *Pediculus humanus corporis* (HELMINIAK; MISHRA; KIM, 2022).

A principal forma de disseminação desse agente é através da transmissão vertical, onde durante o repasto sanguíneo de artrópodes, acontece a transmissão aos hospedeiros vertebrados, como animais e seres humanos. Em segundo caso, há a transmissão horizontal que ocorre no caso de hospedeiros infestados por um alto número de parasitos, possibilitando a infecção de vetores. Além disso, há a possibilidade de haver transmissão transovariana e transtadial pelos carrapatos e larvas infectadas durante a alimentação em hospedeiros infectados ou fêmeas infectadas que transmitem a próxima geração após a oviposição, sendo responsáveis pela perpetuação bacteriana de *Rickettsia* no ambiente (SARAIVA et al., 2013; DUARTE et al., 2019).

Durante o repasto sanguíneo dos carrapatos, esse agente é transmitido por via transcutânea, dependendo do aumento da permeabilidade microvascular pela ruptura das junções do tecido endotelial infectado. Após adentrar o organismo do hospedeiro por via fagocitária, invadem e proliferam e células endoteliais de vasos de pequeno e médio calibre, e células perivasculares, como monócitos e macrófagos, causando sua destruição e espalhando a infecção por todo endotélio vascular. Porém algumas espécies patogênicas como *R. rickettsii* e *R. conorii*, já possuem mecanismos evolutivos capazes de driblar esse mecanismo de defesa do hospedeiro, facilitando sua replicação e sobrevivência (HELMINIAK; MISHRA; KIM, 2022). Além da transmissão durante a alimentação de carrapatos ou, em determinados casos, ácaros, a infecção pode ocorrer pela eliminação de fezes de pulgas infectadas (CABEZAS-CRUZ; FOGAÇA, 2022; NIU; XIONG, 2023).

Estima-se que haja uma média de 30 espécies de *Rickettsia* descritas na literatura, além de um número crescente de novas espécies e cepas, que não possuem descrição completa ou validação para serem inclusas, principalmente pela ausência de cultivo, sendo essas classificadas como *Candidatus* spp. Dentre elas, cerca de 20 espécies são consideradas patogênicas para a saúde humana e animal, tais como, *Rickettsia rickettsii*, causadora de febre maculosa e *R. typhi*, causadora de tifo (SHPYNOV et al., 2018). Ainda assim, na maioria dos casos *Rickettsia* spp. são consideradas endossimbiontes de seus hospedeiros. Na América do sul até os anos 2000, eram descritas apenas três espécies de *Rickettsia*, sendo elas *R. prowazekii* e *R. typhi*, ambas pertencentes ao grupo tifo e a *R. rickettsii* do grupo febre maculosa. Até então, com o aumento de novos estudos e métodos moléculas que permitem a melhor identificação e diferenciação das espécies, o número de bactérias desse gênero vem aumentando por todo continente, incluindo o Brasil (LABRUNA, 2009; COSTA et al., 2017; PECKLE et al., 2019).

A Febre Maculosa Brasileira, causada primariamente pela *R. rickettsii*, teve os primeiros registros por volta do fim do século XIX e início do século XX nos Estados Unidos, conhecida como “Febre Maculosa das Montanhas Rochosas”, tendo seu primeiro relato no Brasil em 1900 durante um procedimento de necropsia no Estado de São Paulo, com casos esporádicos até 1929 (KATZ et al., 2009). Após a década de 80 a doença voltou a reemergir, com expandindo para além de áreas rurais (EVANGELISTA et al., 2021; SERPA et al., 2021). Em pleno século XXI, a Febre Maculosa ainda é um problema de saúde pública, considerada como reemergente em diversas regiões do Brasil e do mundo, de forma heterogênea. Além de ser um problema de saúde única, é uma doença muitas vezes negligenciada, onde a dificuldade e lentidão para o diagnóstico dificultam o tratamento e consequente prognóstico. Se faz cada vez mais importante o desenvolvimento de estudos e conhecimento a respeito desse agente, a fim de melhorar sua triagem e diagnóstico (RODRIGUES et al., 2023).

Essa doença está mais associada a homens, principalmente adultos, mas não sendo exclusivo, com maior risco para indivíduos expostos no lazer ou local de trabalho, isso

acontece principalmente a trabalhos relacionados a campo. Essa relação pode ser associada com a proximidade com campo ou áreas de predileção do vetor (KETZ et al., 2009). Nesse sentido, a melhor forma de prevenção dessa doença é evitando áreas endêmicas, principalmente aquelas com relato de carrapatos, como florestas e matas densas e, caso necessário entrar nesses locais, usar roupas claras, facilitando a visualização desses parasitos, além de cobrir a maior parte do corpo (EVANGELISTA et al., 2021).

Embora a *R. rickettsii* por muito tempo tenha sido considerada único agente etiológico da Febre Maculosa, hoje já se sabe que essa doença também esta associada à espécie *R. parkeri*, espécie membro do SGF, apresentando uma forma mais branda da doença (RODRIGUES et al., 2023). Essa espécie foi descrita a primeira vez em 1939 estando associada à *A. maculatum* no região costeira do Golfo do Texas. Desde então já foram descritas 5 linhagens de genética de *R. parkeri* emergindo. Porém, somente em 2004, relatada em associação a seres humanos nos EUA, levando ao levantamento da hipótese dessa espécie como um potencial patógeno para o homem emergendo cada vez mais nas Américas do Norte e Sul (LÓPEZ-PÉREZ et al., 2022).

Com ampla diversidade filogenética dentro de *R. parkeri*, já se sabe que ela pode estar associada à pelo menos 12 espécies de hospedeiros, distribuídos por diversos países do continente americano. (ALLERDICE et al., 2021). Em 2010 foi descrito, pela primeira vez, a doença sendo causada por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (*R. parkeri* ARF) associado à *A. ovale*, que posteriormente foi relatado em toda Zona da Mata Atlântica nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste. Além disso, outras cepas de *R. parkeri* foram relatadas em diversas regiões do Brasil e do mundo. Em diversos casos, esses achados estão associados à sintomatologia febril aguda e presença de escara de inoculação, representando o contato com carrapato (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; RODRIGUES et al., 2023).

No Brasil, *R. parkeri* sensu strictu tem como vetor, principalmente, pela espécie *A. maculatum*, podendo ainda ser encontrada em carrapatos como *A. tigrinum* e *A. triste* em outras regiões da América, ambos de *A. maculatum*. Já foram relatados casos de rickettsiose por essa espécie em regiões como Uruguais e Argentina, onde esses carrapatos estão normalmente associados a humanos (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018; ALLERDICE et al., 2021). As cepas de *R. parkeri* do Novo Mundo, sendo elas: cepa NOD, cepa ApPR e cepa *Parvitarsum*, tiveram sua caracterização de acordo com base em sequenciamento de fragmentos genômicos através da infecção de carrapatos das espécies *A. nodosum* infectado com a cepa NOD e *A. parkeri* com a cepa ApPR, no Brasil. Embora não tenha sido encontrado no país, a cepa *Parvitarsum* foi encontrada em *Amblyomma parvitarsum* no Chile e Argentina. Embora não tenha sido confirmado patogenicidade de *R. parkeri*, ainda é uma hipótese que não pode ser totalmente descartada (NIERI-BASTOS et al., 2018).

Posteriormente, foi descrito por Peckle e co-autores (2019), que a estirpe ApPR esta relacionada a espécies do Velho Mundo, sendo elas *Rickettsia africae* e *Rickettsia sibirica* e que não há semelhança evolutiva direta entre ApPR e isolados de *R. parkeri* no Novo mundo. Essa associação de fatos levantou a hipótese do reconhecimento de uma nova espécie “*Candidatus Rickettsia paranaensis*”, pelo primeiro relato de infecção da cepa ApPR em *A. parkeri* no Paraná.

Outra espécie importante do GFM é *Rickettsia amblyommatis*, descrita a primeira vez nos EUA em 1973, encontrada parasitando *Amblyomma americanum*, amplamente distribuído até hoje pelo continente americano, com alta prevalência em diversas regiões do mundo, como Estados Unidos, Brasil, Colômbia, Chile, Paraguai, México. Até o presente momento, essa espécie já foi descrita infectando 34 espécies de carrapatos, porém com maior prevalência em espécies pertencentes ao gênero *Amblyomma*. Por estar associado, principalmente, a espécies *A. americanum*, que é considerada uma espécie agressiva, *R. amblyommatis* possui ampla expansão, podendo estar associada a infecções em humanos,

animais silvestres, cães, cavalos e outros. Em 1981, foi feita uma tentativa de induzir doença a partir da introdução dessa *Rickettsia* em cobais, causando sintomatologia branda, porém até então não se sabe a capacidade patogênica dessa espécie para mamíferos (RICHARDSON et al., 2023).

Apesar de haver indícios da presença de pacientes positivos para febre maculosa em regiões onde há alta prevalência da espécie *R. amblyommatis*, ainda não se sabe ao certo seu potencial patogênico ou se essa espécie pode estar associada a Febre Maculosa, principalmente pela ausência de sorologia identificando a espécie que acomete a maioria desses pacientes. Já que a resposta imunológica dos hospedeiros para os antígenos rickettsiais das espécies membros do SGF, é necessário testes específicos para identificação da espécie infectando o paciente (SILVA et al., 2018; RODRIGUES et al., 2023).

Há alguns indícios que essa espécie possa proporcionar certo grau de proteção para os hospedeiros contra outros agentes rickettsiais com potencial patogênico, ou seja, em caso de coinfeção, *R. amblyommatis* pode oferecer proteção contra agentes do GFM, como *R. rickettsii* e *R. parkeri*, principalmente quando testado em cobaias. Nesse sentido, faz-se necessária a investigação epidemiológica e sorológica para presença dessa espécie ou outras em áreas endêmicas (LÓPEZ-PÉREZ et al., 2022).

2.4 *Mycobacterium leprae*

Mycobacterium. leprae é um bacilo álcool ácido resistente (BAAR), intracelular obrigatório, gram-positivo, pertencente à família Mycobacteriaceae, do gênero *Mycobacterium*. São microrganismos aeróbicos com lenta reprodução e longo período de incubação, variando entre 2 e 7 anos, que apesar da alta patogenicidade afetam mais indivíduos imunossuprimidos. Esse agente possui elevado poder de penetração em macrófagos e células nervosas, principalmente as células de Schwann, que ocasiona a infecção de diversos tecidos secundários, tais como acometimento de nervos dérmicos periféricos. Por não ser cultivável em meios artificiais, esse agente pode ser utilizado em modelos experimentais vivos para estudos e reprodução celular usando animais como tatus e camundongos (ARAÚJO, 2003; OLIVEIRA, 2019).

A partir de lesões de pacientes infectados por *M. leprae*, foi possível, pela temperatura mais baixa, inocular em coxins plantares das patas de camundongos nus e camundongos átmicos, descrito a primeira vez em 1960 por Shepard, sendo possível observar sua multiplicação nessas condições. Apesar de há anos serem relatados estudos desse bacilo crescendo em modelos animais, estudos mais recentes mostram a viabilidade de crescimento e manutenção desse agente em animais selvagens, como tatus, sendo possível observar lesões de pele, nervos periféricos, medula, fígado, baço, linfonodos, pulmões, meninges e olhos. Sendo assim, foi visto que esses animais se mostram a melhor forma de experimentação em modelo animal devido a sua baixa taxa metabólica e temperatura corpórea reduzida, desenvolvendo sintomatologia semelhante à hanseníase humana (GOULART et al., 2002; ARAÚJO, 2003; OLIVEIRA et al., 2019).

A Hanseníase é uma doença infecto-contagiosa de curso crônica, causada principalmente por *M. leprae*. Sendo conhecida popularmente há anos como “lepra”, esse termo remete a idéia de condições de desonra e vergonha e, por isso, atualmente já não se fala mais esse termo. Ela é responsável por causar lesões granulomatosas na pele, sistema nervoso periférico, podendo chegar a diversos órgãos e sistemas, estando diretamente associada à desnutrição, fatores genéticos e questões imunológicas, uma vez que na maioria dos hospedeiros, quando há resposta imunológica adequada, não há

desenvolvimento clínico e sintomatológico da doença. Sabe-se que é um problema de distribuição mundial desde o início das civilizações, havendo descrição na literatura, evidências arqueológicas e alusões em textos bíblicos, comprovando sua existência mesmo antes de Cristo. Em casos não tratados ou com tratamento estabelecido tardiamente há a possibilidade de gerar deformidades ou incapacidades em seus portadores (PAVÃO, CASEIRO, GAGLIANI, 2018; STEFANI et al., 2019).

Seu agente foi descoberto em 1873 por Gerhard Amanuer Hansen, motivo pelo qual posteriormente esse bacilo ficou conhecido como “bacilo de Hansen” e, posteriormente, por volta da década de 70, deu nome à doença. Apesar de haver uma redução significativa em casos relatados, principalmente em países desenvolvidos, a Hanseníase, ainda hoje, é considerada um agravo importante de distribuição mundial. A redução em sua incidência se deu, principalmente, pela alteração no padrão de vida, ou seja, maior propagação de informação e melhorias nas condições de higiene (DEPS, 2001; OLIVEIRA et al., 2019).

Em casos que os indivíduos acometidos desenvolvem a doença, a infecção pode evoluir de diversas formas, dependendo da resposta imunológica do hospedeiro. Essas formas clínicas ainda possuem nomes específicos de acordo com a resistência, resposta imune e sua apresentação clínica. A hanseníase tuberculóide (HT), lepromatosa (LL), borderline tuberculóide (BT), borderline (BB) e borderline lepromatosa (BL). Posteriormente, para melhorar a aplicabilidade terapêutica e os serviços de saúde pública, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs a classificação de acordo com o número de lesões na pele, onde pacientes com até 5 lesões na pele e até 1 tronco nervoso periférico apresentando espessamento, com baciloscopia negativa, são classificados como paucibacilar (PB) e pacientes com mais de 5 lesões e/ou com espessamento de 1 tronco nervoso espessado e/ou resultado positivo para baciloscopia são classificados como multibacilares (MB) (OLIVEIRA et al., 2023).

A doença é amplamente distribuída por todo mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada endêmica em diversas regiões. O Brasil é o segundo maior país em número de casos com alto índice de detecção. Apesar de ter um declínio em sua prevalência pela utilização de métodos cada vez mais eficientes no tratamento e controle da doença, principalmente com a adoção do método de poliquimioterapia (PQT), o diagnóstico e erradicação da doença ainda é um desafio para o mundo (ARAÚJO, 2003; LASTÓRIA; OLIVEIRA et al., 2019).

No país, a desigualdade socioeconômica entre as regiões influencia diretamente o número de casos da doença, uma vez que a extensão do território brasileiro, assim como os movimentos migratórios, fatores ambientais, culturais, climáticos e demográficos podem estar associados a proliferação de seu agente etiológico, onde regiões mais pobres, como Norte e Nordeste apresentam maior risco e, consequentemente, os maiores índices de endêmicos da doença (OLIVEIRA et al., 2023).

Sua transmissão acontece, principalmente, pelas vias aéreas superiores, tanto para sua eliminação quanto para contaminação, através da inalação de bacilos. Outro método importante de contaminação é através de lesões de pele de indivíduos saudáveis, que ao entrarem em contato com o patógeno, podem se contaminar e assim, essas podem ser consideradas portas de entrada secundária para a *M. leprae*, uma vez que o bacilo, por ser inerte, imóvel e atóxico, não tem competência para invadir tecidos íntegros (GOULART et al., 2002; ARAÚJO, 2003).

Após a descoberta da viabilidade de tatus como excelentes modelos experimentais para crescimentos desses bacilos, foram encontrados tatus infectados naturalmente com *M. leprae*, em caso de animais capturado. Apesar de algumas

especulações, o mecanismo de transmissão de *M. leprae* para tatus selvagens de forma natural e também no homem de forma zoonótica é desconhecido, porém já é possível levantar hipóteses para essa forma de transmissão. A hipótese de hanseníase como zoonose cada vez fica mais forte com confirmações de casos em pacientes autóctones, que não tiveram em seus históricos contato prévio com pacientes de hanseníase, mas tiveram contato direto com tatus ou expostos a regiões com populações de tatus (TRUMAN et al., 2011; STEFANI et al., 2019; OLIVEIRA et al., 2019).

Com diferentes metodologias foi possível confirmar de forma empírica a presença do bacilo em tatus e, posteriormente, foram relatados diversos casos de infecção desses animais espalhados pelo continente americano, incluindo países como Estados Unidos, Brasil e Argentina. No Brasil, foi possível detectar o primeiro relato de infecção natural de *M. leprae* em tatus através de análises de “Polymerase Chain Reaction” (PCR) em amostras de sangue de tatus da espécie *D. novemcinctus* em 2002 e na região nordeste do país, foi descrito contaminação por *M. leprae* em *E. sexcinctus*, além da infecção já conhecida em *D. novemcinctus*, espécies consideradas susceptíveis (OLIVEIRA et al., 2019; DEPS et al., 2020).

Anteriormente, o único reservatório natural conhecido do bacilo de hansen era o ser humano, porém diversos relatos mostram a possibilidade da contaminação natural em animais selvagens, como o tatu e esquilos vermelhos, tornando esses potenciais reservatórios para essa bactéria. A partir desses estudos e as diversas hipóteses a respeito do papel de animais selvagens na transmissão de *M. leprae* e, consequentemente, a possibilidade de hanseníase ser uma doença zoonótica (STEPHANI et al., 2019). Porém, é importante ressaltar que há uma diferença significativa entre a lepra humana e em tatus, principalmente relacionado ao sistema nervoso. Além da diferença sintomatológica, o período de incubação nesses animais é considerado muito mais curto do que comparado com humanos (FERREIRA et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2019).

Como já mencionado, a caça de tatus é uma atividade comum, principalmente, em regiões de vulnerabilidade econômica, bem como o consumo dessa carne, que é considerado como um agravo para a proliferação de hanseníase zoonótica. O cozimento dessa carne para consumo é um importante ponto crítico para a contaminação de seres humanos com hanseníase, uma vez que apesar de estarem cozidas e diminuir a viabilidade do bacilo, a potencial fonte de contaminação acontece pelo contato com o sangue, vísceras, pele e secreções desses animais durante o preparo. Além do consumo de carne, outros fatores que estão relacionados com a contaminação por *M. leprae* em humanos relacionados à caça, principalmente ao momento de captura e manutenção desses animais em cativeiro. Após a captura, esses animais são transportados geralmente em sacos, que podem ser reutilizadas inúmeras vezes, além dos próprios instrumentos utilizados, onde o bacilo pode se manter viável por até 7 dias em secreções secas (DEPS, 2001; SCHMITT et al., 2010; KERR et al., 2015).

Apesar de serem característicos pela presença de carapaça, os tatus estão muito associados a artrópodes e há algum tempo já se discute a possibilidade de haver transmissão de *M. leprae* por artrópodes associados a tatus e a possível capacidade vetorial de carraátos na transmissão de *M. leprae* para outros animais e seres humanos, porém apesar de achados de bacilo Hansen do trato digestivo de *Amblyomma*, ainda não há confirmação da competência vetorial desses indivíduos (FERREIRA et al., 2018).

Foi visto que, em condições controladas, o *A. sculptum* possui competência vetorial para *M. leprae*, onde foi possível recuperar bacilos vivos e viáveis de coelhos infestados por esses carrapatos infectados artificialmente na fase adulta, que conseguiram, além de transmitir bacilos para animais experimentalmente, fazer postura

de ovos infectados. Também foi possível avaliar a viabilidade e possibilidade de replicação desse patógeno em modelos celulares de 3 espécies de carrapato, *Amblyomma variegatum*, *Hyalomma anatolicum* e *Ixode scapularis*, sendo esses encontrados em regiões endêmicas para hanseníase (FERREIRA et al., 2018).

A obtenção de bacilos em saliva de carrapato é um importante fator que corrobora com a possibilidade de transmissão do agente causador de hanseníase via vetorial. E apesar de já ter sido confirmada a possibilidade de transmissão de *M. leprae* via transovariana de carrapatos adultos para sua progênie e via transestadial de ninfas para adultos, não é possível confirmar sua capacidade de transmissão horizontal. Sendo assim, faz-se necessário investir cada vez mais em novos métodos que permitam identificar a viabilidade de transmissão de dessa bactéria por artrópodes (TOUGLUAN et al., 2021).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Localização do Estudo

Esse estudo foi realizado no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular (LBIOMOL), localizado no Anexo 1 do Instituto de Veterinária do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), Campus Seropédica, localizado na rodovia BR-465.

3.2 Origem, preservação e identificação dos carrapatos

Os carrapatos utilizados neste estudo foram fornecidos por duas fontes. O primeiro grupo de carrapatos (n=30) foi coletado de sete tatus adultos compostos por 4 machos e 3 fêmeas (Tabela 1). Os sete animais faziam parte de um número maior (n=20) que foram capturados e processados como parte do estudo de da Silva Ferreira et al. (2020) que examinou exemplares de *E. sexcinctus* capturados em cinco municípios da cidade de Mossoró, Rio Grande do Norte (RN), para presença da bactéria *M. leprae*. Todos os 20 animais foram registrados como infectados por *M. leprae* por meio de uma combinação de análises moleculares e sorológicas (DA SILVA FERREIRA et al., 2020). Nove dos carrapatos, coletados de 3 machos adultos (tatu#1, tatu#4 e tatu#7) em 23/05/2016 (Tabela 1) foram armazenados incorretamente em formol 10% por 1 mês, antes da troca da solução preservadora para "RNALater" (Ambion) em 23/6/2023. Os 20 carrapatos restantes foram coletados de 3 fêmeas adultas (tatu#11, tatu #12, tatu#13) e 1 único macho adulto (tatu#14) em 23/06/2016 (Tabela 1), e foram armazenados em "RNALater" imediatamente após a retirada dos tatus. Cada carrapato foi colocado em tubo individual de microcentrífuga de 1,5 ml com tampa de rosca, contendo 250 uL de "RNALater" com armazenamento a 4°C por um mês, antes de ser transportado para a UFRRJ, onde foram identificados por critérios morfológicos pelo professor João Horacio Faccini. Os carrapatos ninfas (n=14) foram identificados seguindo Martins et al. (2010), enquanto os carrapatos adultos (n=16) seguiram Aragão e Fonseca (1961), Onofrio et al. (2006) e Nava et al. (2014). Após a identificação, os carrapatos foram armazenados a -20°C até serem utilizados nas análises moleculares descritas a seguir.

O segundo grupo de carrapatos (n=44) foi fornecido pelo Dr. Danilo Kluyber (Instituto de Pesquisas Ecológicas (IPÊ), Nazaré Paulista, SP, Brasil). Os carrapatos foram adquiridos originalmente pela Dra. Jéssica Ferreira em 2017 (como componente de pesquisa planejada sobre a presença de *M. leprae* em carrapatos) durante a execução de sua tese de doutorado, orientada pelo Dr. Douglas McIntosh. Detalhes desses carrapatos são fornecidos na Tabela 2. Os carrapatos foram posteriormente repassados ao Dr. McIntosh em 2019. Os carrapatos foram coletados de espécimes de tatu gigante (*Priodontes maximus* Kerr, 1792) como parte do programa de avaliação de saúde do Projeto de Conservação do Tatu Gigante (www.giantarmadillo.org.br) conduzido na fazenda Baía das Pedras e seu entorno (19°16'S; 55°43'W), município de Aquidauana, estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. Os animais foram anestesiados e os carrapatos coletados sistematicamente, colocados em tubos rotulados contendo álcool 70% e encaminhados ao Dr. Thiago Martins (Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil) para identificação morfológica. Os carrapatos ninfas (n=3) foram identificados seguindo Martins et al. (2010), enquanto os carrapatos adultos (n=41) seguiram Aragão e Fonseca (1961), Onofrio et al. (2006) e

Nava et al. (2014). Quarenta carrapatos adultos identificados como *A. sculptum* foram coletados em 13/12/2015, e um único adulto identificado como *Amblyomma* sp. foi coletado em 28/10/2015, 1 ninfa foi coletada em 23/10/2015, nenhuma data de coleta foi informada para as 2 ninfas restantes. Todas as ninfas foram registradas como *Amblyomma* sp. As amostras foram armazenadas a -20°C no recebimento na UFRRJ em 2017 até serem utilizadas em análises moleculares. Após a identificação, os carrapatos foram armazenados a -20°C até serem utilizados nas análises moleculares descritas a seguir.

Tabela 1. Identificação de tatus por código, sexo, local e data de coleta e dos carrapatos recuperados (Estágio de vida e composição de armazenamento) de exemplares *E. sexcinctus* coletados em Mossoró, Rio Grande do Norte.

Carrapato				<i>Euphractus sexcinctus</i>			
Código	Identificação morfológica	Estágio	Armazenamento	Código	Sexo	Município	Captura
TC1	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol	Tatu 1	Macho	Pendências	23/05/2016
TC2	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol				
TC3	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol				
TC4	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol				
TC5	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol	Tatu 4	Macho	Alfonso Bezerra	23/05/2016
TC6	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol				
TC7	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol	Tatu 7	Fêmea	Pedro Avelino	23/05/2016
TC8	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol				
TC9	<i>A.auricularium</i>	Macho	Formol				
TC10	<i>A.auricularium</i>	Macho	RNAlater	Tatu 11	Fêmea	Pendências	23/06/2016
TC11	<i>A.auricularium</i>	Macho	RNAlater				
TC12	<i>A.auricularium</i>	Macho	RNAlater	Tatu 12	Fêmea	Pendências	23/06/2016
TC13	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC14	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC15	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC16	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC17	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC18	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC19	<i>A.auricularium</i>	Fêmea	RNAlater				
TC20	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC21	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC22	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC23	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC24	<i>A.auricularium</i>	Macho	RNAlater	Tatu 13	Macho	Alfonso Bezerra	23/06/2016
TC25	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC26	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC27	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC28	<i>A.auricularium</i>	Macho	RNAlater				
TC29	<i>A.auricularium</i>	Ninfa	RNAlater				
TC30	<i>A.auricularium</i>	Macho	RNAlater	Tatu14	Fêmea	Alfonso Bezerra	23/06/2016

Tabela 2. Carrapatos coletados de Tatus da espécie *Priodontes maximus* do projeto Tatu-canastra durante inspeção no município de Baía das Pedras, Mato Grosso do Sul, fixados em etanol.

Carrapato	Amostra	Data de coleta
MS1	(53) TC19 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS2	(52) TC19 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS3	(54) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS4	(55) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS5	(56) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS6	(57) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS7	(58) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS8	(59) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS9	(60) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS10	(61) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS11	(62) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS12	(63) TC08 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS13	(64) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS14	(65) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS15	(66) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS16	(67) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS17	(68) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS18	(69) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS19	(70) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS20	(71) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS21	(72) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS22	(73) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015

Continuação

Carrapato	Amostra	Data de coleta
MS23	(74) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS24	(75) TC19 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS25	(76) TC19 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS26	(77) TC19 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS27	(78) TC19 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS28	(79) TC19 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS29	(80) TC19 Macho <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS30	(81) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS31	(82) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS32	(83) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS33	(84) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS34	(85) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS35	(86) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS36	(87) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS37	(88) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS38	(89) TC08 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS39	(18) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS40	(19) TC19 Fêmea <i>A. sculptum</i>	13/12/2015
MS41	<i>Amblyomma</i> adulto macho	28/10/2015
MS42	<i>Amblyomma</i> ninfa	Sem registro
MS43	<i>Amblyomma</i> ninfa 03	Sem registro
MS44	<i>Amblyomma</i> ninfa 01	23/10/2015

3.3 Delineamento experimental

Os carrapatos foram processados por extração de DNA utilizando uma versão modificada do método fenol clorofórmio de Santolin et al (2013). O DNA extraído foi armazenado a -20°C em tampão AE e examinado utilizando uma bateria de ensaios baseados em PCR para detecção de marcadores moleculares para identificação de carrapatos (16S rDNA, COI e ITS2) e para identificação de bactérias do gênero *Rickettsia* (*htrA*, *sca1*, *sca2*, *sca9*, *sca14*, *atpA*, *coxA*, *ompA* e *ompB*). Os amplicons foram examinados pela técnica de PCR-RFLP e por sequenciamento Sanger.

3.4 Extração de DNA

Para extração do DNA foi utilizado o método desenvolvido por Santolin, Famadas, McIntosh (2013). Antes de iniciar o processo de extração, os carrapatos preservados em “RNA Later” foram lavados 3 vezes com 1 mL de tampão fosfato-salino autoclavado (PBS; pH 7,2) para remover o excesso de “RNA later”. Os carrapatos preservados em etanol 70% foram reidratados sistematicamente através da passagem por um gradiente de soluções de etanol (70%, 50% e 30%). Este processo envolveu a remoção do etanol original que foi substituído por 1 mL de etanol 70% fresco que foi armazenado em temperatura ambiente por 1 hora antes de ser substituído por 1 mL de etanol 50%, com incubação em temperatura ambiente por 1 hora, antes de ser substituído com 1 mL de etanol a 30%, também com incubação à temperatura ambiente por 1 hora. Em seguida, a solução de etanol 30% foi removida e os carrapatos foram lavados 3 vezes com 1 mL de PBS (pH 7,2). Os carrapatos foram processados em grupos de 22 espécimes para extração de DNA. Além disso, duas amostras que serviram como controles de extração (tubos contendo um adulto do parasitóide microhymenoptera *Trichogramma pretiosum*) foram processadas de maneira idêntica aos carrapatos.

Após a lavagem dos carrapatos, as 24 amostras foram transferidas para tubos com tampa de rosca de 0,5mL e foram acrescentados 200 µL de PBS (pH 7,2) estéril, e aproximadamente 50mg de pérolas de vidro - “glassbeads” (425-600 µm; Sigma-Aldrich; product # G8772). As amostras foram agitadas por 2 ciclos de 60 segundos no minibeatbeater- 16 (Biospec; Bartlesville, OK, USA), os tubos foram centrifugados durante 1 minuto (5000 x g). Em seguida foram acrescentados 200 µL do tampão de lise 2X concentrado (20 mM Tris-HCl pH 8.0, 20 mM EDTA pH 8.0, 400 mM NaCl, 1 % Dodecil Sulfato de Sódio) e 20 µL proteinase K (20µg mL⁻¹; Sigma-Aldrich). Em seguida, as amostras foram incubadas por 18 horas a 56°C. Passado o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas durante 1 minuto (16000 x g). Para aumentar a eficiência da extração esse processo foi dividido em duas etapas, primeiro foram retirados 400 µL de solução sendo transferidos para microtubos com tampa rosca de 2 mL e no tubo inicial foram adicionados 350 µL de tampão de lise (1 X) e os tubos foram invertidos 3 vezes e depois centrifugado por 1 min (5000 x g). Em seguida, 350 µL dessa solução foram retirados e adicionados ao microtubo com tampa rosca junto com a solução retirada na primeira etapa descrita anteriormente. Os tubos contendo os restos dos carrapatos foram armazenados a -20°C para conservar o material para uso em análises moleculares adicionais.

O DNA extraído foi tratado em etapas de fenol e fenol-clorofórmio, onde foram acrescentados primeiro 750 µL de fenol tamponado com Tris-HCl (ACS Científica; pH 8,0) 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 700 µL do sobrenadante (fase superior aquosa) sendo o mesmo transferido para um

novo tubo com tampa de rosca de 1,5 mL. Foram acrescentados 700 µL de Fenol-Clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1), os tubos foram 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 650 µL da fase superior aquosa e transferidos para um novo tubo com tampa de rosca de 1,5 mL. Foram adicionados 650 µL de isopropanol (MERCK) e os tubos foram incubados durante um mínimo de 15 minutos em temperatura ambiente (aproximadamente 22°C). Passado esse período, as amostras foram centrifugadas por 15 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 500 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 10 minutos para evaporar a pequena quantidade de etanol que restava. Após seco, o DNA foi suspenso em 100 µL de “buffer” AE (10 mM Tris-HCl. 0.5 mM EDTA; pH 9.0), e os tubos foram incubados a 4°C durante a noite e depois aquecido à 56°C por dez minutos (para certificar que o DNA foi completamente suspenso).

Com base nos primeiros testes de PCR (a serem descritos abaixo) foi notado que uma amostra (TC27, correspondendo a uma ninfa ingurgitada), não amplificou em nenhuma PCR utilizada. Assim, esta amostra foi extraída de novo para tentar reverter a aparente falha no primeiro processo de purificação. Este processo foi idêntico ao processo anterior, com a exceção de que invés de suspender o carrapato (que havia sido armazenado a -20°C junto com os “glass-beads” usados no primeiro processo de extração) em 200 µL de PBS, foram adicionados 125 µL de PBS e 75 µL do DNA produzido na extração inicial.

Depois de ter executado todas as análises moleculares, com as 74 amostras de DNA produzidas no 1º processo de extração, os restos dos carrapatos de Rio Grande do Norte (TC1-TC30) foram submetidos a um segundo processo de extração (denominada como 2º processo de extração), onde foram acrescentados 250 µL de PBS aos tubos contendo os restos dos carrapatos e os “glass-beads”. Em seguida os tubos foram agitados no “bead-beater” por 2 ciclos de 1 min cada, posteriormente foram acrescentados 250 µL de tampão de lise 2X concentrado e as misturas foram aquecidas a 95°C por 10 minutos, por fim foi adicionado 20 µL de proteinase K e os tubos foram incubados a 56°C durante 2 h. Após o período de incubação a 2ª extração foi executada seguindo os passos do protocolo já descrito até a fase de precipitação, onde foram adicionados 10 µL de tRNA ao DNA, como uma agente co-precipitante, antes da adição do isopropanol. Após seco, o DNA foi suspenso em 100 µL de “buffer” AE (10 mM Tris-HCl. 0.5 mM EDTA; pH 9.0), e os tubos foram incubados a 4°C durante a noite e depois aquecido à 56°C por dez minutos para certificar que o DNA foi completamente em suspenso.

3.5 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Após as extrações de DNA dos carrapatos, foram realizados um conjunto de ensaios de “Polymerase Chain Reaction” (PCR) para investigar a possível presença de DNA nas amostras e para gerar “amplicons” para posteriormente realizar as técnicas de Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP) e sequenciamento (método de Sanger). Detalhes dos alvos (para DNA dos carrapatos, para bactéria do gênero *Rickettsia* e para *M. leprae*) os iniciadores/“primers”, a composição dos “master-mixes” e os condições de termo-ciclagem estão fornecidos nas Tabelas 3, 4 e 5.

Em todos os ensaios, controles positivos foram utilizados para garantir o desempenho nos limites de detecção da PCR, sendo estes provenientes do DNA extraído usando o protocolo fenol-clorofórmio, de um exemplar de *Amblyomma romarioi*. Os DNAs foram quantificados e serialmente diluídos, para proporcionar uma gama de concentrações (100 picogramas/ μ L a 10 fentogramas/ μ L). Os controles do DNA (1 μ L) foram submetidos a PCR para os alvos (16S rDNA) e analisados através de eletroforese em gel de agarose para determinar a última diluição capaz de gerar um produto visível de amplificação. A última e penúltima diluição, determinada, foram então utilizadas como controles positivos, fornecendo um meio de assegurar que os ensaios foram reprodutíveis (especificamente que os ensaios funcionaram dentro dos limites predefinidos de detecção), e para assegurar que os “amplicons” derivados dos lisados de carrapatos apresentaram o peso molecular correto utilizando o “ladder” de peso molecular: 100 bp DNA ladder (Sinapse). No caso dos ensaios para detecção de alvos associados os membros do gênero *Rickettsia*, os DNA controles relatados por Abreu et al, (2019b) foram utilizados.

Todas as reações de PCR 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, 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.

Tabela 3. Primers específicos para cada alvo, mistura para PCR e condições do ciclo de amplificação da PCR utilizando os amplificadores para carrapatos 16S rDNA mitocondrial, COI mtDNA mitocondrial e ITS2.

Alvo e tamanho do produto	Primers (5'-3')	Mastermix	Condições de PCR	Referência
16S rDNA mitocondrial (≈ 460pb)	Primer Forward CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG Primer Reverse CCGGTCTGAAGTAGATCAAGT	1x Tampão 2,5 mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 5 pmol/μL cada iniciador 0,75 U platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos. Seguido, sete ciclos constituídos por: Desnaturação a 94°C por 15 segundos, Anelamento a 47°C por 15 segundos e Extensão a 72°C por 20 segundos, seguido de 33 ciclos adicionais constituídos por: Desnaturação a 94°C por 15 segundos, Anelamento a 50°C por 15 segundos e Extensão 72°C por 20 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	MANGOLD; BARGUES; MASCOMA (1998)
COI DNA mitocondrial (≈ 709pb)	Primer Forward ATTCAACCAATCATAAAGATATTGG Primer Reverse TAAAC TTCTG GATGT CCAAA AAATCA	1x Tampão 2,5 mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 7,5pmol/μL cada iniciador 0,5 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido, cinco ciclos constituídos por Desnaturação a 94°C por 15 segundos, Anelamento a 45°C por 15 segundos e Extensão 72°C por 20 segundos, seguido de 35 ciclos adicionais constituídos por Desnaturação a 94°C por 15 segundos, Anelamento a 51°C por 15 segundos e Extensão 72°C por 30 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C.	HEBERT, et al. (2004)
ITS2 nuclear (≈ 900 a 1200 pb)	Primer Forward ACATT GCGGC CTTGG GTCTT Primer Reverse TCGCC TGATC TGAGG TCGAC	1x tampão 1,75mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 10pmol/μL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 20 segundos, Anelamento a 53°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 45 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C.	LV et al. (2014)

Tabela 4. Alvos para identificação de *Rickettsia* spp. e seus respectivos tamanhos de amplicons, primers, mistura para PCR e referências

Alvo e tamanho do produto	Primers (5'-3')	Mastermix	Condições de PCR	Referência
<i>gltA</i> (≈ 834pb)	Primer Forward GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT Primer Reverse CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	1x tampão 2,5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 10pmol/µL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	LABRUNA et al (2004)
<i>htrA</i> (≈ 407pb)	Primer Forward GGAACCAGGCGGTATGAATAA Primer Reverse ACTTGCCATAGTCCGTCAGG	1x tampão 2,5 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 10pmol/µL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	LABRUNA et al (2004)
<i>sca2</i> (≈ 764bp)	Primer Forward TGATGAATTACGTGCAAGGTTTT Primer Reverse ACCTTGCAATTACAGCTCGT	1x tampão 2,0 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 10pmol/µL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	Este estudo
<i>sca9</i> (≈ 727bp)	Primer Forward CAG CAG CCT TTC ACG TTT CT Primer Reverse ACT CCA ATG TCA GCA ATA CTA GG	1x tampão 2,0 mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 10pmol/µL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	ABREU et al (2019)

Continuação

<i>sca14</i> (≈ 724bp)	<i>Primer Forward</i> CCA CAG AAT TTG CAC CAC GT <i>Primer Reverse</i> TTT GTT TGA GCA CTC GGT ATT TT	1x tampão 2,0 mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 10pmol/μL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	ABREU et al (2019)
<i>sca1</i> (≈ 657pb)	<i>Primer Forward</i> GGTGATGAAGAAGAGTCTC <i>Primer Reverse</i> CTCTTTAAAATTATGTTCTAC	1x tampão 2,5 mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 10pmol/μL 0,75 U Platinum Taq DNA polymerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	ANSTEAD &CHILTON, 2013
<i>ompA dog</i> (≈ 360pb)	<i>Primer Forward</i> GCT TTA TTC ACC ACC TCA AC <i>Primer Reverse</i> GCC GGC AGT AAT AGT AAC AG	1x tampão 2,5mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 10pmol/μL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 35 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 15 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	ABREU et al (2019)
OmpB (857pb))	<i>Primer Forward</i> CCGCAGGGTTGGTAACTGC <i>Primer Reverse</i> CCTTTTAGATTACCGCCTAA	1x tampão 2,5mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 10pmol/μL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	ROUX & RAOULT (2000)

Continuação

AtpA (≈ 593pb)	Primer Forward AGA CAA ACC GGC AAA ACA GC Primer Reverse CGA CAT TAA CAG CCG GTC TT	1x tampão 2,0mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 10pmol/μL 0,75 U Platinum Taq DNA polymerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	KRAWCZAK et al (2018)
CoxA (≈ 801pb)	Primer Forward CAG GAG CAG CGG TTG ATA TG Primer Reverse CGG GAT ATT GCT TGC CTG ATA	1x tampão 2,0mM MgCl ₂ 200 μM dNTPs 10pmol/μL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 40 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 52°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 25 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	KRAWCZAK et al (2018)

Tabela 5. Primers espécie-específico para *M. leprae*, mistura para PCR e condições do ciclo de amplificação da PCR utilizando os amplificadores para usando alvos RLEP e RLEP nested.

Alvo e tamanho do produto	Primers (5'-3')	Mastermix	Condições de PCR	Referência
RLEP (≈ 282bp)	Primer Forward RLEP2-1 ATATCGATGCAGGCGTGAG Primer Reverse RLEP2-2 GGATCATCGATGCACTGTTC	1x tampão 1,5mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 10pmol/µL 0,75 U Platinum Taq DNA polymerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 35 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 59,6°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 15 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	FROTA et al (2012)
RLEP nested (≈ 238bp)	Primer Forward RLEP2-2 GGATCATCGATGCACTGTTC Primer Reverse RLEP2-3 GGGTAGGGGCGTTTTAGTGT	1x tampão 21,5mM MgCl ₂ 200 µM dNTPs 10pmol/µL 0,75 U Platinum Taq DNA polimerase	Ativação de Taq a 95°C por 5 minutos Seguido de 25 ciclos de: Desnaturação a 95°C por 15 segundos, Anelamento a 59,6°C por 15 segundos, Extensão a 72°C por 15 segundos. Extensão final a 72°C por 5 minutos Pausa a 22°C	FROTA et al (2012)

3.6 Visualização de Resultados em Gel de Agarose

Em todas as reações de PCR o peso molecular dos “amplicons” foi confirmado através da comparação com o marcador de peso molecular (100 bp DNA ladder, Sinapse). A eletroforese de todos os ensaios acima descritos foi realizada em gel de agarose 1,5% ou 2,0%, com tampão de corrida Tris-Acetato com EDTA (TAE) (0,5X= 20 mM Tris base; 20 mM ácido acético; 0,5 mM EDTA pH 8,0), a uma voltagem constante de 5V/cm durante 45-60 minutos. Após a corrida, os fragmentos de DNA presentes no gel de agarose foram corados em Brometo de Etídeo (0,5µg/mL) durante 10 minutos e posteriormente submersos em água destilada por um mínimo 30 minutos para remoção do excesso do Brometo. A observação e captura das imagens dos géis foram feitas digitalmente sob iluminação ultravioleta com exposição de 200 ms usando um fotodocumentador L-PIX (Loccus biotecnologia).

3.7 Esquema de diferenciação da intensidade dos “amplicons” gerados nos diferentes PCRs

Para auxiliar na diferenciação de intensidade das bandas, como um método de semi quantificação, foi utilizado um método de observação em gel de agarose e esquema de cruzes de acordo com a intensidade dos amplicons gerados, como exemplificado na Figura 3. Assim, os amplicons gerados com maior intensidade foram denominados de “+++”, com moderada intensidade denominados de “++” e os de fraca intensidade foram denominados de (+).

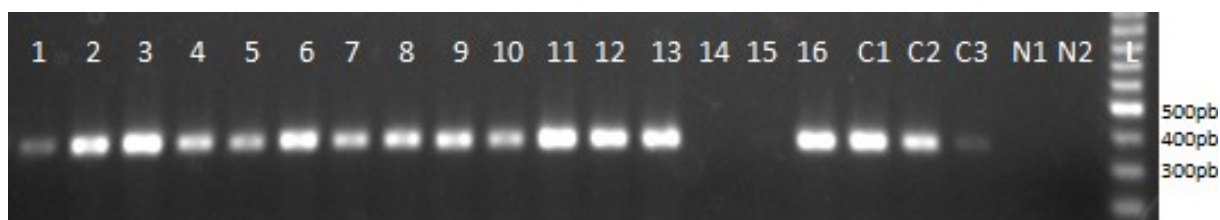


Figura 2. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x corado em Brometo de etídeo utilizado para exemplificar o método de análise da intensidade de bandas, usando como exemplo amostras de DNA de espécies de *Rickettsia*. Para controles foram usados amostras de *Rickettsia montei* em diluição seriada onde é possível ver a redução da intensidade das bandas de acordo com o aumento da diluição, gerando um padrão degradê. C1= Banda de alta intensidade, caracterizada com “+++”; C2= Banda de intensidade moderada, caracterizada como “++”; C3= Banda de intensidade fraca, caracterizada como “+”. N1 e N2= Sem amplicon, sendo caracterizado como “-”.

A partir do esquema de cruz mostrado pelos controles utilizados em diluição seriada na Figura 3, é possível caracterizar as amostras subsequentes no gel de acordo com o esquema de intensidade, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6. Exemplificação de esquema de classificação de intensidade de bandas em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x) para diferenciar os amplicons gerados a partir de PCRs.

Amostra	Intensidade	Amostra	Intensidade	Amostra	Intensidade
1	+	8	++	15	-
2	++	9	++	16	+++
3	+++	10	+	C1	+++
4	++	11	+++	C2	++
5	++	12	+++	C3	+
6	+++	13	+++	N1	-
7	+	14	-	N2	-

Assim, como representado na Tabela 6, as amostras 1, 7 e 10 tiveram amplificação fraca, assim como representado pelo controle mais diluído (C3), as amostras 2, 4, 5, 8 e 9 tiveram intensidade moderada, assim como o controle intermediário (C2), as amostras 3, 6, 11, 12, 13 e 16 tiveram amplificação forte, como o controle mais concentrado (C1) e a amostra 14 e 15 não geraram amplicon, assim como os controles negativos (N1 e N2).

3.8 Reação em Cadeia da Polimerase-Polimorfismo de Comprimento do Fragmento de Restrição (PCR-RFLP)

As reações enzimáticas para clivagem de produtos de amplificação, (dos alvos listados na Tabela 7 e Tabela 8), ocorreu em um volume final de 12 µl, contendo de 4 a 9 µl do produto de PCR, de acordo com a qualidade da amplificação e intensidade da banda resultante em análise prévia, 1,2 µl do tampão de reação enzimática próprio para cada enzima, 1,2 U da enzima de restrição selecionada e 1,2 µl de soro albumina bovina (0,1 mg/ml), com posterior adição de H₂O ultrapura para alcançar o volume final desejado. As reações foram incubadas a 37 °C durante 3 h. Os padrões de PCR-RFLP resultantes após a digestão foram avaliados por eletroforese em gel de agarose 2,5% com tampão de corrida Tris-Borato EDTA (TBE) (44,5mM Tris base; 44,5 mM borato; 1 mM EDTA – pH 8,0), em voltagem constante de 5 V/cm, durante 120 min. O procedimento de coloração e registro dos géis ocorreu como descrito previamente para avaliação dos produtos de PCR.

Objetivando melhor predição do tamanho nos fragmentos resultantes, a análise comparativa foi feita com o auxílio de marcador de peso molecular (GeneRuler 50 bp DNALadder; Thermo Scientific). Complementarmente, material genético de exemplares previamente caracterizados através do sequenciamento molecular também foram submetidos à amplificação e digestão enzimática, objetivando um segundo parâmetro de comparação e determinação dos fragmentos obtidos pós-digestão. Estas amostras serviram ainda como controles de qualidade da reação de digestão, assegurando o desempenho enzimático e clivagem satisfatória do material genético.

As imagens resultantes foram avaliadas visualmente e com o auxílio do software GelAnalyzer 2010a (<http://www.gelanalyzer.com/>) (SKOSYREV et al., 2013), empregando o marcador de peso molecular como parâmetro para a calibração do software e posterior predição dos tamanhos de fragmentos visualizados.

Tabela 7. Alvo molecular específico para carrapatos, com suas endonucleases de restrição e seus respectivos tamanhos de fragmentos de DNA esperados.

Espécie	Padrão	<i>DraI</i> para 16S	<i>MspI</i> para 16S
<i>A. auricularium</i>	Auri_A1	245; 193; 15 pb	219; 190; 22; 22 pb
<i>A. sculptum</i>	Scul_A2	220; 97; 91; 30; 15	237; 212; 4
	Scul_B1	315; 91; 30; 15	237; 212; 4
Espécie	Padrão	<i>AluI</i> para COI	<i>MboI</i> para COI
<i>A. auricularium</i>	Auri1A	342; 243; 124	406; 128; 77; 53; 45
	Auri2B	156; 144; 124; 99; 99; 87	328; 128; 122; 78; 53
	Auri2C	156; 144; 124; 99; 99; 87; 6	328; 128; 122; 78; 53
<i>A. sculptum</i>	Scu1A	295; 243; 171	406; 128; 77; 53; 27; 18
	Scu2A	295; 243; 171	328; 128; 78; 77; 53; 27; 18

Tabela 8. Alvo molecular específico para *Rickettsia* spp., com suas endonuclease de restrição e seus respectivos tamanhos de fragmentos de DNA esperados.

ALVO	Enzima	Espécie	Perfil esperado
<i>htrA</i>	<i>MpsI</i>	<i>R. bellii</i>	305pb; 102pb
		<i>R. amblyommatis</i> , “ <i>Candidatus R. andeanae</i> ”, <i>R. parkeri</i> e <i>R. rickettsii</i>	246; 173; 130 pb
		<i>R. rhicephali</i>	246; 129; 118pb
<i>Sca2</i>	<i>AluI</i>	<i>R. bellii</i>	410; 187; 105; 47; 15pb
<i>Sca9</i>	<i>AluI</i>	<i>R. bellii</i>	396; 165; 82; 46; 18pb
<i>Sca14</i>	<i>EcoRV</i>	<i>R. bellii</i>	532; 192pb
<i>ompA</i> dog	<i>PstI</i>	<i>R. amblyommatis</i>	153; 81; 78; 66pb
		<i>R. parkeri</i>	153; 81; 78; 66pb
	<i>RsaI</i>	<i>R. amblyommatis</i>	156; 108; 93pb
		<i>R. parkeri</i>	267; 93pb

3.9 Sequenciamento

Os produtos das PCR foram purificados com Exo-SAP-IT (Thermo Scientific) submetidos ao sequenciamento através do “Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit” (Applied Biosystems). Os “amplicons” foram sequenciados em ambas as direções utilizando os mesmos iniciadores empregados 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 seg, seguidos de 30 ciclos de 10 seg a 96°C, 5 seg à 50°C para o anelamento quatro min 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 5.3; Genecodes Corporation), e as sequências obtidas foram identificadas usando o programa BlastN, junto ao banco de dados GenBank.

4. RESULTADO

Os achados deste estudo são apresentados sequencialmente para fornecer uma descrição clara dos dados gerados em relação aos diversos tópicos que foram abordados por esta investigação. A seção inicial tratará da análise dos carrapatos coletados de espécimes de *E. sexcinctus* no Rio Grande do Norte e apresentará dados em relação à (a) identificação molecular dos carrapatos e (b) à caracterização das bactérias *Rickettsia* associada a esses carrapatos. A segunda seção fornece dados referentes aos carrapatos coletados de exemplares de *P. maximus* em Mato Grosso do Sul em relação à identificação molecular desses artrópodes e à caracterização molecular das bactérias *Rickettsia* a eles associadas. A terceira seção fornece detalhes da análise molecular para a presença de *M. leprae* nos carrapatos coletados dos tatus capturados nas duas regiões do Brasil citadas anteriormente. A seção final dos resultados forneceu dados sobre os resultados obtidos com DNA produzido por meio de um procedimento de re-extração, projetado para garantir a recuperação completa de todo o DNA das amostras e que serviu para complementar e estender as análises anteriores.

4.1 Identificação de carrapatos recuperados de espécimes de *E. sexcinctus* utilizando os marcadores moleculares 16S rDNA, COI e ITS2.

Os dados relativos à amplificação dos marcadores moleculares 16S rDNA e COI são apresentados na Tabela 9. As amostras TC1-TC9 foram preservadas (erroneamente) em formalina e previu-se que este erro teria efeitos deletérios na integridade do DNA, o que por sua vez teria um impacto adverso na capacidade de amplificar as sequências alvo utilizando métodos baseados em PCR. Observou-se que esta preocupação foi confirmada para a maioria (6/9) das amostras. As amostras TC1-TC4 geraram amplicons para ambos os marcadores. Em contraste, as amostras TC5-TC9 não produziram amplicons para nenhum dos marcadores, com exceção da amplificação fraca (+) do marcador 16S no TC5.

Tabela 9. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras identificadas morfolologicamente como *A. auricularium* em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5X). *Amostras fixadas em formol; a= DNA gerado na primeira extração; b= DNA gerado na segunda extração.

Carrapato	16S	COI	Carrapato	16S	COI	Carrapato	16S	COI
TC1*	+++	++	TC11	+++	+	TC21	+++	+++
TC2*	+	++	TC12	+++	++	TC22	+++	+++
TC3*	++	++	TC13	+++	+++	TC23	+++	+++
TC4*	++	++	TC14	+++	+++	TC24	+++	++
TC5*	+	-	TC15	+++	+++	TC25	+++	+++
TC6*	-	-	TC16	+++	+++	TC26	+++	+++
TC7*	-	-	TC17	+++	+++	TC27a	-	-
TC8*	-	-	TC18	+++	+++	TC27b	+++	++
TC9*	-	-	TC19	+++	-	TC28	+++	+++
TC10	-	++	TC20	+++	+++	TC29	+++	++
						TC30	+++	++

Os carrapatos TC10-TC30 foram preservadas em RNALater, e forte amplificação dos marcadores 16S e COI foi observada na maioria (18/21) das amostras de DNA (Tabela 9). As exceções foram às seguintes amostras: TC10 onde teve amplificação intermediária (++) para COI e o marcador 16S rDNA não amplificou, TC11, onde a amplificação do marcador COI foi registrada como fraca (+), TC19 (uma fêmea adulta totalmente ingurgitada) cuja a amplificação do marcador COI foi negativa e amostrar TC27a (uma ninfa ingurgitada) que não conseguiu amplificar nenhum dos marcadores inicialmente, usando DNA produzido a partir de uma extração inicial de fenol-clorofórmio, mas que amplificou com sucesso ambos os marcadores usando DNA (TC27b), produzido por uma segunda processo de extração de fenol-clorofórmio (Tabela 9).

Observou-se também que a intensidade de amplificação registrada para as amostras fixadas em formalina foi geralmente inferior à registrada para as amostras preservadas em RNALater (Tabela 9). O suporte para esta afirmação é apresentado na Figura 4, onde foi observado que a amplificação do marcador COI registrada nas amostras 1-9 (conservadas em formalina) foi menos intensa que nas amostras 10-19 preservadas em RNALater. Uma exceção foi a amostra 13 (preservada em RNALater) que não conseguiu amplificar devido à inibição causada pelo carrapato estar fortemente ingurgitado).



Figura 3. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificações baseadas em PCR do marcador COI (COI forward/COI reverse – 709 pb) usando DNA extraído de carrapatos preservados em formalina ou em RNALater. 1=TC1; 2=TC2; 3=TC3; 4=TC4; 5=TC5; 6=TC6; 7=TC7; 8=TC8; 9=TC9; 10=TC10; 11=TC11; 12=TC12; 13=TC19; 14=TC24; 15=TC28; 16=TC30; 17 e 18= *A. sculptum* (controle de extração em RNALater); 19 e 20= *T. pretiosum*; 21=Ninfa reextraída (TC27b); 22= TC27a (DNA da primeira extração diluída 1:10); C1= *A. romarioi* (diluído 1:100); C2= *A. romarioi* (diluído 1:50); L=100pb ladder. Amostras 1 a 9 preservadas em formalina e 10 a 16 em RNALater, mostrando a diferença na conservação do material pelos diferentes métodos de fixação.

A amplificação do marcador ITS foi observada em todas as amostras positivas para amplificação dos marcadores 16SrDNA e/ou para o COI.

Os carrapatos foram identificados como *A. auricularium* por meio de caracteres morfológicos e essas identificações foram confirmadas por meio de análise PCR-RFLP de todos os amplicons seguida de sequenciamento de representantes (mínimo de 3) de cada perfil de digestão. No caso dos amplicons ITS2, todas as amostras produziram padrões de bandas idênticos para *Pst*I e *Rsa*I, que eram consistentes com o perfil de bandas esperado para *A. auricularium*.

As análises realizadas com os amplicons 16S rDNA (n=25) e COI (n=24) revelaram a existência de dois perfis de bandas para cada um dos marcadores. No caso do 16S digerido com *Vsp*I todas as amostras produziram o perfil de bandas esperado de 217pb e 193pb. No caso da digestão com *Dra*I a maioria (22/25) produziu o perfil de bandas esperado de 245pb e 191 pb, com as 3 amostras restantes (TC14, TC15 e TC23),

gerando um perfil de 247pb e 163pb conforme mostrado na Figura 5. As 3 amostras de DNA que produziram o novo perfil foram todas produzidas a partir de ninfas recolhidas no tatu #12 no município de Macau.

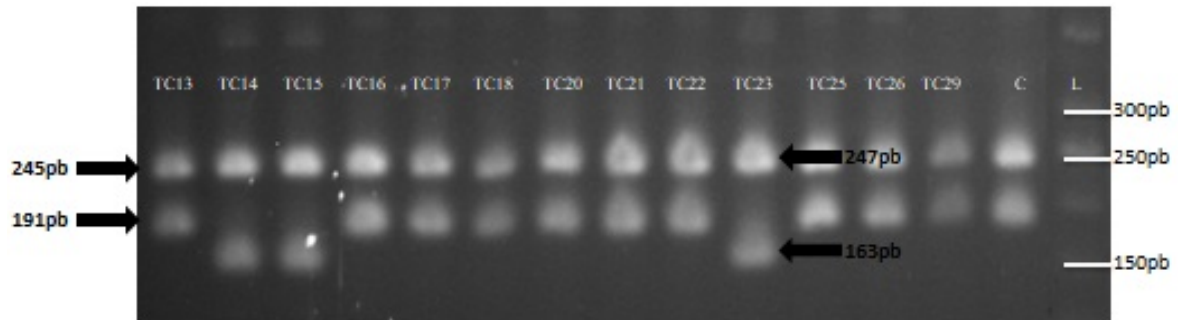


Figura 4. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição de *DraI* em fragmentos de 16S (16S forward/16S reverse – 407pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus. 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC29. C= *A. auricularium*; L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

O sequenciamento de quatro representantes do perfil de bandas 1, e duas amostras do padrão de bandas tipo 2 revelou que representavam dois haplótipos. As quatro sequências do perfil de bandas 1 eram idênticas entre si, tinham 403pb de comprimento (após remoção dos primers) e foram denominadas como haplótipo 1. A sequência do haplótipo 1 apresentou 100% de similaridade de nucleotídeos (403/403 bases) com sequências depositadas em no Genbank como 16SrDNA de *A. auricularium* coletado de um roedor no Município de Mossoró, Rio Grande do Norte, Brasil (número de acesso KR869155) ou de um espécime de *Monodelphis domestica* na Bahia (número de acesso MG887827). As duas sequências obtidas das amostras classificadas como padrão de bandas 2 eram idênticas entre si, tinham 407 pb de comprimento (após remoção dos primers) e foram denominadas haplótipo 2. A sequência do haplótipo 2 apresentou 100% de similaridade de nucleotídeos (407/407 bases) com sequências depositadas no Genbank derivadas de *A. auricularium* coletadas de um espécime de *Tamandua Tetradactyla* no Maranhão (número de acesso MK68003). As sequências foram depositadas no banco de dados GenBank.

A digestão dos amplicons COI (n=24) com *AluI* demonstrou a presença de padrões de bandas idênticos que correspondiam aos tamanhos esperados de fragmentos de 156pb, 144pb, 118pb e uma banda dupla compreendendo 2 fragmentos de 99pb. No caso das amostras digeridas com *MboI*, a maioria (16/24) tiveram o perfil de bandeamento antecipado de 328 pb, 128pb e 122pb, e o restante (TC2, TC3, TC4, TC10, TC19, TC22 e TC27) gerando um perfil de 328pb, 128pb e 104pb (Figura 6). Destas, três amostras eram as mesmas que foram identificadas como haplótipo 2 de 16S *rDNA* com base na análise de sequência, sendo elas TC14, TC15 e TC23.

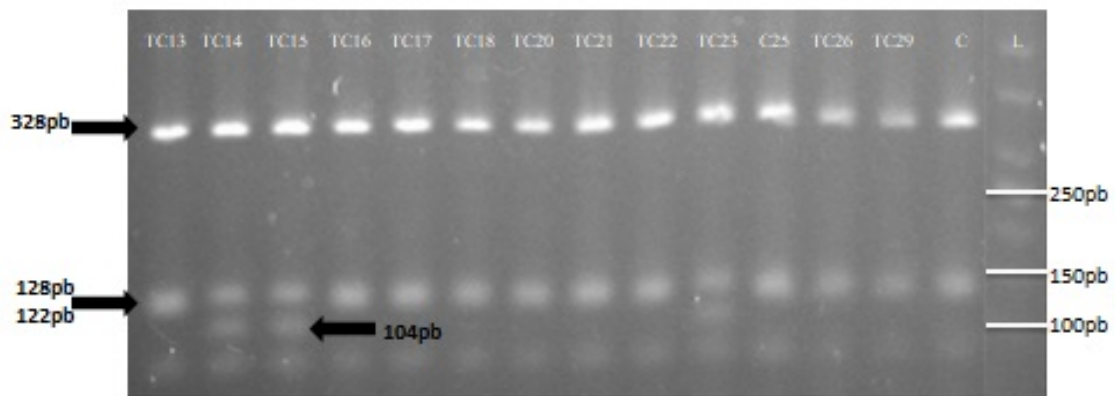


Figura 5. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *MboI* em fragmentos de COI (COI forward/COI reverse – 709 pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC29 e C= *A. auricularium*; L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

O sequenciamento de três representantes dos dois perfis de bandas demonstrou que eles estavam associados a duas sequências distintas de 658pb de comprimento (após remoção dos primers) que apresentaram 99% de similaridade de nucleotídeos (651/658 bases). As três amostras representando o perfil de bandas 1 eram idênticas e foram denominadas haplótipo 1. A sequência do haplótipo 1 apresentou 89% (572/644 bases) de similaridade de nucleotídeos com a sequência (KF200126) depositada no banco de dados GenBank como sendo derivada de um espécime de *A. auricularium* coletado de uma ave selvagem no Panamá. As sequências produzidas a partir das 3 amostras que apresentaram perfil de bandas 2 foram idênticas e apresentaram um nível de similaridade de nucleotídeos de 88% (568/644) com a sequência (KF200126) e foi designada haplótipo 2. Representantes das sequências foram depositados no GenBank.

4.2 Detecção e caracterização de DNA de rickettsias presente em carrapatos *A. auricularium* coletados de espécimes de *E. sexcinctus* empregando análise PCR-RFLP baseada na amplificação de *htrA*, marcador específico do gênero *htrA*

Os resultados da amplificação baseada em PCR de um fragmento de 407 pb do gene que codifica o marcador específico do gênero *htrA* da rickettsia são fornecidos na Tabela 10. Observou-se que 6/9 das amostras preservadas em formalina (TC1-TC9) produziram amplicons detectáveis (Tabela 10). No caso das amostras TC1-TC4, a amplificação da sequência alvo foi considerada como forte (+++) ou intermediária (++), com a amostra TC9 apresentando amplificação fraca (+). Estes resultados foram semelhantes aos observados anteriormente com os marcadores 16S rDNA e COI. Em comum com esses marcadores, as amostras (TC5-TC8) não conseguiram gerar amplicon para *htrA* (Tabela 10). No caso das amostras preservadas em RNALater (TC10-TC30), a maioria (18/21) das amostras produziu amplicons do tamanho esperado (Tabela 10). No caso da amostra T27a (DNA produzido a partir do primeiro procedimento de extração), não houve amplificação, enquanto a amostra T27b (produzida a partir de uma segunda rodada de purificação com fenol-clorofórmio) gerou um amplicon (+++).

Tabela 10. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras de *A. auricularium* para identificação de espécies de *Rickettsia* spp. com alvo *htrA* em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5X). *Amostras fixadas em formol; a= DNA gerado na primeira extração; b= DNA gerado

Carrapato	<i>htrA</i>	Carrapato	<i>htrA</i>	Carrapato	<i>htrA</i>
TC1*	+++	TC11	-	TC21	+++
TC2*	++	TC12	+++	TC22	+++
TC3*	++	TC13	+++	TC23	+++
TC4*	++	TC14	+++	TC24	+++
TC5*	-	TC15	+++	TC25	+++
TC6*	-	TC16	+++	TC26	+++
TC7*	-	TC17	+++	TC27a	+
TC8*	-	TC18	++	TC27b	+++
TC9*	+	TC19	+++	TC28	+
TC10	+++	TC20	+++	TC29	+++
				TC30	-

Os amplicons foram submetidos à digestão com a enzima *MspI* e os padrões de bandas foram determinados em géis de agarose a 2,5%. Os resultados das análises para amplicons derivados de ninfas são mostrados na Figura 7. O método PCR-RFLP permite a distinção entre as espécies *R. bellii* (que gera um padrão de bandas de 305pb e 102pb) enquanto as espécies dentro do GFM produzem uma variedade de padrões de bandas que podem ser agrupados como *R. amblyommatis*, “*Candidatus Rickettsia andeanae*”, *R. parkeri* e *R. rickettsii* (246pb, 173pb e 130pb); *Rickettsia rhiphicephali* (246pb, 129pb e 118pb). Dadas as claras diferenças nos tamanhos dos fragmentos entre *R. bellii* e os membros do GFM, o método também permite a detecção de coinfeções. A análise dos 24 perfis de bandas obtidos indicou que os carrapatos apresentavam três tipos distintos de infecção. Assim, um total de 10 carrapatos (TC2, TC4, TC10, TC12, TC13, TC16, TC18, TC25, TC26 e TC27b) foram classificados como sendo infectados com *R. bellii*, e 8 amostras (TC14, TC15, TC17, TC20, TC21, TC22, TC23 e TC29) foram registrados como coinfectado com *R. bellii* e um membro do GFM. Por último, seis carrapatos (TC1, TC3, TC9, TC19, TC24 e TC28) foram considerados como infectados com membros do GFM que mostram a mesma perfil de bandas de 246pb, 173pb e 130 pb e como tal correspondeu ao subgrupo composto por as espécies *R. amblyommatis*, “*Candidatus R. andeanae*”, *R. parkeri* e *R. rickettsii*.

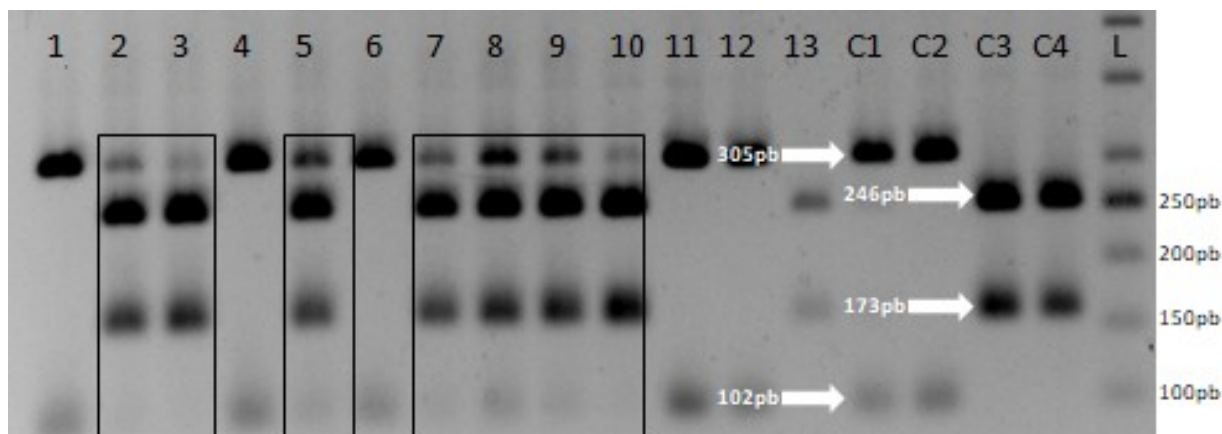


Figura 6. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *MspI* em fragmentos de *htrA* (*htrA* forward/*htrA* reverse – 548 pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus. 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC29. C1e C2= *R. bellii*; C3 e C4= *R. amblyommatidis*; L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

4.3 Análise do DNA derivado de carrapatos *A. auricularium* coletados de espécimes de *E. sexcinctus* com base em PCR, PCR-RFLP e sequenciamento de marcadores específicos de *R. bellii*.

A Tabela 11 mostra os resultados obtidos para ensaios baseados em PCR desenvolvidos para permitir a amplificação de fragmentos dos genes que codificam as proteínas *sca2*, *sca9* e *sca14* de *R. bellii*.

Tabela 11. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras de *A. auricularium* usando alvo espécie-específica para *R. bellii* em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x). *Amostras fixadas em formol; a= DNA gerado na primeira extração; b= DNA gerado na segunda extração.

Carrapato	<i>Sca2</i>	<i>Sca9</i>	<i>Sca14</i>	Carrapato	<i>Sca2</i>	<i>Sca9</i>	<i>Sca14</i>
TC1*	-	+	-	TC16	++	+++	+++
TC2*	++	+++	+++	TC17	++	+++	+++
TC3*	-	-	-	TC18	++	++	+
TC4*	-	+++	+++	TC19	-	+	-
TC5*	-	-	-	TC20	++	+++	+++
TC6*	-	-	-	TC21	+++	+++	+++
TC7*	-	-	-	TC22	+	+++	+++
TC8*	-	-	-	TC23	+++	+++	+++
TC9*	-	-	+	TC24	-	-	-
TC10	++	+++	+++	TC25	+++	+++	+++
TC11	-	-	-	TC26	++	++	++
TC12	++	+++	++	TC27a	-	-	-
TC13	++	+++	+++	TC27b	-	+	-
TC14	++	+++	+++	TC28	-	-	-
TC15	++	+++	+++	TC29	-	+++	++
				TC30	-	-	-

Os ensaios foram aplicados a todas as amostras TC1-TC30 para confirmar os resultados dos dados gerados com a análise *htrA* e também para examinar a possibilidade de que amostras adicionais possam conter DNA de *R. bellii*. Observou-se que a maioria das amostras (n=17) identificadas como infectadas por *R. bellii* ou como co-infectadas apresentaram amplificação forte (+++) ou intermediária (++) para pelo menos dois dos três marcadores específicos de *R. bellii* (Tabela 11). Uma exceção a isto foi a amostra TC27b (DNA reextraído) que produziu amplificação fraca (+) para o alvo *sca9* e foi negativa para *sca2* e *sca14*. As amostras consideradas co-infectadas pela análise *htrA* apresentaram boa amplificação para pelo menos dois dos marcadores, com exceção de TC29 que não produziu amplicon para o marcador *sca2*, amplificação fraca (+) para *sca9* e amplificação forte (+++) para *sca14* (Tabela 11).

Os dados registrados para os seis carrapatos consideradas infectadas apenas com uma *Rickettsia* do GFM (TC1, TC3, TC9, TC19, TC24 e TC28), indicaram que 4/6 estavam de fato co-infectadas com *R. bellii*. Assim, apenas duas amostras (TC3 e TC24) não produziram amplicon para nenhum dos marcadores *sca*. Em contraste, as quatro amostras restantes produziram cada uma um amplicon para *sca9* (TC1 e TC19) ou *sca14* (TC9 e TC28). As amostras TC11 e TC30 que foram negativas para o marcador *htrA* também foram negativas para todos os três genes *sca* (Tabela 11).

A confirmação da identidade dos amplicons como *R. bellii* foi obtida por uma combinação de PCR-RFLP e sequenciamento. Os resultados das análises PCR-RFLP são fornecidos nas Figuras 8, 9 e 10. No caso dos amplicons *sca9* (digeridos com *AluI*) e *sca14* (digeridos com *EcoRV*), todas as amostras produziram padrões de bandas idênticos, que eram compostos por bandas de tamanho previsto (com base no banco de dados do GenBank). No caso de *sca9*, o controle positivo (*R. bellii* cepa Mogi), também produziu a combinação de fragmentos do esperado na digestão. Porém, no caso do *sca14*, foi observado que o controle positivo produziu bandas de aproximadamente 520pb em vez da banda de 532 (observado na amostra de *R. bellii* de amostras de *A. auricularium*). Assim, as bandas produzidas para o *sca9* foram as seguintes: 396bp, 185bp, 82bp, e as bandas produzidas para *sca14* foram de 520pb e 192pb. (Figuras 8 e 9). Como mostrado na Figura 10, a digestão dos amplicons *sca2* produziu um padrão de bandas de 410pb, 237pb, 105pb que era distinto do perfil de 401pb, 187pb, 105pb, observado para o DNA de controle de *R. bellii*.

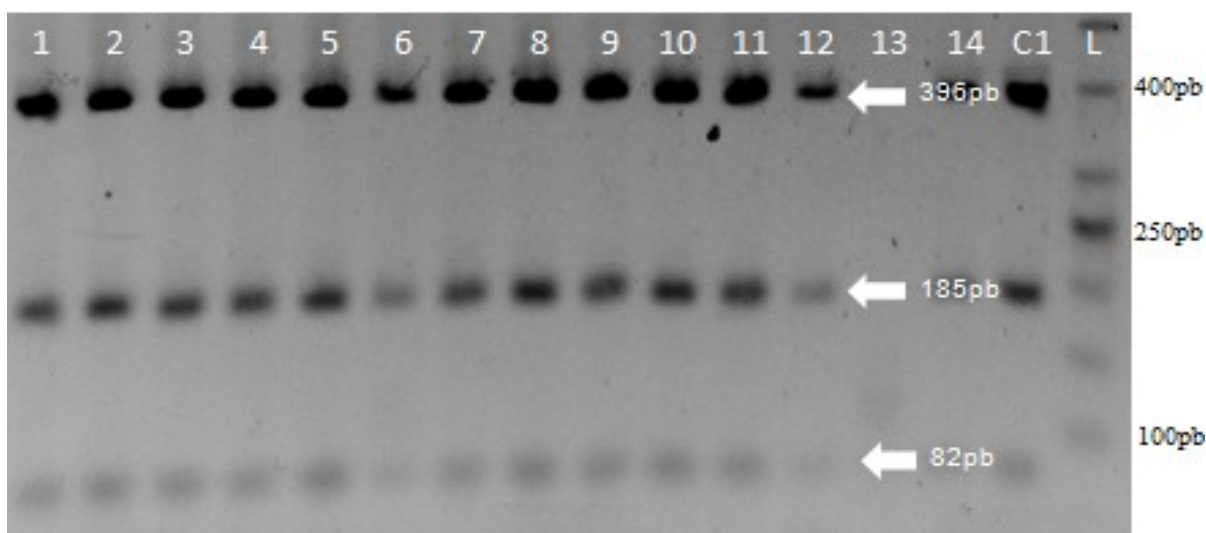


Figura 7. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *AluI* em fragmentos de *Sca9* (*Sca9* forward/*Sca9* reverse – 727 pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus usando como medidor um GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC27; 14=TC29. C1 controle positivos de *R. bellii*. Todas as amostras tiveram perfil compatível com *R. bellii*, apresentando um perfil de bandas compatível com o esperado, sendo esse 396bp, 185bp, 82bp.

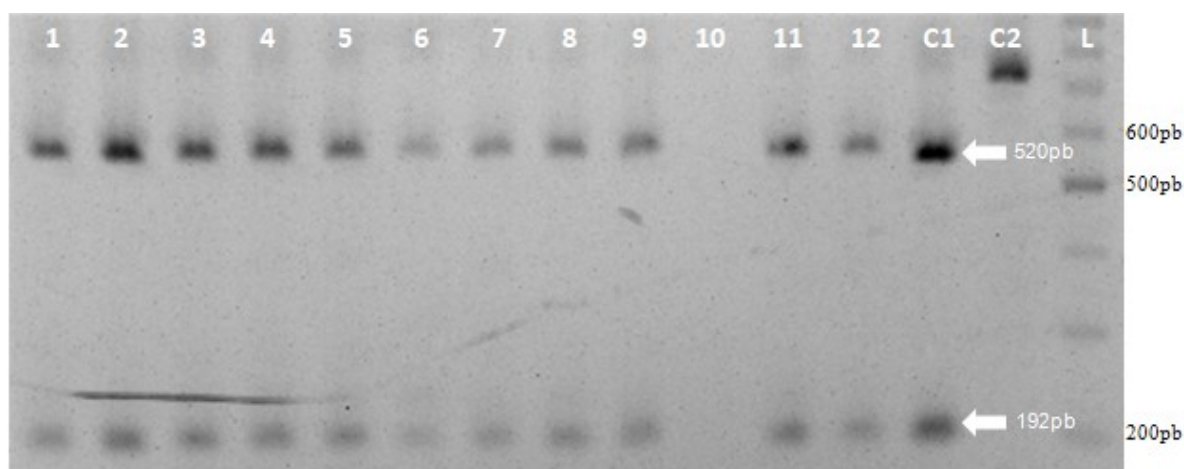


Figura 8. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *EcoRV* em fragmentos de *Sca14* (*Sca14* forward/*Sca14* reverse – 724 pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus usando como medidor um GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=TC20; 2=TC21; 3= TC22; 4=TC23; 5=TC25; 6=TC26; 7=TC27; 8=TC2; 9=TC4; 10=TC9; 11=TC10; 12=TC12; C1 controle positivos de *R. bellii*; C2= Controle positivo de *R. amblyommatidis* (amplicon integro). Todas as amostras tiveram perfil compatível com *R. bellii*, apresentando um perfil de bandas compatível com o esperado, sendo esse 532pb e 192pb.

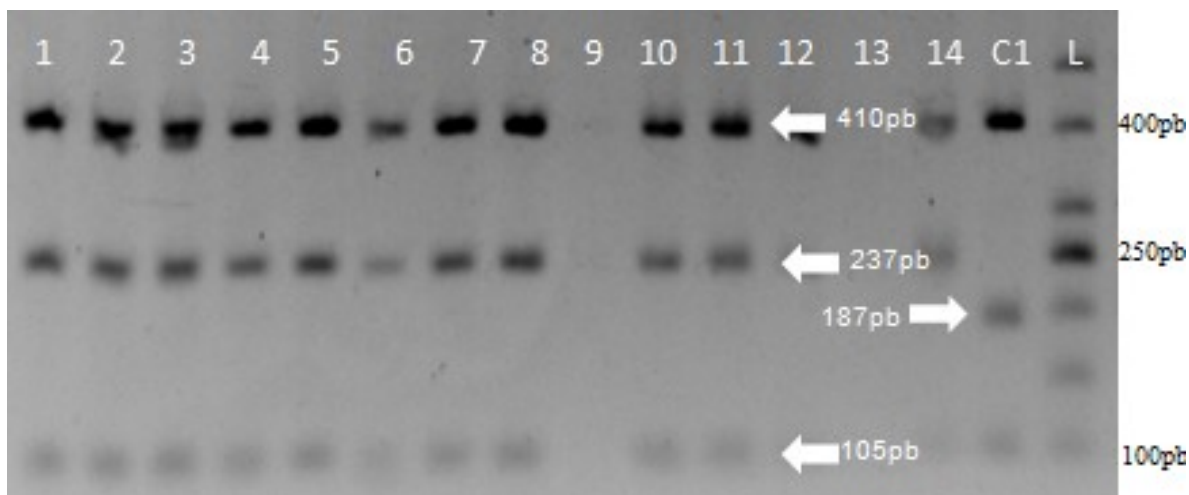


Figura 9. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *AluI* em fragmentos de *Sca2* (*Sca2* forward/*Sca2* reverse – 764pb) dos carrapatos identificados como ninfas associados a tatus usando como medidor um GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=TC13; 2=TC14; 3=TC15; 4=TC16; 5= TC17; 6=TC18; 7=TC20; 8=TC21; 9=TC22; 10=TC23; 11=TC25; 12=TC26; 13=TC27; 14=TC29. C1 controle positivos de *R. bellii*. As amostras apresentaram um perfil diferente do esperado e diferente do padrão de bandas observado no DNA controle, onde esperava-se um perfil de 410pb; 187pb; 105pb.

A análise das sequências dos “amplicons” *sca9* (n= 6) mostrou que eles eram idênticos entre si, com um comprimento de 684 bases após a remoção dos iniciadores. As sequências apresentaram 100% de similaridade nucleotídica com sequências depositadas no GenBank como *sca9* derivadas de *R. bellii*, com os seguintes números de acesso (AY973497 e CP000087).

O sequenciamento de amplicons derivados do controle positivo (*R. belli* cepa Mogi) revelou uma diferença no tamanho das bandas observadas na análise da PCR-RFLP devido a diferença de 11 nucleotídeos. Assim, a sequência gerada para a cepa Mogi apresentou 98,6% de similaridade de nucleotídeos (669/680) com as sequências registradas para *R. bellii* presentes em *A. auricularium*.

A análise de sequência de seis “amplicons” *sca2*, cada um com 724pb de comprimento (sem primers), mostrou que eles eram idênticos entre si. A digestão *in silico* com a enzima *AluI* confirmou o padrão de bandas divergente que havia sido detectado pela análise *in vitro* de PCR-RFLP relatada anteriormente. A nova sequência apresentou 98,9% de similaridade de sequência, em 721 bases, com as seguintes sequências (números de acesso CP000087, AY355327 e AY970506) depositadas no GenBank como *sca2* derivado de *R. bellii*. A nova sequência era três nucleotídeos maiores do que as três sequências de referência devido à presença de um códon adicional (AGT) que codifica o aminoácido serina. Além disso, a nova sequência apresentou 97,5% de similaridade de nucleotídeos (706/724 bases) com a sequência CP015010 descrita como derivada de uma cepa de *R. bellii* detectada em um espécime de *A. neumanni*, coletado na Argentina. As 18 diferenças eram distintas daquelas observadas em comparação com as outras três sequências de referência. Contudo, em comum com as novas sequências, esta sequência de referência tinha 724 pb de comprimento e continha um codon (AAT) na mesma posição que o codon AGT descrito acima. O códon AAT codifica o aminoácido asparagina. Os resultados de uma análise comparativa das posições dos nucleotídeos são apresentados no formato de uma tabela de variância (Figura 11) gerada através desta função no programa Sequencher.

1	A	B	C	D	E	2
Top Sequence	sca2 ...	CP000087.1	AY355372.1	AY970506.1	NZ_CP...	Total
2 C					G	1
12 G		A	A	A	A	4
17 G		A	A	A		3
22 A					C	1
26 A					T	1
54 G					A	1
59 C					A	1
199 T		C	C	C		3
435 A					G	1
465 A		G	G	G		3
525 A					G	1
526 C					A	1
529 G					A	1
549 G					A	1
600 G					C	1
628 G					A	1
630 A					G	1
638 C					A	1
640 C					G	1
645 C					A	1
668 T		:	:	:		3
669 A		:	:	:		3
670 G		:	:	:	A	4
683 A		C	C	C	C	4
709 C					T	1
Total	0	8	8	8	20	44

Figura 10. Tabela de Variância, comparando as bases do amplicon sca2 (detectado em carrapatos *A. auricularium* infectados com *R. bellii*) com sequências depositadas no GeBank como sca2 derivadas de quatro cepas de *R. bellii*. A coluna 1 fornece o número de bases e a identificação das bases na nova sequência. A coluna 2 forneceu detalhes do número de sequências que compartilham a mesma variação em uma base específica. A coluna A = nova sequência de sca2, coluna B = CP000087, C= AY355372 D= AY970506 e E= CP015010.

Análises adicionais dos carrapatos positivos para *R. bellii* envolveram amplificação de fragmentos dos genes que codificam as proteínas *atpA* e *coxA* seguida de sequenciamento. A amplificação de ambos os alvos foi obtida para todas as amostras previamente registradas como positivas (para pelo menos um dos genes *sca*). Um total de seis “amplicons” foram sequenciados para cada alvo. A análise dos “amplicons”

atpA mostrou que eles eram idênticos entre si, com comprimento de 552 pb após a remoção dos primers e mostraram 100% de similaridade de nucleotídeos (552/552 bases) com sequências depositadas como *atpA* derivadas de *R. bellii* infectando uma amostra de *A. neumanni* coletada na Argentina (número de acesso CP015010), e MT009147 que foi depositada como sendo derivada de *R. bellii* infectando um espécime de *Ixodes luciae* da Guiana Francesa. As sequências geradas para os “amplicons” *coxA* tinham 760 bases de comprimento (sem primers) e eram idênticas entre si. Eles demonstraram 99,8% de similaridade de nucleotídeos (759/760 bases) com a sequência MF154924 depositada como *coxA* derivada de *R. bellii* infectando um espécime de *D. variabilis* nos EUA e o mesmo nível de similaridade de nucleotídeos com a sequência MF154902 derivada de *R. bellii* detectada em um exemplar de *H. justakochi*, no Brasil.

4.4 Análise de DNA derivado de carrapatos *A. auricularium* coletados de espécimes de *E. sexcinctus* com base em PCR, PCR-RFLP e sequenciamento de marcadores específicos para *Rickettsia* do GFM

Dados relativos à triagem das amostras de DNA produzidas a partir dos carrapatos TC1-TC30 utilizando ensaios de PCR destinados à detecção de fragmentos de três regiões codificadoras de proteínas presentes nos genomas dos membros do GFM, porém ausentes no genoma de *R. bellii*, são apresentados na Tabela 12. Os alvos específicos foram fragmentos dos genes *sca1* (627 pb), *ompA* (360 pb) e *ompB* (857 pb). Conforme observado nos ensaios anteriores, as amostras TC5-TC8 (conservadas em formol) não produziram “amplicon” em nenhum ensaio. Além disso, as amostras TC11 e TC30 que foram previamente registradas como negativas para *htrA* e os marcadores *sca2*, *sca9* e *sca14*, foram registradas como negativas para *sca1*, *ompA* e *ompB* confirmando a ausência de DNA de riquetsias detectável nesses carrapatos. As duas amostras (T3 e T24) consideradas infectadas apenas com um membro do GFM de *Rickettsia* apresentaram amplificação positiva para pelo menos dois dos marcadores específicos do GFM (Tabela 12), e como tal o seu estado de infecção foi confirmado. Um total de 10 amostras (TC2, TC4, TC10, TC12, TC13, TC16, TC18, TC25, TC26 e TC27b) foram classificadas anteriormente como infectadas apenas com *R. bellii*, com base na análise PCR-RFLP de “amplicons” *htrA* e amplificação de alvos específicos para *R. bellii*. Esta classificação foi mantida para a maioria (8/10) das amostras que foram negativas em cada um dos ensaios específicos do GFM (Tabela 12). As exceções foram as amostras T26 e T27. Assim, a amostra T26 apresentou amplificação intermediária (++) para *sca1* e *ompA*. No caso da amostra 27, foi observada amplificação fraca (+) para *ompA* na amostra 27a (extração única com fenol-clorofórmio) enquanto amplificação forte (+++) foi registrada para o mesmo alvo para a amostra 27b (extração com duas procedimentos de fenol-clorofórmio). Como tal, essas amostras foram reclassificadas como sendo coinfectadas.

A análise das 12 amostras (TC1, TC9, TC14, TC15, TC17, TC19, TC20, TC21, TC22, TC23, TC28 e TC29) previamente classificadas como coinfectadas, revelou que a maioria (9/12) demonstrou amplificação de pelo menos um dos marcadores específicos do GFM (Tabela R8). As exceções foram as amostras TC9 (conservada em formol), TC12 e TC16. Porém com base na análise PCR-RFLP do *htrA* essas amostras foram classificadas como sendo co-infectadas. Duas amostras adicionais (TC28 e TC29) mostraram amplificação apenas para o alvo *ompA* (Tabela 12).

Tabela 12. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras de *Amblyomma auricularium* para identificação de *Rickettsia* spp. do grupo GFM em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x). *Amostras fixadas em formol; a= DNA gerado na primeira extração; b= DNA gerado na segunda extração.

Carrapato	<i>scal</i>	<i>OmpA</i>	<i>ompB</i>	Carrapato	<i>scal</i>	<i>ompA</i>	<i>ompB</i>
TC1*	++	++	+	TC17	+++	+++	++
TC2*	-	-	-	TC18	-	-	-
TC3*	++	-	+	TC19	+++	+++	-
TC4*	-	-	-	TC20	+++	+++	++
TC5*	-	-	-	TC21	+++	+++	++
TC6*	-	-	-	TC22	+++	+++	++
TC7*	-	-	-	TC23	+++	+++	++
TC8*	-	-	-	TC24	+++	+++	++
TC9*	-	-	-	TC25	-	-	-
TC10	-	-	-	TC26	++	++	-
TC11	-	-	-	TC27a	-	+	-
TC12	-	-	-	TC27b	-	+++	-
TC13	-	-	-	TC28	-	+	-
TC14	+++	+++	++	TC29	-	+++	-
TC15	+++	++	++	TC30	-	-	-
TC16	-	-	-				

A análise PCR-RFLP dos amplicons de *ompA* (utilizando as enzimas *PstI* e *RsaI*) foi realizada com o intuito de identificar as espécies de *Rickettsia* do GFM presentes nos carrapatos. Os resultados desta análise são apresentados na **Tabela 13**. As bactérias GFM na amostra TC24 (classificada como infectada apenas com *Rickettsia* do GFM) foram identificadas como *R. amblyommatis*. Além disso, a mesma espécie de *Rickettsia* do GFM foi identificada na maioria (11/14) das amostras classificados como co-infectadas (Tabela 13).

Tabela 13. Detecção e identificação de *Rickettsia* do GFM infectando *A. auricularum* com base na análise PCR-RFLP de amplicons (357 pb) de *ompA* *=carrapatos classificados como infectados apenas com uma espécie indeterminada de *Rickettsia* GFM; **= carrapatos classificados como coinfectados com espécie indeterminada de *Rickettsia* do GFM e com *R. bellii*.

Carrapato	Perfil de fragmentos (pb)		Especie de <i>Rickettsia</i>
	<i>ompA PstI</i>	<i>ompA RsaI</i>	
	DNA produzido pela extração		
TC1**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC14**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC15**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC17**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC19**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC20**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC21**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC22**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC23**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC24*	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC26**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC27**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC28**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>
TC29**	291, 66	156, 108, 93	<i>R. amblyommatis</i>

As Figuras 12 e 13 fornecem detalhes dos padrões de bandas obtidos para sete amostras representativas digeridas com *PstI* e *RsaI* e comparadas com os perfis de bandas produzidos a partir de amostras de DNA de controle de *Rickettsia amblyommatis* e *Rickettsia parkeri*.

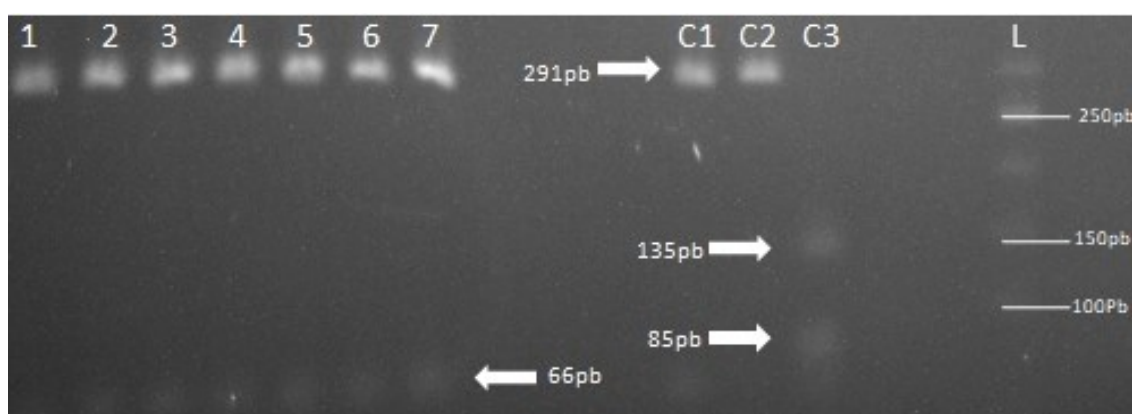


Figura 11. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *PstI* em fragmentos de *OmpA dog* (*OmpA dog forward/OmpA dog reverse* - 357 pb. 1 =TC14; 2=TC15; 3=TC17; 4=TC20; 5= TC21; 6=TC22; 7=TC23. C1 e C2 = *R. amblyommatis* C3= *R. parkeri* (cepa ARF). Eletroforese executada em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x), revelado em brometo de etídeo. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Amostras apresentam padrão de banda do tamanho esperado para a espécie *Rickettsia amblyommatis* (291pb; 66pb), de acordo com os controles C1 e C2.



Figura 12. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *RsaI* em fragmentos de *OmpA dog* (*OmpA dog* forward/*OmpA dog* reverse – 357 pb). 1 =TC14; 2=TC15; 3=TC17; 4=TC20; 5= TC21; 6=TC22; 7=TC23. C1 e C2 = *R. amblyommatis*; C3= *R. parkeri* (cepa ARF). Eletroforese executada em gel de agarose (2,5% - TBE 0,5x), revelado em brometo de etídeo. Mensuração de produtos de PCR através de análise comparativa com fragmentos de tamanho conhecido em GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). Amostras apresentam padrão de banda do tamanho esperado para a espécie *Rickettsia amblyommatis* (156pb; 108pb; 93pb), de acordo com os controles C1 e C2.

Sequenciamento dos “amplicons” *scal* e/ou *ompA* foi realizado para as amostras classificadas como infectadas apenas com um membro do GFM e as amostras classificadas como co-infectadas. Nenhuma sequência *ompA* foi obtida para TC3, TC9, TC12 ou TC16. Além disso, não foram obtidas sequências de *scal* para as amostras TC27b, TC28 e TC29. As sequências *scal* (n=12) eram idênticas entre si e tinham 617 pb de comprimento (sem os iniciadores). As sequências apresentaram 100% de similaridade de nucleotídeos (617/617 bases) com sequências depositadas no GenBank como *scal* derivada de *R. amblytomattis* infectando um espécime de *A. neumanni* na Argentina (número de acesso CP015012) e de uma cepa de *R. amblyommatis* presente em um exemplar de *A. cajennense* coletado em Rondônia (número de acesso CP012420). As sequências obtidas para os “amplicons” *ompA* (n=14) tinham 587 pb de comprimento e eram idênticas entre si. A análise de uma busca “Blastn” demonstrou que as sequências apresentaram 100% de similaridade nucleotídica (587/587 bases) com uma sequência depositada como *ompA* de “*Candidatus R. amblyommii*” cepa AaPE, infectando um espécime de *A. auricularium* coletado em Pernambuco (número de acesso JX867426) e 99,8% similaridade de nucleotídeos (586/587bases) com a sequência KM042860 depositada como *ompA* de uma *Rickettsia* sp. não cultivada, infectando um e exemplar de *A. cajennense* coletado na Amazônia brasileira.

4.5 Identificação de carrapatos recuperados de espécimes de *P. maximus* utilizando os marcadores moleculares COI e ITS2.

Os dados relativos à amplificação dos marcadores moleculares COI e ITS2 são apresentados na Tabela 14. A amplificação foi observada para o “amplicon” COI em um total de 30/44 amostras, enquanto a amplificação do alvo ITS foi registrada para um total de 32/44 amostras. Conforme mostrado na Figura 14, a intensidade da amplificação foi menor do que a observada no caso dos carrapatos *A. auricularium* coletados de *E. sexcinctus*.

Tabela 14. Avaliação da intensidade de amplificação das amostras de *A. sculptum* para os alvos COI e ITS2 em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x).

Carrapato	COI	ITS2	Carrapato	COI	ITS2	Carrapato	COI	ITS2
MSC1	-	-	MS16	+++	+++	MS31	++	++
MSC2	+	-	MS17	+++	+++	MS32	++	-
MSC3	+	-	MS18	++	+++	MS33	++	++
MS4	-	-	MS19	+	+++	MS34	+	+
MS5	-	-	MS20	++	+	MS35	+	++
MS6	+	-	MS21	+++	+++	MS36	-	++
MS7	+	+++	MS22	++	+++	MS37	++	+
MS8	+	-	MS23	-	-	MS38	++	++
MS9	-	-	MS24	+	++	MS39	++	++
MS10	-	++	MS25	+	+	MS40	-	++
MS11	-	+	MS26	+	++	MS41	-	+
MS12	-	+	MS27	+	++	MS42	-	-
MS13	++	++	MS28	+	++	MS43	-	++
MS14	+++	+++	MS29	+	++	MS44	+	+
MS15	+++	+++	MS30	-	-			



Figura 13. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador (COI forward/COI reverse – 709 pb) usando DNA extraído de carrapatos preservados em etanol, para demonstrar a baixa intensidade de amplificação comparando com as amostras fixadas em RNALater. 1 a 22 correspondem as amostras de carrapato do Mato Grosso do Sul presentes na Tabela 2a, 23 e 24 *T. pretiosum*, C1 e C2= amostra de DNA de controle positivo (diluido 1:50 e 1:100) amostras, N1 e N2 =controles negativos água dentro e fora); L= GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

A análise PCR-RFLP de amplicons COI (n =9) usando a enzima *AluI* é mostrada na **Figuras 15**. A maioria (22/44) das amostras foram observadas gerando o perfil de 295pb; 243pb; 171pb (Scu1A) considerado característico para *A. sculptum*, a digestão das amostras restantes destacou o existência de dois novos perfis de bandas denominados Scu3A (405pb; 300pb para carrapatos MS27 e MS31) e Scu4A (360pb; 190pb para carrapatos MS29 e MS34).

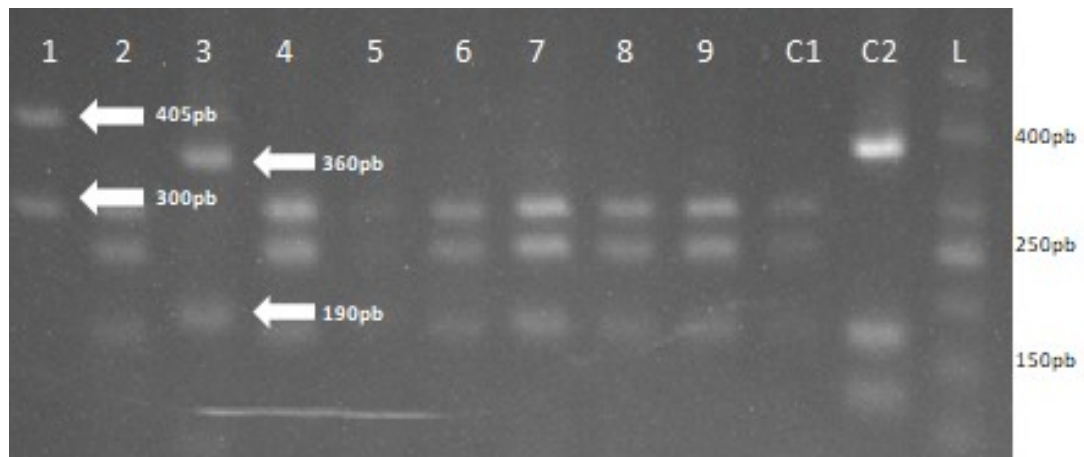


Figura 14. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *AluI* em fragmentos de COI (COI forward/COI reverse – 709 pb) de carrapatos associados a tatus canastra no MS. 1=MS31; 2=MS32; 3=MS34; 4=MS35; 5=MS37; 6=MS38; 7=MS39; 8=MS41; 9=MS44; C1= *A. sculptum*; C2= *A. romarioi* L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

A maioria (29/44) dos perfis obtidos para digestão dos amplicons ITS com a enzima produziram o mesmo perfil (700 pb e banda dupla de 310 pb) registado com o DNA controle de *A. sculptum* (Figuras 16 e 17). Porém, foram observadas algumas amostras que geraram perfis diferentes no gel 1 (Figura 16), sendo eles o carrapato MS13 (digestão parcial) e carrapato MS16 (700pb; 280pb; 280pb) e no gel 2 (Figura 17) onde as amostras MS27, MS35 e MS39 produziram um padrão onde a banda de 700 pb foi mantida, porém ao invés de render uma banda dupla de 310 pb, essas amostras apresentaram uma banda única de 310 pb e uma banda de 280 pb.

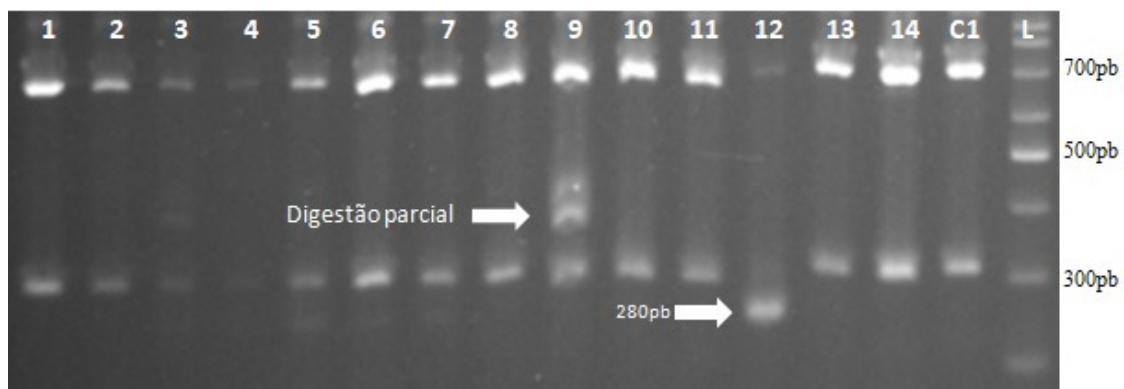


Figura 15. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *PstI* em fragmentos de ITS2 (ITS2 forward/ITS2 reverse – 800 a 1200 pb) dos carrapatos associados a tatus. 1=MS3; 2=MS5; 3=MS6; 4=MS7; 5=MS8; 6=MS10; 7=MS11; 8=MS12; 9=MS13; 10=MS14; 11=MS15; 12=MS16; 13=MS17; 14=MS18; *A. sculptum*; L= GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). A amostra MS13 apresenta digestão parcial, como mostrado na figura e amostras MS16 apresentando um padrão diferente do conhecido para *A. sculptum* em ITS2, enquanto as demais amostras apresentaram um padrão de bandas já conhecido para essa espécie de carrapato em ITS2.

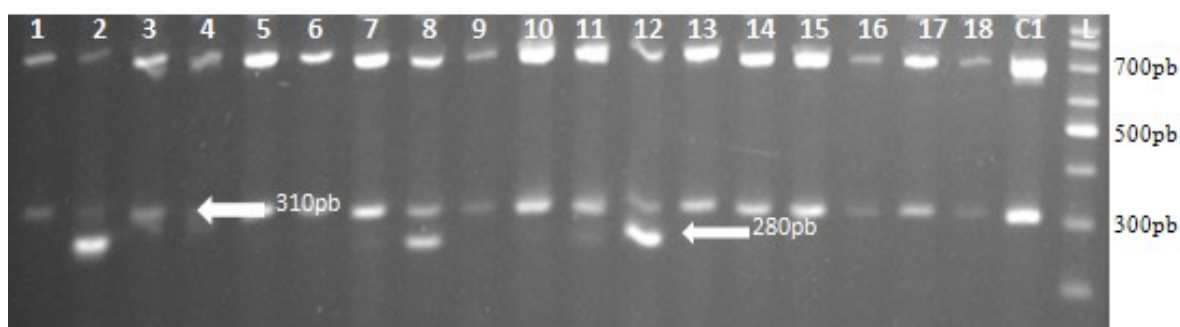


Figura 16. Padrões Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *Pst*I em fragmentos de ITS2 (ITS2 forward/ITS2 reverse – 800 a 1200pb) dos carrapatos associados a tatus canastra no MS. 1=MS26; 2=MS27; 3=MS28; 4=MS29; 5=MS30; 6=MS31; 7=MS33; 8=MS35; 9=MS36; 10=MS37; 11=MS38; 12=MS39; 13=MS40; 14=MS41; 15=MS42; 16=MS43; 17=*A. sculptum*; 18= *A. sculptum*; C1= *A. romarioi*; L= GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). As amostras 2, 8 e 12 (MS27, MS35 e MS39) tiveram um padrão diferente do esperado, onde foi possível observar a perda da banda dupla de 210pb, passando a ter um perfil de 700pb; 310pb; 280pb.

4.6 Detecção e caracterização de DNA de bactéria do gênero *Rickettsia* presente em carrapatos *A. sculptum* coletados de espécimes de *P. maximus* empregando análise PCR-RFLP baseada na amplificação do marcador específico do gênero *htrA*

Uma minoria (5/44) das amostras produziu “amplicons” com tamanhos iguais ou próximos a 407 pb (Figura 18). No entanto, a digestão dessas amostras com a enzima *Msp*I demonstrou que nenhuma das amostras gerou padrões de bandas compatíveis com qualquer um dos perfis contidos no banco de dados, indicando que os “amplicons” eram na verdade produtos inespecíficos.

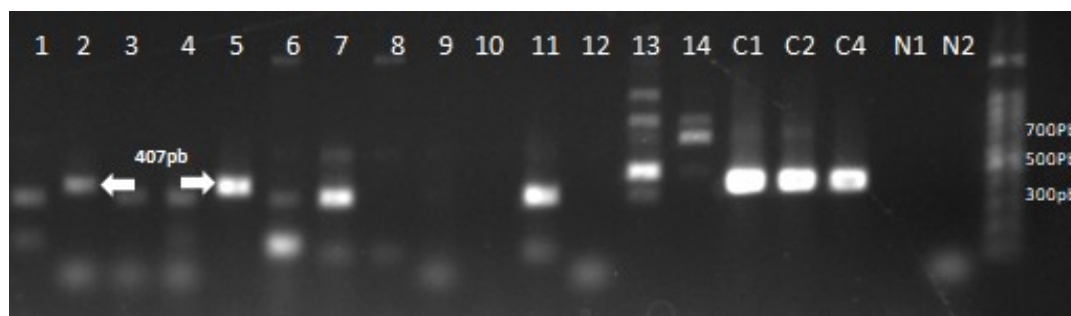


Figura 17. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador *htrA* (*htrA*forward/*htrA* reverse – 407 pb) dos carrapatos identificados tatus canastra no MS, usando como medidor um GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=MS11; 2=MS12; 3=MS13; 4=MS14; 5=MS15; 6=MS16; 7=MS17; 8=MS18; 9=MS19; 10=MS20; 11=MS21; 12=MS22; 13= *Trichogramma pretiosum*; 14= *Trichogrammapretiosum*; C1= *Rickettsia felis* 10⁻⁴; C2= *Rickettsia felis* 10⁻⁵; C3= *Rickettsia felis* 10⁻⁶; N1 e N2= Controles negativos. As amostras 2 e 5 (MS12 e MS15) tiveram *amplicons* do tamanho esperado para o alvo *htrA* comparando com as amostras controles e demais amostras gerando produto inespecífico de PCR

4.7 Detecção e caracterização de DNA de bactéria do gênero *Rickettsia* em *Amblyomma sculptum* coletados de espécimes de *Priodontes maximus* empregando análise baseada em PCR para os marcadores *ompA* e *sca9*

O DNA extraído das 44 amostras de carrapatos foi utilizado como molde em ensaios empregando os genes *ompA* e *sca9* como alvos. Foi observado que nenhuma amostra produziu amplicon para estes alvos. Como tal concluiu-se que nenhuma das amostras continha DNA amplificável oriundo de um espécie de *Rickettsia* membro do GFM ou de *Rickettsia bellii*.

4.8 Detecção e caracterização de DNA de *M. leprae* em *A. auricularium* coletado de espécimes de *E. sexcinctus* e em *A. sculptum* coletado de espécimes de *P. maximus* usando ensaios de PCR convencional e “nested” empregando a sequência multicópia RLEP como alvo

Experimentos iniciais foram realizados utilizando diluições quantificadas de DNA purificado de *M. leprae* com o objetivo de estabelecer os limites de detecção dos ensaios convencionais e “nested”. Observou-se que o ensaio convencional (externo) teve um limite de detecção de 5 fg de DNA genômico. Enquanto o ensaio “nested” foi determinado como tendo um limite de detecção de 0,5 fg de DNA genômico.

Uma avaliação inicial dos ensaios RLEP foi realizada utilizando as amostras de DNA (incluindo TC27a e TC27b), extraídas dos 30 espécimes de *A. auricularium* e das 44 amostras de DNA extraídos dos exemplares de *Amblyomma sculptum*. Observou-se que nenhuma das amostras foi positiva para o alvo RLEP, tanto no ensaio convencional quanto no “nested”. Porém, o bom funcionamento dos ensaios dentro dos limites de sensibilidade pré-determinados, foi confirmado pelos resultados obtidos com os DNAs controles que produziram amplicons com tamanho e intensidade esperados (Figuras 19 e 20).



Figura 18. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador R-lep(*R-lep*forward/*R-lep* Reverse) dos carrapatos associados a *Euphractus sexcinctus* no RN. 1=TC; 2=TC12; 3=TC19; 4=TC24; 5=TC28; 6=TC30; 7= *A. sculptum*; 8=*A. sculptum*; 9 e 10= *T. pretiosum*; 11=TC27 reextraído; C1= 1 pg de DNA *M. leprae*; C2= 500 fg de DNA *M. leprae*; C3= 50 fg de DNA *M. leprae*; C4= 5 fg de DNA *M. leprae*. N1 e N2 controles negativos; L= GeneRuler 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

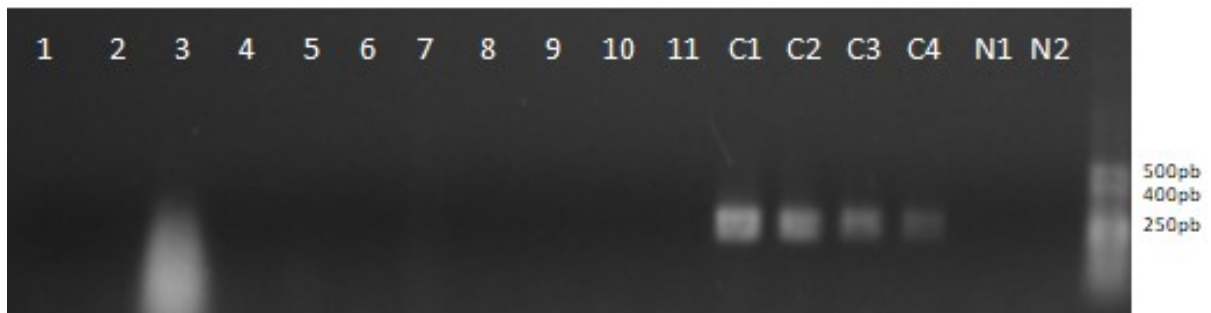


Figura 19. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo da amplificação baseada em PCR do marcador R-lep nested (*R-lepnestedforward/ R-lepnested Reverse -278*) dos carrapatos associados a *Euphractus sexcinctus* no RN, usando como medidor um GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). 1=TC11; 2=TC12; 3=TC19; 4=TC24; 5=TC28; 6=TC30; 7= *A. sculptum*; 8=*A. sculptum*; 9 e 10= *T. pretiosum*; 11=TC27 reextraído; C1= 500 fg de DNA *M. leprae*; C2= 50 fg de DNA *M. leprae*; C3= 5 fg de DNA *M. leprae*; C4= 0,5 fg de DNA *M. leprae*. N1 e N2 controles negativos; L= GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific).

Com base na observação de que uma segunda rodada de extração com fenol e clorofórmio da amostra TC27 resultou em uma amplificação melhorada de vários genes, um segundo experimento foi realizado para examinar a possibilidade de que DNA re-extraído pudesse permitir a detecção do alvo RLEP nas amostras de *A. auricularium*, que foram coletadas de tatus sabidamente infectados com *M. leprae*. Este experimento também repetiu a avaliação inicial realizada com as amostras de DNA (TC1-TC30) produzidas a partir da primeira extração com fenol-clorofórmio. Em comum com os dados obtidos no primeiro experimento os resultados desta análise foram todos negativos. Contudo, mais uma vez, os DNA controles funcionaram conforme esperado.

Uma análise final foi realizada para avaliar a possibilidade de a ausência de RLEP amplificável ter sido causada pela inibição dos ensaios. A possível inibição da PCR convencional foi examinada comparando-se a intensidade de amplificação obtida utilizando 50 fg de DNA com o molde com ou sem a inclusão de 2 µL de cada DNA teste à reação. Esta análise foi aplicado às amostras TC1-TC30 extraídas com fenol-clorofórmio do primeira processo, às mesmas 30 amostras da segunda extração com fenol-clorofórmio e também as 44 amostras de DNA extraídas dos carrapatos *A. sculptum*. Os resultados deste teste são mostrados na Figura 21 para um subconjunto representativo de amostras. Observou-se que a intensidade de amplificação registrada para os seis DNA controle (sem adição de DNA de carrapato) foi semelhante àquela registrada nas 23 amostras que incluíram 2 uL de DNA de carrapato.



Figura 20. Gel de agarose (1,5% - TAE 0,5x) corado em Brometo de etídeo das amplificação baseada em PCR do marcador R-lep (*R-lepforward/ R-lepReverse* -278pb) dos carrapatos associados a *Euphractus sexcinctus* no RN, usando como medidor um GeneRuler 100 bp DNA Ladder (Thermo Scientific) para teste de inibição de PCR. 1=TC10; 2=TC11; 3=TC12; 4=TC19; 5=TC24; 6=TC28; 7= TC30; 8=*A. sculptum*; 9= *A. sculptum*; 10 e 11= *T. pretiosum*; 12=TC27 Reextraído; 13= TC13; 14= TC14; 15= TC15; 16=TC16; 17=TC17; 18=TC18; 19= TC20; 20=TC21; 21=TC22; 22=TC23; 23=TC25; C1, C2, C3, C4, C5 e C6= Controles 50fg de DNA genômica de *M. leprae*.

Após todos os resultados desta análise e devido à ausência de evidências da presença do DNA derivado de *M. leprae* em qualquer um dos carrapatos e descartaram a possibilidade de que os resultados negativos fossem causados pela inibição dos ensaios.

4.9 Amplificação de amostras de DNA derivadas de carrapatos *Amblyomma auricularium* coletadas de espécimes de *Euphractus sexcinctus*, (extraídas usando um segundo procedimento de tratamento com fenol clorofórmio), com base em ensaios de PCR para os marcadores COI, *ompA* e *sac9* e posterior identificação de membros do GFM de *Rickettsia* por PCR- RFLP

Após obtenção de resultados positivos da segunda extração da amostra TC27, foi realizado um segundo processo de extração em todas as amostras e, assim, uma comparação do sucesso da amplificação de amostras de DNA extraídas usando uma única ou duas extrações com fenol clorofórmio é apresentada na Tabela 15. Em relação às amostras fixadas em formol (TC1-TC9), os resultados dos três ensaios foram semelhantes quanto ao número de amostras positivas e quanto à intensidade de amplificação. Porém, amostra TC3 mostrou amplificação (+) do alvo *ompA* após re-extração enquanto as amostras T5 a T8 permaneceram negativas para amplificação de qualquer um dos marcadores. Um resultado notável foi a amplificação (+) do marcador COI na amostra TC9 oriunda da segunda extração, que tem sido negativa na primeira extração, bem como a amplificação fraca (+) do *ompA*. Como tal, as amostras TC3 e TC9 eram agora adequadas para serem examinadas por PCR-RFLP. Em comum com TC3 e TC9, duas amostras preservadas em RNALater (TC12 e TC16; classificadas como co-infectadas) apresentaram amplificação fraca (+) de *ompA* após re-extração, permitindo-as serem utilizadas em PCR-RFLP. Em contrapartida, o DNA obtido da segunda extração das amostras TC13, TC25, TC26, TC28 e TC29 não conseguiu amplificar o marcador *ompA* e todos mostraram uma redução na intensidade de amplificação do alvo *sac9* quando comparado com a amplificação registrada usando DNA produzido na primeira extração.

Tabela 15. Dados comparativos de amplificação para o gene COI, *ompA* dog e *Sca9* das duas extrações realizadas no DNA dos carrapatos em gel de agarose (1,5% -TAE 0,5x).

*Amostras fixadas em formol; ** DNA da terceira extração para essa amostra;

DNA	COI		<i>OmpA</i>		<i>Sca9</i>	
	1ª Extração	2ª Extração	1ª Extração	2ª Extração	1ª Extração	2ª Extração
TC1*	++	-	++	+	+	-
TC2*	++	+	-	-	+++	-
TC3*	++	+	-	++	-	-
TC4*	++	++	-	-	+++	+++
TC5*	-	-	-	-	-	-
TC6*	-	-	-	-	-	-
TC7*	-	-	-	-	-	-
TC8*	-	-	-	-	-	-
TC9*	-	+	-	+	-	-
TC10	++	++	-	-	+++	+++
TC11	+	++	-	-	-	-
TC12	++	+++	-	+	+++	+++
TC13	++	+++	+	-	+++	+
TC14	++	+++	++	++	+++	++
TC15	++	+++	++	++	+++	+++
TC16	++	++	-	+	+++	+
TC17	++	+++	++	++	+++	+
TC18	++	++	-	-	++	-
TC19	-	+++	+++	+++	+	-
TC20	++	+++	+++	++	+++	++
TC21	++	+++	+++	+++	+++	++
TC22	++	+++	+++	+++	+++	+++
TC23	++	+++	+++	+++	+++	+++
TC24	++	+++	+++***	+++	-	-
TC25	++	+++	+	-	+++	++
TC26	++	+++	+	-	++	-
TC27	-	++**	-	-**	-	-**
TC28	++	++	+	-	+	-
TC29	++	+	+	-	+++	-
TC30	++	++	-	-	-	-

Os resultados da análise PCR-RFLP (com a enzima *RsaI*) dos “amplicons” *ompA* demonstraram que as amostras TC3, TC12 e TC16 (que não haviam sido examinadas na análise anterior) continham DNA de *R. amblyomattis* (com base no perfil de bandas de 156 pb, 108 pb e 93pb (Figura 22). Além disso, foi confirmada a presença de DNA de *R. amblyommatis* para as amostras TC14, TC15, TC17, TC19, TC20, TC21, TC22 e TC23 e TC27 (Figura 22). TC9 produziu perfis de bandas que indicaram a presença de *R. parkeri*, com bandas de 267 e 93 pb (Figura 22). Assim, foi possível identificar as amostras infectadas com diferentes espécies de *Rickettsia* e classificá-las a nível de espécie (Tabela 16).

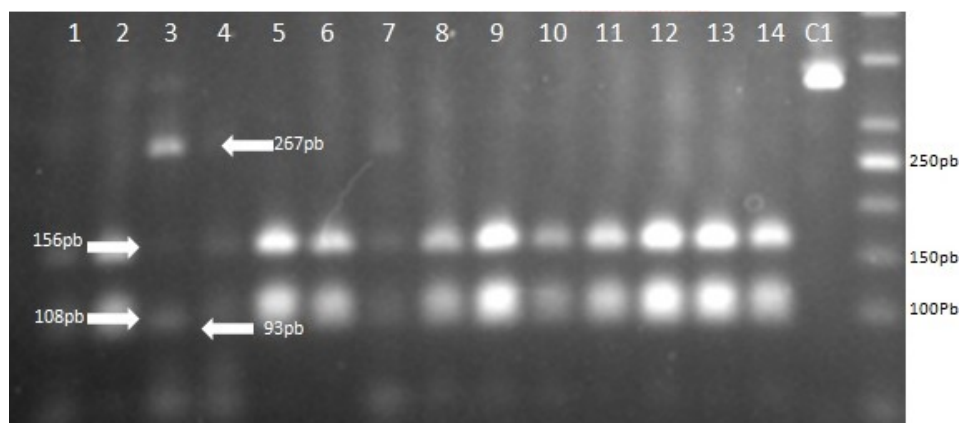


Figura 21. Gel de agarose (2,5% - TBE 1x) corado em Brometo de etídeo utilizado para identificação molecular por PCR-RFLP de carrapatos pela digestão com endonucleases de restrição *RsaI* em fragmentos de *ompA* dog (*ompA* dog forward/*ompA* dog reverse – 357 pb) das *Rickettsia* spp. 1=TC1; 2=TC3; 3= TC9; 4=TC12; 5=TC14; 6=TC15; 7=TC16; 8=TC19; 9=TC20; 10=TC21; 11=TC22; 12=TC23 e 14=TC24; C1=controle positivo de *Rickettsia monteiroi*; L= GeneRuler 50 bp DNA Ladder (Thermo Scientific). As amostras 3, 4 e 7, referentes aos carrapatos TC9, TC12 e TC 16, respectivamente apresentaram perfil compatível com coinfeção de *Rickettsia amblyommatis* e *Rickettsia parkeri*, enquanto as demais amostras (TC1, TC3, TC 14, TC15, TC17, TC19, TC20, TC21, TC22, TC23 e TC24) apresentam perfil compatível apenas de infecção com *Rickettsia amblyommatis*, confirmando os resultados obtidos da primeira extração.

Nenhuma análise de sequenciamento foi realizada com os amplicons produzidos a partir dos DNAs re-extraídos.

5. DISCUSSÃO

Há uma longa tradição nas ciências veterinárias e médicas de estudar carrapatos tanto como ectoparasitos quanto como vetores de doenças. No entanto, seria justo afirmar que até recentemente a maioria desses estudos se concentrava num número limitado de espécies de carrapatos, principalmente aquelas associadas a grandes perdas econômicas na produção animal e aquelas que transmitem doenças aos animais de estimação e/ou aos seres humanos. No entanto, apesar do foco contínuo nesses tópicos, os últimos 20 anos testemunharam uma transição, cada vez maior, para o estudo de carrapatos associados à vida selvagem. Este foi claramente o caso na América do Norte, principalmente em relação à doença de Lyme causada por bactérias do gênero *Borrelia* e transmitida por carrapatos do gênero *Ixodes*, cujo ciclo de vida envolve o cervo de cauda branca (*Odocoileus virginianus*) e o rato-de-pés-brancos (*Peromyscus leucopus*). A doença de Lyme é hoje um importante problema de saúde pública nos EUA, onde tem se expandido constantemente e continua em termos do número de casos por ano, que agora é estimado em aproximadamente 30.000, e também em relação à distribuição geográfica desses casos.

Apesar de nenhuma situação equivalente ou tão dramática ter sido reconhecida na América Latina, teve um aumento significativo no estudo de carrapatos associados à vida silvestre durante os últimos 20 anos. A maior parte dessas pesquisas foi produzida por investigadores brasileiros, argentinos e colombianos e cada vez mais os pesquisadores brasileiros contextualizam seus estudos dentro do conceito de saúde única. Esta tendência desenvolveu-se no meio de preocupações crescentes sobre os possíveis efeitos que as alterações climáticas, a desflorestação e a urbanização descontrolada podem exercer sobre a distribuição de carrapatos e as doenças que eles transmitem como, por exemplo, a febre maculosa, bem como doenças emergentes que podem ser transmitidas por carrapatos. A maioria dos estudos realizados até o momento envolve levantamentos de espécies de carrapatos associados à vida selvagem brasileira, juntamente com detecção molecular e identificação de patógenos, de potenciais patógenos e cada vez mais dos endossimbiontes associados aos carrapatos. No entanto, apesar deste esforço substancial, a maior parte dos resultados são essencialmente descritivos e ainda existem inúmeras lacunas na nossa compreensão da biologia e ecologia da maioria das espécies de carrapatos, e da dinâmica das doenças por eles transmitidas, nos territórios do Brasil.

O presente estudo teve dois objetivos principais, ligados a dois grupos de patógenos intracelulares. O objetivo principal foi examinar carrapatos coletados de tatus de peba e tatus gigantes para a presença de *M. leprae* e o objetivo secundário foi examinar os mesmos carrapatos para a presença de bactérias do gênero *Rickettsia*. Com base em observações anteriores, de que carrapatos coletados de tatus em diversas regiões do Brasil incluindo o Rio Grande do Norte estavam infectados com as espécies *R. amblyommatis* e *R. bellii* (SARAIWA et al., 2013; COSTA et al., 2017; SILVA et al., 2018) considerou-se provável que esses organismos seriam encontrados nas amostras examinadas neste estudo. Em contrapartida, a detecção de *M. leprae* em carrapatos, mesmo em amostras coletadas de tatus sabidamente infectados com esse patógeno, como foi o caso deste estudo (FERREIRA et al., 2020), foi considerada relativamente mais difícil a comprovar.

A base para a realização deste aspecto do projeto surgiu a partir de dados produzidos de dois estudos recentes que forneceram evidências de que carrapatos do gênero *Amblyomma* poderiam manter *M. leprae* dentro de seus tecidos por períodos

prolongados após a introdução da bactéria através de alimentação artificial ou injeção direta no trato gastrointestinal ou na hemolinfa (FERREIRA et al., 2018; TONGLUAN et al., 2021). Além disso, esses estudos sugeriram que o agente patogénico poderia ser transmitido horizontalmente para coelhos através de picadas de carrapatos e que também poderia ser mantido nas populações de carrapatos através da transmissão transovariana (FERREIRA et al., 2018; TONGLUAN et al., 2021) e por transmissão transestadial (TONGLUAN et al., 2021). Os autores de ambos os estudos argumentaram que seus achados apontavam para um papel dos carrapatos como um potencial meio de transmissão do *M. leprae* aos humanos, com base no fato de que o contato com carrapatos infectados poderia ocorrer durante a caça de tatus, a manutenção de animais capturados para engorda ou durante os processos de abate e preparação dos animais como fonte de alimento.

Com base nas diferentes probabilidades de sucesso no cumprimento dos objetivos propostos, o estudo focou inicialmente na detecção de *Rickettsia*. Ainda assim, dado que o número de carrapatos coletados para análise no Rio Grande do Norte (n=30) foi considerado pequeno, optou-se por estender as análises para incluir uma população adicional de carrapatos (n=44), coletados de uma segunda espécie de tatu em outra região do Brasil. Como previsto, o estudo forneceu suporte a observações anteriores de que *A. auricularium*, coletado de tatus de peba, podem atuar como hospedeiros de *R. amblyommatis* e *R. bellii* (SARAIWA et al., 2013; COSTA et al., 2017). Além disso, demonstrou pela primeira vez que tanto ninfas quanto adultas de *A. auricularium* estavam coinfectados com essas duas espécies de *Rickettsia*. A importância desta observação foi aumentada pelo fato de a coinfeção ter sido demonstrada pela maioria (14/26=53,9%) das amostras que continham DNA amplificável. Neste contexto, é pertinente notar que o DNA de quatro dos nove carrapatos (TC4-TC8) que foram preservados em formol não produziu “amplicon” em nenhum dos ensaios de PCR utilizados no estudo, incluindo os 3 ensaios utilizados para detectar o DNA do carrapato. Como tal, os dados recolhidos dos carrapatos foram apresentados e discutidos em termos dos níveis registados nos 26 carrapatos restantes, onde amplificação foi observada. O segundo estado de infecção mais frequentemente observado (8/26 =30,7%) foi a classificação como infectado apenas por *R. bellii*. Apenas dois carrapatos (7,7%) foram registados como infectados exclusivamente por *R. amblyommatis* e outros dois carrapatos (TC11 e TC30) foram classificados como negativos para a presença de DNA de *Rickettsia*. No entanto, é importante notar que esses dois carrapatos produziram “amplicons” para cada um dos três marcadores (16SrDNA, COI e ITS2) utilizados para confirmar a presença de DNA do carrapato, indicando que os resultados negativos foram na verdade um reflexo da ausência de DNA de *Rickettsia* nos dois carrapatos.

A classificação inicial do estado de infecção foi baseada em dados gerados pela análise PCR-RFLP do marcador específico do género *Rickettsia* (*htrA*). No entanto, para chegar às classificações definitivas aqui relatadas, foi necessário aplicar uma análise sistemática utilizando uma estratégia que empregou alguns marcadores que não são comumente empregados para a detecção de *Rickettsia* em carrapatos (por exemplo, *sca2*), e conduziu extensas análises pós-amplificação, que combinaram as técnicas de PCR-RFLP e sequenciamento dos “amplicons”. O uso de PCR-RFLP como meio de fornecer identificação em nível de espécie da bactéria *Rickettsia* presente em carrapatos brasileiros tem sido empregado por nosso grupo de pesquisa desde 2013 (SANTOLIN., et al. 2013), e tem passado por um processo contínuo de adaptação e validação em resposta à quase constante descoberta de novas espécies ou espécies “*Candidatus*” de

Rickettsia tanto em carrapatos quanto em pulgas no Brasil (SANTOLIN., et al. 2013, ABREU, et al., 2019; PEIXOTO et al., 2021).

Os esforços para fornecer evidências definitivas de coinfeções foram construídos com base em métodos previamente desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa (ABREU et al., 2019), que demonstraram a existência de coinfeções com *R. amblyommatis* e *R. bellii* em *Amblyomma longirostre* e *Amblyomma calcaratum* e coinfeções com *R. bellii* e “*Candidatus R. paranaensis*” em carrapatos *A. romarioi* coletados de aves silvestres no Sudeste do Brasil. Para obter esses resultados foi necessário desenvolver novos ensaios de PCR específicos para membros do GFM (*ompA*) e para *R. bellii* (*sca9* e *sca14*), e a utilização desses métodos foi fundamental para garantir a veracidade dos dados apresentados no estudo atual. No entanto, deve-se notar que as classificações iniciais de coinfeção (n= 8) foram fornecidas utilizando o ensaio PCR-RFLP empregando “amplicons” de *htrA* acoplado à digestão com a enzima *MspI*, conforme relatado por Santolin et al, (2013). A aplicação dos ensaios adicionais direcionados a sequências específicas de *R. bellii* (*sca2*, *sca9* e *sca14*), serviu para identificar mais quatro amostras coinfectadas entre os seis carrapatos que foram inicialmente classificados como infectados com apenas um membro indeterminado do GFM. Posteriormente, a utilização de três ensaios que forneceram amplificação específica de sequências presentes nos membros do GFM (*sca1*, *ompA* e *ompB*) mas ausentes em *R. bellii*, permitiu a identificação de mais duas amostras coinfectadas, entre os 10 carrapatos que haviam sido anteriormente considerados infectados apenas com *R. bellii*.

A abordagem utilizada neste estudo, embora relativamente trabalhosa, foi considerada vantajosa em comparação com a estratégia mais comumente utilizada de amplificação dos marcadores específicos do gênero (geralmente *htrA* e *gltA*), seguida pela amplificação de todas as amostras identificadas com positivas para esses marcadores, usando *ompA* e/ou *ompB* (onde a positividade indicaria a presença de um membro do GFM e a negatividade seria sugestiva de infecção por *R. bellii*) conforme relatado em vários estudos (MCINTOSH et al., 2015; ZERINGÓTA et al., 2017; LUZ et al., 2017). A identificação definitiva das bactérias seria subsequentemente obtida usando o sequenciamento de pelo menos dois dos marcadores. Porém, é de suma importância destacar que os resultados das análises PCR-RFLP podem ser obtidos em 36 horas, enquanto as informações fornecidas pelo sequenciamento (principalmente quando dependentes de serviços oferecidos por laboratórios terceiros) podem levar mais de duas semanas para ficarem disponíveis.

É relevante ressaltar que o acoplamento de ensaios de PCR ao uso de RFLP representa uma alternativa pelo custo-benefício ao sequenciamento, que continua sendo o principal método empregado para identificação de *Rickettsia* em estudos realizados no Brasil. Porém, apesar da comprovada precisão dos métodos de PCR-RFLP, é pertinente observar que o sequenciamento de pelo menos uma porção dos “amplicons” deveria ser realizado para confirmação dos dados de PCR-RFLP e para detectar polimorfismos de sequência não localizados dentro dos sítios de restrição. No entanto, como foi o caso dos “amplicons” 16S rDNA, COI e *sca2* examinados no presente trabalho, o uso de PCR-RFLP pode ocasionalmente fornecer evidências de polimorfismo de nucleotídeos nas populações de teste.

No caso dos marcadores de DNA de carrapatos, três amostras demonstraram perfis de bandas que divergiam dos perfis contidos no banco de dados utilizado para identificação de carrapatos em nível de espécie. Esta observação levantou a possibilidade de que esses carrapatos (todas ninfas) possam ter sido identificados incorretamente como *A. auricularium* com base em caracteres morfológicos. Esta

preocupação foi descartada uma vez que sequenciamento dos marcador 16S rDNA demonstrou que eles representavam um haplótipo, previamente relatado no Maranhão, confirmando os dados morfológicos.

Curiosamente, e apesar dos dados obtidos a partir do sequenciamento do marcador 16S rDNA, os dados obtidos através do sequenciamento dos “amplicons” COI indicaram que os carrapatos provavelmente não eram *A. auricularium*, com base no fato de apresentarem níveis de semelhança de apenas 88% a 89% com sequências depositadas como derivadas de adultos de *A. auricularium* por pesquisadores do Panamá (MILLER et al, 2017). Existem duas explicações possíveis para isso, (a) os níveis de dissimilaridade (11% e 12%) observado entre espécimes brasileiros e panamenhos de *A. auricularium* são de fato muito maior do que foi observado anteriormente para isolados co-específicos de qualquer espécie do gênero *Amblyomma* na América Latina, incluindo *A. parvum* que mostra níveis de variação de 6 a 8% (NAVA et al., 2008; LADO et al., 2016) ou (b) as identificações morfológicas feitas pelos pesquisadores panamenhos estavam incorretas. Infelizmente, nenhuma destas possibilidades pode ser respondida definitivamente devido a deficiências na quantidade de sequências COI depositadas na base de dados GenBank para *A. auricularium* e ao fato de os investigadores panamenhos não terem fornecido dados de sequência para 16S rDNA para as suas amostras. No entanto, com base na observação de que as sequências de 16S rDNA produzidas no presente estudo apresentaram níveis de 100 a 99% de similaridade de nucleotídeos com as 12 sequências depositadas no Genbank como 16SrDNA derivado de *A. auricularium*, considera-se provável que os carrapatos examinados pelo grupo do Panamá não eram de fato *A. auricularium*. Uma possível forma de resolver isso seria solicitar DNA das amostras panamenhas e realizar o sequenciamento do 16S rDNA.

A análise PCR-RFLP dos “amplicons” *sca2* obtidos de carrapatos infectados com *R. bellii* gerou um perfil de bandas distinto quando comparado ao registrado para o DNA controle de *R. bellii*. A análise das sequências associadas a novo padrão de bandas demonstrou que os “amplicons” *sca2* de *A. auricularium* (724 pb) eram três nucleotídeos maiores e mostraram diferenças adicionais de quatro nucleotídeos em comparação com as sequências correspondentes (721 pb) relatadas para três amostras de *R. bellii* detectadas em carrapatos da América do Norte. Não existem sequências para este alvo de isolados brasileiros de *R. bellii* no GenBank. É importante ressaltar que os nucleotídeos adicionais foram organizados como um códon (AGT) que codifica o aminoácido serina. A presença deste aminoácido adicional resultaria numa alteração na estrutura terciária da proteína *sca2*, o que poderia afetar a forma como a proteína funciona dentro do hospedeiro e/ou como o hospedeiro responderia à presença da bactéria. Neste contexto, a proteína *sca2* fornece um mecanismo para a motilidade e a subsequente disseminação de célula para célula através da produção de caudas de actina, e é vista como um importante fator de virulência (BLANC et al., 2005; OGATA et al., 2006; OLIVER et al., 2014; SAHNI et al., 2019). Curiosamente, a nova sequência *sca2* e as três sequências norte-americanas mostraram, cada uma, extenso polimorfismo de sequência (diferenças de 18 a 20 nucleotídeos) em relação à sequência (724 pb), correspondente registrada para uma cepa de *R. bellii* isolada de *A. neumanni* na Argentina que continha um códon (AAT) na mesma posição que o códon AGT presente na nova sequência.

A bactéria *R. bellii* pertence a um grupo basal de riquetsias que divergiram antes das espécies *Rickettsia* do grupo da febre maculosa patogênica e do grupo do tifo. Apesar da representação de *R. bellii* em mais de 25 espécies de carrapatos duros e moles no continente americano, as relações filogeográficas entre as cepas desta espécie são

desconhecidas. Uma tentativa de esclarecer este tópico foi realizada (KRAWCZAK et al., 2018), através do exame de três genes codificadores de proteínas (*gltA*, *atpA* e *coxA*) e duas regiões intergênicas (*rpmE-tRN* e *RC1027-xthA2*) amplificadas de cepas recuperadas na América do Norte (n=15), Brasil (n=14) Argentina (n=1) Este exercício demonstrou uma clara separação de quase todos os isolados entre os dois continentes americanos. No entanto, os autores sugeriram que, além da origem geográfica, o hospedeiro específico do carrapato poderia estar servindo como um fator que impulsiona a divergência de sequência observada (KRAWCZAK et al., 2018). A análise de sequências dos “amplicons” de *sca9*, *sca14*, *atpA* e *coxA* produzidos no presente estudo mostrou quase nenhum polimorfismo quando comparados com sequências obtidas para isolados de *R. bellii* da América do Norte e do Sul. Dado o polimorfismo mais extenso observado com as sequências *sca2* da América Latina (um gene que codifica uma proteína localizada na superfície celular e que interage diretamente com os mecanismos imunológicos do carrapato), poderia ser valioso examinar o polimorfismo presente nas sequências *sca2* dos isolados examinados no estudo anterior.

Em relação aos *Rickettsias* do GFM encontrados infectando os carrapatos *A. auricularium*, os dados de PCR-RFLP dos “amplicons” *ompA* (360 pb), produzidos a partir de amostras de DNA recuperadas de uma única rodada de extração com fenol clorofórmio, demonstraram que eles estavam infectados com *R. amblyommatis*. Este achado foi inicialmente confirmado pelo sequenciamento de amplicons *sca1* (657pb). Deve-se considerar que não há “amplicons” *sca1* depositados no GenBank como derivados de *R. amblyommatis* infectando *A. auricularium* ou qualquer outra espécie de carrapato recuperada de tatus no Brasil. Como tal, a significância dos valores de similaridade obtidos limitou-se à confirmação da identificação como *R. amblyommatis*. O ensaio *scaI* utilizado no presente trabalho tem sido pouco empregado por pesquisadores brasileiros, com a maioria mostrando preferência pelos marcadores *htrA* e *gltA* (SARAIVA et al., 2013; MCINTOSH et al., 2015; COSTA et al., 2017; ZERINGÓTA et al., 2017; LUZ et al., 2017; LOPES et al., 2018; PACHECO et al., 2021). No entanto, ao trabalhar com carrapatos co-infectados com *R. bellii* e *Rickettsia* do GFM, a presença de dois “amplicons” gerados nos ensaios *htrA* e *gltA* servirá para complicar ou mesmo invalidar a interpretação dos eletroferogramas produzidos pelo sequenciamento Sanger. Na verdade, foi exatamente por esse motivo que os ensaios de PCR para *sca9* e *sca14* foram desenvolvidos pelo nosso grupo de pesquisa (ABREU et al., 2019).

Em contraste com *sca1*, sequências de “amplicons” de *ompA* (587 pb sem primers), produzidos com os primers Rr.190.70p/ Rr.190.701n foram depositadas no GenBank para várias cepas de *R. amblyommatis* infectando *A. auricularium* coletadas de uma variedade de fontes incluindo vida livre, tatus, roedores e tamanduá, em diferentes regiões do Brasil (SARAIVA et al., 2013; COSTA et al., 2017; LOPES et al., 2018; PACHECO et al., 2021). Além disso, as sequências *ompA* estão disponíveis no GenBank como derivadas de cepas de espécies adicionais de carrapatos, por exemplo, *A. pseudoconcolor* coletadas de tatus peba em Pernambuco (SILVA et al., 2018). Todas as sequências *ompA* obtidas neste estudo demonstraram 100% de similaridade nucleotídica (587/587 bases) com sequências depositadas como *ompA* de “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” cepa AaPE infectando uma amostra de *A. auricularium*, infestando espécimes de *E. sexcinctus* coletados em Pernambuco. Curiosamente, a submissão das novas sequências *ompA* às análises “MegaBlast” (sequências altamente semelhantes) ou “Blastn” (sequências menos semelhantes) não revelou qualquer nível de similaridade entre as sequências *ompA* registradas no presente estudo e aquelas

(MG74589 e MG74590) relatado em carrapatos *A. pseudoconcolor* coletados de espécimes de *E. sexcinctus* (SILVA et al., 2018).

Este foi um resultado intrigante, que foi esclarecido através de um reexame dessas sequências, os quais foram produtos de um ensaio de PCR que utilizou o mesmo iniciador "forward" Rr.190.70p, mas um iniciador reverso alternativo Rr.190.602n resultando em "amplicons" de 530 pb (com primers) e 488pb (sem primers). Observou-se que as sequências MG74589 e MG74590 foram depositadas com comprimentos de 511 pb e 504 pb, respectivamente, devido à presença de sequências correspondentes aos iniciadores de amplificação. Após a remoção das sequências iniciadoras, o comprimento das sequências foi de 488 pb (derivado de MG74589) e 486 pb (derivado de MG74589). Curiosamente, o tamanho reduzido de MG74589 foi causado pela presença de dois "gaps" localizadas na extremidade 3' da sequência, possivelmente devido a dados de eletroferograma de baixa qualidade, que serviram para distorcer os resultados da análise de "Blastn". A remoção da região contendo as "gaps" resultou em uma sequência de 462pb de comprimento. O alinhamento das sequências ajustadas com as sequências *ompA* gerada no presente trabalho mostrou que elas foram idênticas. Este achado sugere que as cepas de *R. amblyommatis* que infectaram *A. pseudoconcolor* em Pernambuco e aquelas identificadas no presente estudo estão altamente relacionadas. É importante ressaltar que as cepas pernambucanas foram analisadas utilizando marcadores adicionais (*htrA*, *gltA*, *ompB* e *scaD*) e pesquisas futuras devem ter como objetivo repetir essas análises com o DNA extraído dos carrapatos coletados em nossa investigação.

A decisão de ampliar o estudo para incluir uma segunda população de carrapatos coletados de tatus (*P. maximus*) em Mato Grosso do Sul foi tomada principalmente em relação ao objetivo de investigar a presença de infecções com *M. leprae*. Porém, assim como as amostras do Rio Grande do Norte, os carrapatos foram inicialmente examinados por métodos moleculares para confirmar as identificações com base em critérios morfológicos e posteriormente para investigar a presença de DNA de *Rickettsia*. Uma grande diferença entre os dois grupos de amostras foi o método de fixação utilizado. Assim, os carrapatos do MS foram armazenados em etanol a 70%, em vez de RNALater. No entanto, os carrapatos em ambos os estudos foram mantidos em suas respectivas soluções fixadoras por períodos semelhantes (6 anos) antes da extração em 2023. Uma diferença importante adicional foi o fato de que os carrapatos coletados de *P. maximus* eram quase exclusivamente adultos de *A. sculptum*. Esta espécie de carrapato foi relatada em associação com diferentes espécies de tatu, incluindo *P. maximus* e *E. sexcinctus* em MS (MIRANDA et al., 2010; MEDRI et al., 2010; KLUYBER et al., 2016). No entanto, não foram apresentados dados sobre a presença de *Rickettsia* nos carrapatos coletados nesses estudos. A confirmação da identificação dos carrapatos como *A. sculptum* foi obtida pela análise PCR-RFLP dos "amplicons" COI e ITS2. No entanto, isso não foi possível para todos os carrapatos, dado o fato de que uma porção de amostras não proporcionou amplificação dos marcadores e que a intensidade da amplificação dos marcadores foi inferior àquela observada com os carrapatos *A. auricularium*. Diferenças quantitativas e qualitativas semelhantes no sucesso da amplificação entre amostras fixadas em álcool (etanol ou isopropanol) em comparação com amostras fixadas em RNALater, têm sido frequentemente observadas no nosso laboratório (VARELA, 2016), e considera-se provável que os resultados observados com os carrapatos examinados neste estudo provavelmente refletiram o uso de etanol 70% como meio de preservação. Dada a amplificação limitada dos marcadores de carrapatos, parecia provável que a capacidade de detectar DNA de *Rickettsia* também seria limitada. Na verdade, foi esse o caso, sem amplificação

registrada para nenhum dos marcadores (*htrA*, *ompA* e *sca9*). Contudo, é pertinente notar que apesar de ser o agente etiológico da febre maculosa brasileira, a infecção de *A. sculptum* por *Rickettsia* é frequentemente limitada a apenas alguns carrapatos dentro de uma população (BARRANTES et al., 2019). Este é definitivamente o caso em relação a *R. rickettsii* (Costa et al., 2020), mas também se aplica a *R. amblyommatis* (NUNES et al., 2015), *R. bellii* (QUADROS et al., 2021) e a *R. parkeri* (HIGA et al., 2020). Como tal, a falta de detecção de *Rickettsia* nas amostras de *A. sculptum* do MS, pode ter resultado dos níveis naturalmente baixos de infecção associados a esta espécie de carrapato.

Mycobacterium leprae foi identificado como o agente etiológico da hanseníase em 1873. No entanto, apesar de quase 150 anos de conhecimento acumulado, a hanseníase ainda guarda algumas surpresas. Neste contexto, em algumas regiões do México e do Caribe a hanseníase é causada pelo *M. lepromatosis*, refutando a teoria do *M. leprae* como único agente etiológico (HAN et al., 2008). Além disso, surgiu um possível papel para animais incluindo tatus, esquilos e primatas não humanos na ecologia de *M. leprae* e *M. lepromatosis* (FROTA et al., 2012; SHARMA et al., 2015; da SILVA FERREIRA et al., 2020). De fato, foi demonstrado inequivocamente que os tatus-galinha (*Dasypus novemcinctus*) estão envolvidos tanto na manutenção como na transmissão de cepas patogênicas humanas de *M. leprae* nos Estados Unidos da América, onde a hanseníase é atualmente classificada como uma doença zoonótica (SHARMA et al., 2015).

O Brasil tem o segundo maior número de casos de hanseníase no mundo e demonstra a maior incidência da doença nas Américas. O estado do Rio Grande do Norte (RN) apresenta um dos menores coeficientes de detecção do país, mas o município de Mossoró, localizado no leste daquele estado, é hiperendêmico para a doença (da SILVA FERREIRA et al., 2020). Curiosamente, esta região mantém uma população substancial de tatus peba (*E. sexcinctus*) e as práticas de caça e consumo desses tatus são comuns tanto nas populações rurais como nas urbanas (FROTA et al., 2012; da SILVA FERREIRA et al., 2020). Abordagens integradas baseadas em dados sorológicos, moleculares e clínicos apoiaram as investigações epidemiológicas que revelaram a participação dos tatus na hanseníase zoonótica no sul dos EUA (SHARMA et al., 2015) e há um conjunto limitado, mas crescente, de dados moleculares, histopatológicos e epidemiológicos que apontam para o mesmo papel dos tatus de nove bandas no Brasil (FROTA et al., 2012; FERREIRA et al., 2018; da SILVA FERREIRA et al., 2020).

Os pesquisadores têm explorado o papel potencial dos artrópodes na transmissão da hanseníase há mais de 80 anos. Assim, estudos examinaram o potencial dos carrapatos adquirirem e transmitirem o *M. leprae* (SOUZA-ARAUJO, 1941). Embora não tenham sido geradas provas conclusivas, o seu papel nunca foi totalmente desconsiderado (FINE, 1982). É importante ressaltar que os tatus podem ser infestados por uma variedade de carrapatos pertencentes ao gênero *Amblyomma*, incluindo *A. sculptum*, *A. auricularium* e *A. parvum* no Brasil e *A. maculatum* nos estados do sul dos EUA.

Estudos recentes baseados na infecção artificial de *A. sculptum* (FERREIRA et al., 2018) e *A. maculatum* (TONGLUAN et al., 2021) com *M. leprae* serviram para estimular um interesse renovado no papel potencial dos carrapatos como agentes da lepra zoonótica. No caso de *A. sculptum*, RNA e antígenos de *M. leprae* foram registrados como persistentes no intestino médio e presentes nos ovários de fêmeas adultas pelo menos dois dias após a infecção oral, e estavam presentes em sua progênie (ovos e larvas). Esses dados foram interpretados como demonstrativos da ocorrência de

transmissão transovariana desse patógeno. Além disso, larvas de carrapatos infectadas foram consideradas capazes de inocular bacilos viáveis durante a alimentação sanguínea, utilizando um coelho como hospedeiro. Uma constatação que na opinião dos autores indicou um papel de *A. sculptum* como vetor competente de *M. leprae* (FERREIRA et al 2018).

Em estudo posterior com *A. maculatum* (TONGLUAN et al., 2021), observou-se que carrapatos infectados como ninfas abrigavam *M. leprae* por meio de eventos de transmissão vertical (ninfas para adulto e adulto para progênie); bem como possível transmissão horizontal do *M. leprae* para hospedeiros vertebrados. Esses dados foram sugeridos como suporte adicional para a hipótese de que os carrapatos *Amblyomma* podem apresentar competência vetorial para *M. leprae*.

Os experimentos realizados no presente estudo, utilizando amostras de *A. auricularium* coletado de tatus peba, foram conduzidos para investigar a hipótese de que carrapatos parasitando tatus naturalmente infectados por *M. leprae* poderiam se tornar naturalmente infectados pelo patógeno. Porém, conforme informado no momento da submissão deste projeto ao PPGCV/UFRRJ, os experimentos examinariam carrapatos preservados e, como tal, os resultados seriam limitados à demonstração da presença ou ausência de DNA de *M. leprae* nos carrapatos e não deveriam ser interpretados quanto à presença de *M. leprae* viável nos artrópodes. Em vez disso, a detecção do DNA do *M. leprae* deveria ser usada como justificativa para a realização de estudos futuros sobre este tema em situações em que carrapatos viáveis seriam coletados e utilizados em exames de transmissão entre fases da vida e a possibilidade de transmissão a hospedeiros vertebrados.

Os dados deste aspecto do estudo podem ser resumidos de forma sucinta, pois nenhuma evidência foi encontrada para apoiar a presença de DNA de *M. leprae* em carrapatos *A. auricularium* coletados de seis tatus peba que estavam naturalmente infectados com *M. leprae*, ou das amostras de *A. sculptum* coletados de tatus gigantes, para os quais não havia informações sobre a presença de *M. leprae* em seus tecidos. No entanto, dado o impacto potencialmente negativo que estes resultados podem exercer sobre a hipótese de que os carrapatos podem servir como vetores do *M. leprae*, é necessário considerar as limitações do estudo e como essas limitações foram abordadas.

Com base nas observações feitas em relação às deficiências quantitativas e qualitativas observadas para as marcas moleculares (COI e ITS2) que foram utilizadas para detectar DNA de carrapatos, bem como a subsequente falta de detecção de DNA de *Rickettsia* em *A. sculptum* coletado de *P. maximus*, a falta de detecção de DNA do *M. leprae* nesse conjunto de amostras não deve ser considerada como um achado validado. O processo de armazenamento a longo prazo em etanol parece ter impactado negativamente a viabilidade da realização de análises baseadas em PCR do DNA extraído desses carrapatos. Por essa razão, o restante da discussão focará nos carrapatos *A. auricularium* preservados em RNALater e que foram coletados de animais naturalmente infectados com o patógeno sob investigação.

Um ensaio molecular só pode ter valor se for capaz de detectar o alvo para o qual foi projetado. Nesse contexto, os ensaios RLEP empregados neste estudo são reconhecidos por oferecerem detecção extremamente sensível e específica do *M. lepra* (FROTA et al., 2012; FERREIRA et al., 2018; da SILVA FERREIRA et al., 2020). Assim, conforme relatado no estudo de da Silva Ferreira et al (2020), o ensaio convencional demonstrou um limite de detecção de 5 fg de DNA genômico de *M. leprae*, que é considerado equivalente à quantidade de DNA contida em uma célula bacteriana, usando *Escherichia coli* como micorganismo modelo individual (RAGHUNATHAN et al., 2015). Enquanto o “nested” PCR apresentou limite de

detecção de 0,5 fg (que corresponde a 0,1 células bacterianas). Atingir esse nível de sensibilidade fica possível dado o fato do alvo RLEP ser um elemento repetitivo que está presente em 37 cópias no genoma do *M. leprae* (TIÓ-COMA et al., 2020). Esses níveis de sensibilidade foram confirmados nos experimentos iniciais realizados no presente estudo e a inclusão de controles positivos quantificados em todos os ensaios serviu para fornecer uma avaliação sólida da reprodutibilidade inter-experimento e confirmará que todos os ensaios estavam funcionando dentro do limite de detecção estabelecido. O uso de RNALater como conservante acoplado à extração com fenol-clorofórmio e purificação de DNA, conforme empregado neste estudo, foi demonstrado para permitir a amplificação sensível do DNA do carrapato e revelar a presença de DNA originário de duas espécies de bactérias intracelulares, nomeadamente *R. bellii* e *R. amblyommatis* utilizando os ensaios altamente sensíveis para *ompA* e *sca9* desenvolvidos anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa para detectar coinfeção de carrapatos (ABREU et al., 2019). Neste contexto, 18/21 dos carrapatos preservados em RNALater foram positivos para a presença de DNA de *Rickettsia*, usando um único processo de extração com fenol-clorofórmio e uma amostra adicional (TC27) que não conseguiu amplificar nem mesmo o DNA do carrapato, foi posteriormente demonstrada como sendo co-infectada depois da realização de um segundo protocolo de extração de fenol clorofórmio.

Os resultados da aplicação da PCR convencional e “nested” para examinar o DNA extraído por um único protocolo de extração com fenol e clorofórmio demonstraram que nenhum dos carrapatos continha níveis detectáveis do marcador RLEP. No entanto, a observação de que um segundo protocolo de purificação foi capaz de permitir a detecção de *Rickettsia* em uma amostra anteriormente considerada negativa, serviu de motivação para realizar um segundo processo de extração em todas as amostras e re-examinar-las quanto à presença de *M. leprae*. Mais uma vez, os resultados desta análise não demonstraram a amplificação do alvo RLEP em nenhuma das amostras. No entanto, também foi investigada a possibilidade de o ensaio RLEP ter sido talvez incapaz de detectar o seu alvo devido à presença de um inibidor que afetou apenas esses ensaios. No entanto, nenhuma evidência de inibição do ensaio RLEP foi registrada e, como tal, concluiu-se que os carrapatos não continham níveis detectáveis do elemento repetitivo RLEP e, como tal, deveriam ser considerados negativos para a presença de *M. leprae*.

A disponibilidade do DNA re-extraído dos carrapatos *A. auricularium* ofereceu uma oportunidade para investigar a possibilidade de que tais amostras pudessem conter DNA que não havia sido efetivamente extraído durante o primeiro procedimento. Alternativamente, considerou-se possível que o DNA extraído pelo segundo procedimento pudesse conter níveis reduzidos de potenciais inibidores e, como tal, poderia ser possível detectar “amplicons” perdidos na análise inicial. Os resultados da aplicação dos ensaios para detecção de COI, *ompA* e *sca9* demonstraram que praticamente todas as amostras continham DNA amplificável que não havia sido extraído pelo primeiro protocolo. Geralmente, os níveis de amplificação foram inferiores aos registados utilizando o DNA produzido através do primeiro procedimento de extração. Porém, no caso de três amostras (TC3, TC12 e TC16), que não conseguiram gerar o “amplicon” *ompA* utilizando o DNA do primeiro processo de extração, foi observada a amplificação do marcador *ompA* utilizando o DNA da segunda extração. Isto proporcionou a possibilidade de identificar *Rickettsia* do GFM presente nessas amostras como sendo *R. amblyommatis*. Esta descoberta demonstrou claramente o valor da aplicação de um segundo procedimento de extração, apesar dos custos adicionais e do tempo extra necessário. No entanto, o achado mais interessante

resultante da utilização do DNA que passou por um segundo procedimento de extração foi a observação de que a amostra T9 (que havia sido preservada em formol e teve mau desempenho em quase todos os ensaios) era positiva para o alvo *ompA* e após análise PCR-RFLP gerou um padrão de digestão característico de *R. parkeri*. Esta amostra tem sido classificada como infectada com uma *Rickettsia* do GFM com base nos dados de PCR-RFLP para *htrA*, e foi posteriormente classificada como co-infectada com base na positividade para o alvo *scal4*. Atualmente, na ausência de dados de sequenciamento, não é possível estabelecer definitivamente que a amostra TC9 estava co-infectada com *R. parkeri* e *R. bellii*. Experimentos adicionais serão realizados na tentativa de confirmar esta hipótese. Outro ponto a ser observado é o fato desse carrapato ser um dos três únicos coletados no município de Pedro Avelino. As demais amostras TC7 e TC8 foram preservadas em formol e não produziram “amplicon” em nenhum dos ensaios de PCR, mesmo após re-extração. Estas “amostras perdidas” enfatizam claramente a necessidade de preservar cuidadosamente o material de campo.

A aplicação bem-sucedida da análise molecular ao estudo de carrapatos e seus patógenos e/ou endossimbiontes associados é um processo de múltiplas etapas, envolvendo uma série de escolhas, cada uma com o potencial de reduzir a qualidade dos dados moleculares obtidos. As principais escolhas estão relacionadas com os seguintes aspectos: método de preservação, método de extração de ácidos nucleicos, condições de armazenamento, seleção de marcadores e condições específicas de ciclagem utilizadas para amplificação via PCR e, finalmente, a escolha da análise pós-amplificação (sequenciamento ou PCR-RFLP).

O presente estudo buscou realizar uma análise molecular detalhada de duas populações de carrapatos coletadas de duas espécies de tatu, coletadas em duas regiões geográficas do Brasil, em relação à possível presença de dois grupos de patógenos intracelulares. Ao fazê-lo, foram tomadas as seguintes escolhas, com base na experiência adquirida em inquéritos anteriores; (1) as amostras seriam preferencialmente preservadas em RNALater (2) o DNA seria extraído usando homogeneização de carrapatos com “esferas de vidro” seguida de incubação em solução de lise suplementada com proteinase K, o DNA seria extraído/purificado usando fenol clorofórmio e seria precipitado usando isopropanol e posteriormente suspenso em buffer AE (3) com armazenamento a -20°C. (4) a identificação molecular de carrapatos empregaria múltiplos marcadores com análises pós-amplificação baseadas em PCR-RFLP e sequenciamento Sanger (5) no caso de detecção de patógenos, múltiplos ensaios de PCR seriam empregados para detecção de *Rickettsia* com análise pós-amplificação baseada em PCR-RFLP e sequenciamento de “amplicons” (6) no caso do *M.leprae*, os ensaios de PCR convencionais e “nested” empregariam um alvo multi-cópia, para obter uma sensibilidade de detecção igual ou além a uma única célula do patógeno. (7) por último, as amostras de *A. auricularium* seriam submetidas à re-extração com um segundo processo de purificação com fenol-clorofórmio e todas as amostras registradas como negativas seriam avaliadas quanto à sua capacidade de inibir o ensaio RLEP.

Com base nesses critérios, o estudo produziu abundante quantidade de dados inéditos em relação à associação de *Rickettsia* e amostras de *A. auricularium* coletadas no Rio Grande do Norte. Inclusive a presença uma quantidade substancial de exemplares co-infectados com *R. amblyommatis* e *R. bellii*. A amplificação ineficiente do DNA dos carrapatos e a incapacidade de amplificação do DNA de *Rickettsia* nas amostras de *A. sculptum* do MS foram consideradas um reflexo da escolha do etanol para preservação das amostras. Por fim, a falta de amplificação do marcador RLEP em qualquer uma das amostras de DNA (produzido através de um único protocolo de extração ou pela utilização de dois processos de extração com fenol-clorofórmio) aliada

à ausência de dados que indiquem a presença de substâncias inibidoras nas preparações de DNA, foi interpretado como demonstrando a ausência desse patógeno nos carrapatos. Com base no fato de que os tatus que hospedam os carrapatos estavam naturalmente infectados com *M. leprae*, os dados negativos adquiridos na presente investigação não podem comprovar a hipótese de que os carrapatos *Amblyomma* representem vetores competentes para este patógeno.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, D. P. B. Inovação Frugal Aplicada ao Desenvolvimento de Recursos Moleculares para o Estudo Bioecológico de Carrapatos Ixodídeos e Bactérias *Rickettsia* spp. Associadas em Território Brasileiro. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2019a.
- ABREU, D. P. B.; PEIXOTO, M. P.; LUZ, H. R.; ZERINGÓTA, V.; SANTOLIN, Í. D. A. C.; FAMADAS, K. M.; FACCINI, J. L. H.; MCINTOSH, D. Two for the price of one: Co-infection with *Rickettsia bellii* and spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) ticks recovered from wild birds in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.10, 2019b.
- ADORNO, B. R.; SANTOS, L. A. C.; SILVA, A. C. L.; DE SOUZA, M. M. O.; NETO, C. M. S. Deforestation, soil use in the cerrado and the incidence of visceral leishmaniasis, malária and yellow fever in the state of Goiás use and environmental changes. **Revista Brasileira de Geografia Física**, v. 15, n. 6. 2022.
- ALLERDICE, M. E. J.; PADDOCK, C. D.; HECHT, J. A.; GODDARD, J.; KARPATY, S. E. Phylogenetic differentiation of *Rickettsia parkeri* reveals broad dispersal and distinct clustering within North American strains. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 2. 2021.
- ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V. Procedimentos para o controle do carrapato-do-boi em dez passos. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V. Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo. Brasília, DF: **Embrapa**, 2016.
- ALVES, R. R. N.; GONÇALVES, M. B. R.; VIEIRA, W. L. S. Caça, uso e conservação de vertebrados no semiárido brasileiro. **Tropical conservation science**, v. 5, n. 3. 2012.
- ANMED, S.; DÁVILA, J. D.; ALLEN, A.; HAKLAY, M. M.; TACOLI, C.; FÈVRE, E. M. Does urbanization make emergence of zoonosis more likely? Evidence, myths and gaps. **Environment and urbanization**, v. 31, n. 2, p. 443-460. 2019.
- ARAGÃO, H. B; FONSECA, F. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de ixolodologia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 59, n.2. 1961.
- ARAÚJO, M. G. Hanseníase no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 3, p. 373-382, mai.-jun., 2003.
- ATLAS, R. M. One Health: Its Origins and Future. **Current Topics in Microbiology and Immunologi**, 365, p. 1-13, 2012.
- BAKER, R. E., MAHMUD, A. S., MILLER, I. F., RAJEEV, M., RASAMBAINARIVO, F., RICE, B. L.; TAKAHASHI, TATEM, A. J.; WAGNER, C.

E.; LIN-FA, W.; WESOLOWSKI, A.; METCALF, J. E. Infectious disease in an era of global change. **Nature reviews**, v. 20, p. 193-205. 2022.

BARBOSA W. O.; COELHO, T. G.; COSTA, T. O.; PAIZ, L. M.; FORNAZARI, F.; LANGONI, H.; ANTUNES, J. M. A. P.; FREITAS, C. I. A. Antibodies against *Toxoplasma gondii*, *Leishmania* spp., and *Leptospira* spp. in Free-ranging Six-banded Armadillos (*Euphractus sexcinctus*) from Northeastern Brazil. **J. of Wildlife Diseases**, v.56, n. 2, 486- 488, 2020.

BARBOSA, T. A.; FILHO, G. R. R. Biodiversity and conservation of Caatinga: systematic review. **Journal of Environmental Analysis and Progress**, v. 7, n. 4. 2022.

BENEDICTO, M. Biodiversidade brasileira. **Agência de Notícias IBGE**. 2019. Disponível em: < <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agencia-de-noticias/noticias/19511-biodiversidade-brasileira>>. Acessado em: 2 de Agosto de 2023.

BEZERRA-SANTOS, M. A.; MENDONZA-ROLDAN, J. A.; THOMPSON, R. A.; DANTAS-TORRES, F.; OTRANTO, D. Illegal wildlife trade: a gateway to zoonotic infectious diseases. **Trends in Parasitology**, v. 37, n. 3, p.181-184. 2021.

BILLINGS, A. N.; YU, X. J.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group Rickettsia in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in south Texas. **Journal of medical entomology**, v. 35, n. 4, p. 474-478. 1998.

BLANC, G.; NGWAMIDIBA, M.; OGATA, H.; FOURIER, P. E.; CLAVERIE, J. M.; RAOULT, D. Molecular Evolution of Rickettsia Surface Antigens: Evidence of Positive Selection. **Mol. Biol. Evol.**, v. 22, n. 10, p. 2073-2083. 2005.

BLOOM, D. E.; CADARETTE, D. Infectious disease threats in the twenty-first century: strengthening the global response. **Frontiers in immunology**, v. 10:549. 2019.

BOTELHO, J. R.; LINARDI, P. M.; DA ENCARNAÇÃO, C. D. INTERRELAÇÃO ENTRE ACARI IXODIDAE E HOSPEDEIROS EDENTATA DA SERRA DA CANASTRA, MINAS GERAIS, BRASIL. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 84, n.1, p. 61-41, 1989.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biomas. Disponível em: < <https://antigo.mma.gov.br/biomas.html#:~:text=O%20Brasil%20%C3%A9%20formado%20por,de%20vegeta%C3%A7%C3%A3o%20e%20de%20fauna.>>. Acessado em: 02 de Agosto de 2023.

CANEVARI, J. T.; MANGOLD, A. J.; GUGLIOMONE, A. A.; NAVA, S. Population dynamics of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in a subtropical subhumid region of Argentina for use in the design of control strategies. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, p. 6-14. 2017.

CHAHUD, A. Ocorrência de *Euphractus sexcinctus* Linnaeus, 1758 na Gruta Cuvieri, região de Lagoa Santa, MG, Brasil. **Acta Biológica Catarinense**, v.8, p. 72-82, 2021.

COSTA, F. B.; BARBIERI, A. R. M.; SZABO, M. P. J.; RAMOS, V. N.; PIOVEZAN, U.; LABRUNA, M. B. New records of *Rickettsia bellii*-infected ticks in Brazil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, São Paulo, v. 54, n. 1, p. 92-95, 2017.

COSTA, F. B.; HERANDI, M.; BINDER, L. D.; BENATTI, H. R.; SERPA, M. C.; LOPES, B.; LUZ, H. R.; FERRAZ, K. M.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infecting *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) ticks and capybaras in a Brazilian spotted fever-endemic area of Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 57, n. 1, p. 308-311. 2020.

DANTAS-TORRES, F. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: the butterfly effect. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, Oxford, v. 4, n. 3, p. 452-461, 2015.

DASZAK, P.; CUNNINGHAM, A. A.; HYATT, A. D. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. **Acta Tropical**, Amsterdam, v. 78, n. 2., p. 103-116, 2001.

DE SOUZA-ARAÚJO, H. C. Poderá o carrapato transmitir a lepra? **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 36, n. 4, p. 577-584. 1941.

DESBIEZ, A.L. J.; KLUYBER, D.; MASSOCATO, G. F.; BARRETO, L. M. ATTÍAS, N. What do we know about the armadillos of the Pantanal? Review of knowledge about their ecology, biology, morphology, health, conservation, distribution and study methods. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, v. 17, n. 1, p. 11-69. 2022

DEPS, P. D. How is the *Mycobacterium leprae* transmitted?. **Hansenol Int.**, v. 26, n.1, p. 31-36. 2001.

DEPS, P. D.; ANTUNES, J. M.; SANTOS, A. R.; COLLIN, S. M. Prevalence of *Mycobacterium leprae* in armadillos in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 3, 2020.

DOS ANJOS, M. H. B.; SILVA, V. S. Environmental changes and malaria in the Brazilian Amazon region. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 4. 2023.

DOS SANTOS, J. C.; DE LIMA, A. A.; DE SOUZA, R. C.; BIANCALANA, A.; BIANCALANA F. S. C. Evaluation of the occurrence of ticks (acari: ixodidae) in domestic dogs in the municipality of Soure-Marajó/PA. **Brazilian journal of development**, v. 8, n. 4, p. 31439-31448. 2022.

DUARTE, P. O.; AGUIRRE, A. A. R.; HIGA, L. O. S.; ANDREOTTI, R. Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Brasília, DF: **Embrapa**, 2019.

EISEN, L. Stemming the rising tide of human-biting ticks and tickborne diseases, United States. **Emerging infectious diseases**, n.26, n.4, p. 641-247. 2020.

ELLWANGER, J. H.; KULMANN-LEAL, B.; KAMINSKI, V. L.; VALVERDE-VILLEGAS, J. A.; VEIGA, A. B.; SPILKI, F. R.; FEARNside, P. M.; CAESAR, L.;

GIATTI, L. L.; WALLAU, G. L.; ALMEIDA, S. E. Beyond diversity loss and climate change: Impacts of Amazon deforestation on infectious diseases and public health. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**. 2020.

ESCADA, M. I. S.; AMARAL, S.; FERNANDES, D. A. Dinâmicas de ocupação e as transformações das paisagens na Amazônia, Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, n. 39, v. 3. 2023.

EVANS, B. R.; LEIGHTON, F. A. A history of One Health. **Rev Sci Tech.**, v.33, n.2, p.413-20. 2014.

EVANGELISTA, L. S. D.; OLIVEIRA, A. L.; GOMES, N. R. D.; DE OLIVEIRA, N. M. S.; SOUSA, L. S.; PEREIRA, A. D. V. *Amblyomma* spp. E A RELAÇÃO ENTRE FEBRE MACULOSA BRASILEIRA. **Vet. e Zootec.**, v. 28, p1-15, 2021.

FACCINI-MARTÍNEZ, A. A.; DE OLIVEIRA, S. V.; JUNIOR, C. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* spotted fever in Brazil: Epidemiological surveillance, diagnosis and treatment. **J. Health Biol Sci.**, v. 6, n. 3, p. 299-312. 2018.

FERREIRA, J. S.; OLIVEIRA, D. A. S.; SANTOS, J. P.; RIBEIRO, C. C. D. U.; BAÊTA, B. A.; TEIXEIRA, R. C.; NEUMANN, A. S.; ROSA, P. S.; PESSOLANI, M. C. V.; MORAES, M. O.; BECHARA, G. H.; DE OLIVEIRA, P. L.; SORGINE, M. H. F.; SUFFYS, P. N.; FONTES, A. N. B.; BELL-SAKYI, L.; FONSECA, A. H.; LARA, F. A. Ticks as potential vectors of *Mycobacterium leprae*: Use of tick cell lines to culture the bacilli and generate transgenic strains. **PLoS Negl Trop Dis**. 2018.

FERREIRA, J. S.; DE CARVALHO, F. M.; PESSOLANI, M. C.; DE PAULA, J. M. A.; DE MEDEIROS, I. V. O.; MOURA, G. H.; TRUMAN, R. W.; PEÑA, M. T.; SHARMA, R.; DUTHIE, M. S.; FONTES, A. N. Serological and molecular detection of infection with *Mycobacterium leprae* in Brazilian six banded armadillos (*Euphractus sexcinctus*). **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**. 2020.

FERREIRA, M. N.; ELLIOTT, W.; KRONER, R. G.; KINNAIRD, M. F.; PRIST, P. R.; VALDUKO, P.; VALE, M. M. Drivers and causes of zoonotic diseases: an overview. **Parks**, v. 27, n. 27, p.15-24. 2021.

FINE, P. E. Leprosy: the epidemiology of a slow bacterium. **Epidemiol. Rev.**, v. 4, p. 161–188. 1982.

FONSECA, Z. A. A. S.; PEREIRA, J. S.; MARTINS, T. F.; COELHO, W. A. C.; ANDRE, W. P. P.; BESSA, E. N.; AHID, S. M. M. OCORRÊNCIA DE *Amblyomma auricularium* (CONIL, 1878) EM TATUS-GALINHA DE VIDA LIVRE (*Dasypus novemcinctus*) (XENARTRA: DASYPODIDAE) NO ESTADO DO CEARÁ, BRASIL. **Acta Veterinaria Brasil**, v. 7, n. 3, p. 233-236, 2013.

FROTA, C. C.; LIMA, L. N. C.; ROCHA, A. S.; SUFFYS, P. N.; ROLIM, B. N.; RODRIGUES, L. C.; BARRETO, M. L.; KENDALL, C.; KERR, L. R. S. *Mycobacterium leprae* in six-banded (*Euphractus sexcinctus*) and ninebanded armadillos (*Dasypus novemcinctus*) in Northeast Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107 Suppl, p. 209–13, dez. 2012.

GARGIA, M. V.; MATIAS, J.; DE ALMEIDA, R. F. C.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Espécies de carrapatos relatados no Estado do Mato Grosso do Sul. **Embrapa Gado de Corte**. Brasília, 2012.

GOMES, S. N.; PESENTI, T. C.; MÜLLER, G. Parasitismo por *Amblyomma ovale* e *Amblyomma fuscum* (Acari: Ixodidae) em *Dasypus novemcinctus* (Xenarthra: Dasypodidae) no Brasil. **Arq. Inst. Biol**, v. 82, p. 1-4, 2015.

GOULART, I. M. B.; PENNA, G. O.; CUNHA, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical**, v. 35, n. 4, p. 365-375, jul-ago, 2002.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PENÑA, A.; LUCIANI, C. A.; MANGOLD, A. J.; KEIRANS, J. E. Hosts and distribution of *Amblyomma auricularium* (Conil 1878) and *Amblyomma pseudoconcolor* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, n. 29, p. 131-139. 2003.

HEBERT, P. D.; STOECKLE, M. Y.; ZEMLAK, T. S.; FRANCIS, C. M. Identification of Birds through DNA Barcodes. **PLoS Biology**, v. 2, n. 10, p.312, 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Biomas Brasileiros. **IBGE**. 2023. Disponível em: < <https://educa.ibge.gov.br/jovens/conheca-o-brasil/territorio/18307-biomas-brasileiros.html> >. Acessado em: 2 de Agosto de 2023.

HIGA, L. D. C.; SORDAS, B. G.; GARCIA, M. V.; OSHIRO, L. M.; DUARTE, P. O.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Spotted fever group Rickettsia and Borrelia sp. cooccurrence in *Amblyomma sculptum* in the Midwest region of Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 81, p. 1441-1455. 2020.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Rio Grande do Norte. **IBGE**. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/cidades-e-estados/rn.html>>. Acessado em: 3 de Agosto de 2023.

ISLAM, A.; FERDOUS, J.; ISLAM, S.; SAYEED, M. A.; RAHMAN, M. K.; SASHA, O.; HASSAN, M. M. SHIRIN, T. Transmission dynamics and susceptibility patterns of SARS-CoV-2 in domestic, farmed and wild animals: Sustainable One Health surveillance for conservation and public health to prevent future epidemics and pandemics. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 69, n. 5, p. 2523-2543. 2022.

JOLY, C.; SCARANO, F. R.; SEIXAS, C. S.; METZGER, J. P.; OMETTO, J. P.; BUSTAMANTE, M. M. C.; PADGURSCHI, M. C. G.; PIRES, A. P. F.; CASTRO, P. F. D.; GADDA, T.; TOLEDO, P. 1º Diagnóstico Brasileiro de Biodiversidade & Serviços Ecossistêmicos. **Editora Cabo**, p. 23-24. 2019.

KARKOURI, K. E.; GIGO, E.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. Genomic evolution and adaptation of arthropod-associated Rickettsia. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1. 2022.

KATZ, G.; NEVES, V. L. F. D.; ANGERAMI, R. N.; DO NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBRO, S. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, p. 4 a 13. São Paulo, 2009.

KERR, L.; KENDALL, C.; DE SOUSA, C. A. B.; FROTA, C. C.; GRAHAM, J.; RODRIGUES, L.; FERNANDES, R. L.; BARRETO, M. L. Human-armadillo interaction in Ceará, Brazil: Potential for transmission of *Mycobacterium leprae*. **Acta Tropica**, v. 152, p. 74-79. 2015.

KIN, M. S.; BRIHUEGA, B.; FORT, M.; DELGADO, F.; BEDOTTI, D.; CASANAVE, E. B. Presence of antibodies against *Leptospira* serovars in *Chaetophraactus villosus* (Mammalia, Dasypodidae), La Pampa province, Argentina. **Rev. argent. microbiol.**, v. 47, n. 1, p. 41-46, 2015.

KLUYBER, D.; MARTINS, T. F.; DESBIEZ, A. J.; AMORIM, M.; MASSOCATO, G.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting armadillos (Cingulata: Dasypodidae) in the Pantanal wetland, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v. 21, n.8, p. 1087-1091. 2016.

KLUYBER, D.; DESBIEZ, A. L. J.; ATTÍAS, N.; MASSOCATO, G. F.; GENNARI, S. M.; SOARES, H. S.; BAGAGLI, E.; BOSCO, S. M. G.; GARCÉS, H.; FERREIRA, J.; SUFFYS, P.; MEIRELES, L.; LUNA, E.; JASEN, A.; ROQUE, A. Zoonotic parasites infecting free-living armadillos from Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, v. 68, n. 3, p. 1639-1651 2021.

KRAWCZAK, F. S., LABRUNA, M. B., HECHT, J. A., PADDOCK, C. D., & KARPATY, S. E. Genotypic Characterization Of *Rickettsia bellii* Reveals Distinct Lineages In The United States And South America. **Biomed research international**. 2018.

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

LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1166, n. 1, p. 156–166, 2009.

LADO, P.; NAVA, S.; LABRUNA, M. B.; SZABO, M. P.; DURDEN, L. A.; BERMUDEZ, S.; MONTAGNA, M.; QUIRÓS, A. C.; BEATI, L. *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae): phylogeography and systematic considerations. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 7, n. 5, p. 817-827. 2016.

LOPES, M. G.; MUÑOZ-LEAL, S.; DE LIMA, J. T. R.; FOURNIER, G. F. S. R.; ACOSTA, I. C. L.; MARTINS, T. F.; RAMÍREZ, D. G.; GENNARI, S. M. LABRUNA, M. R. Ticks, rickettsial and erlichial infection in small mammals from Atlantic forest remnants in northeastern Brazil. **Parasites and Wildlife**, v. 7, n. 3, p.380-385. 2018.

LORENZ, C.; LAGE, M. O.; CHIARAVALLLOTI-NETO, F. Deforestation hotspots, climate crisis, and the perfect scenario for the next epidemic: The Amazon time bomb. **Science of the total Environment**, v. 783. 2021.

LUZ, H. R.; FACCINI, J. L.; MCINTOSH, D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 4, p. 657-665. 2017.

LV, J.; WU, S.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; FENG, C.; YUAN, X.; JIA, G.; DENG, J.; WANG, C.; WANG, Q.; MEI, L.; LIN, X. Assessment of four DNA fragments (COI, 16S rDNA, ITS2, 12S rDNA) for species identification of the Ixodida (Acari: Ixodida). **Parasites & Vectors**, v. 7, defn. 1, p. 1–11, 2014.

MACEDO, G. C.; HERRERA, H. M.; JANSEN, A. M.; DE OLIVEIRA, C. E.; ROCHA, F. L.; PORFÍRIO, G. E. D. Saúde e conservação de animais silvestres na natureza. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. Cienc. Nat.**, Belém, v. 16, n. 3, p. 459-526, set-dez. 2021.

MACKENZIE, J. S.; JEGGO, M. The One Health Approach – Why Is It So Important?. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v.4, n.2: 88. 2019.

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 *Metastria* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84., n. 6., p. 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, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, p. 75–99. 2010.

MARTINS, T. F.; YOGUI, D. R.; ALVES, M. H.; KLUYBER, D.; MASSOCATO, G. LABRUNA, M. B.; DESBIEZ, A. L. J. Surveillance of ticks (Acari: Ixodidae) on monitored freeranging giant anteaters and on road-killed anteaters and armadillos in the State of Mato Grosso do Sul, Midwestern Brazil. **Systematic and Applied Acarology Society**, v. 28, n. 4, p. 641-646. 2020a.

MARTINS, T. F.; MIRANDA, F. R.; LOPES, A. M. C.; PORTELA, S.; LABRUNA, M. B. Ticks parasitizing free-ranging armadillos in the Caatinga biome, Brazil. **Edentata**, v. 21, p. 29-33, 2020b.

MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, v.135, n.1, p. 15-23, 2004.

PAIVA, K. A. R.; PEREIRA, J. S.; FONSECA, Z. A. A. S.; COELHO, W. A. C.; TEIXEIRA, G. M. S. L.; DE OLIVEIRA, M. F.. AHID, S. M. M. *Rickettsia amblyommii* associated with rodent and marsupials native of Raphael Fernandes Experimental Station da UFERSA, Rio Grande do Norte, Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 46, n. 3. 2017.

MEURENS, F.; DUNOYER, C.; FOURICHON, C.; GERDTS, B.; HADDAD, N.; KORTEKAAS, J.; LEWANDOWSKA, M.; MONCHATRE-LEROY, E.; SUMMERFIELD, A.; SCHREUR, P. J. W.; POEL, W. H. M. V. D.; ZHU, J. Animal board invited review: Risks of zoonotic disease emergence at the interface of wildlife and livestock systems. **Animal**, n. 15, v.6. 2021.

MCINTOSH, D.; BEZERRA, R. A.; LUZ, H. R.; FACCINI, J. L.; GAIOTTO, F. A.; GINÉ, G. A.; ALBUQUERQUE, G. R. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyommalongirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 879-883. 2015.

MEDRI, Í. M.; MARTINS, J. R.; DOYLE, R. L.; MOURÃO, G.; MARINHO-FILHO, J. Ticks (Acari: Ixodidae) from yellow armadillo, *Euphractus sexcinctus* (Cingulata: Dasypodidae), in Brazil's Pantanal wetlands. **Neotropical Entomology**, v. 39, p. 823-825. 2010.

MILAGRES, T.; SILVA, W.; JÚNIOR, H. P.; RÊGO, F.; ANDRADE-FILHO, J.; CARDOSO, D.; NASCIMENTO, L.; SILVA, O. A one health approach to leishmaniasis in a slum: another piece of a global scenario. **Brazilian journal of global health**, v. 8, n.9, p. 11-19. 2022.

MILLER, M. J.; ESSER, H. J.; LOAIZA, J. R.; HERRE, E. A.; AGUILAR, C.; QUINTERO, D.; ALVAREZ, E.; BERMINGHAM, E. Molecular ecological insights into Neotropical bird–tick interactions. **PLoS One**, v. 11, n. 5. 2016.

MIRANDA, F. R.; TEIXEIRA, R. H.; GAZÊTA, G. S.; SERRA-FREIRE, N. M.; AMORIM, M. Presence of *Amblyomma cajennense* in wild giant armadillos (*Priodontes maximus*) of the Pantanal Matogrossense, Brazil. **Edentata**, v. 11, n. 1, p. 73-75. 2010.

MORALES, M. E.; ARBOCCO, F. C. V.; MARTÍN, C. M. S.; ABBA, A. M.; RÍOS, T. A.; CASSINI, G. H.; CATTAN, P. E.; JAHN, G. A.; SUPERINA, M. High *Trypanosoma cruzi* prevalence in armadillo (*Zaedyus pichiy*; *Xenarthra*: Chlamyphoridae) populations from Mendoza, Argentina. **Parasitology research**, n. 122, p. 1593-1604. 2023.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B., CÁCERES, A.G., MANGOLD, A.J. & GUGLIELMONE, A.A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, n. 5, p. 252–276. 2014.

NAVA, S.; SZABÓ, M. P.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Distribution, hosts, 16S rDNA sequences and phylogenetic position of the Neotropical tick *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 102, n. 5, p. 409-425. 2008.

NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; DE SOUSA, R.; PADOOCK, D. C.; LABRUNA, M. B. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 8. 2018.

NOGUEIRA, B. C. F.; CASSIANO, L. A.; MARTINS, T. F.; YAMATOGLI, R. S.; RIBON, R.; CAMPOS, K. Ixodid diversity and detection of spotted fever group *Rickettsia* spp. in ticks collected on birds in the Brazilian Atlantic Forest. **Acta tropica**, v. 236. 2022.

NUNES, E.D.; VIZZONI, V. F., NAVARRO, D.L.; IANI, F. C.; DURÃES, L. S.; DAEMON, E.; SOARES, C. A.; GAZETA G. S. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyommasculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, p. 1058-1061. 2015.

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

OLIVEIRA, I. V. P. D.; DEPS, P. D.; ANTUNES, J. M. A. D. Armadillos and leprosy: from infection to biological model. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 61. 2019.

OLIVEIRA, I. S. V.; RAMOS, E. M. M.; MARQUES, G. M.; MILHOMEM, T. L. C.; BRANDÃO, G. K. B.; MOREIRA, M. H. Clinical and epidemiological profile of leprosy cases in Imperatriz-MA between 2015 and 2021. **Research, Society and Development**, v. 12, n. 5. 2023.

OLIVER, J. D.; BURKHARDT, N. Y.; FELSHEIM, R. F.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. Motility characteristics are altered for *Rickettsia bellii* transformed to overexpress a heterologous rickA gene. **Applied and environmental microbiology**, v. 80, n. 3, p. 1170-1176. 2014.

ONOFRIO, V. C.; VENZAL, J. M.; PINTER, A. SZABÓ, M. P. J. Família Ixodidae: características gerais, comentários e chave para gêneros. In: Barros –Battesti, D. M.; Arzua, M.; Bechara, G. H. Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neotropical. 1ª ed. São Paulo: **ICTTD- Instituto Butantan**, p.29-39. 2006.

ORTEGA, C.; ORTEGA, J.; SIMÓN, M. C. Anthropology and One Health: A Transdisciplinary Approach to Understanding Diseases Emergence. **Open Access Library Journal**, v. 9, n. 6. 2022.

OSHIRO, L. M.; RODRIGUES, V. S.; GARCIA, M. V.; HIGA, L. O. S.; SUZIN, A.; BARROS, J. C.; ANDREOTTI, R. Effect of low temperature and relative humidity on reproduction and survival of the tick *Rhipicephalus microplus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 83, p. 95–106. 2021.

PACHECO, T. D.; MUNOZ-LEAL, S.; MAIA, M. O.; MARTINS, T. F.; DE OLIVEIRA, G. M.; FONSECA, E. P.; PEDRONI, F.; ROSSI, R. V.; PACHECO, R.C.

Molecular detection of *Rickettsia* spp. in ticks associated with non-volant small mammals from the Brazilian Cerrado, with notes on a divergent morphotype of *Ornithodoros guaporensis*. **International Journal of Acarology**, v. 47, n. 3, p. 175-184. 2021.

PAVÃO, G. C.; CASEIRO, M. M.; GAGLIANI, L. H. HANSEÍASE: ASPECTOS CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS, TRATAMENTO E DIAGNÓSTICO LABORATORIAL NO BRASIL. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 15, n. 39, 2018.

PAIVA, K. A. R.; PEREIRA, J. S.; FONSECA, Z. A. A. S.; COELHO, W. A. C.; TEIXEIRA, G. M. S. L.; DE OLIVEIRA, M. F.; AHID, S. M. M. *Rickettsia amblyommii* associated with rodent and marsupials native of Raphael Fernandes Experimental Station da UFERSA, Rio Grande do Norte, Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, n. 37, n. 6. 2017.

PECKLE, M. LUZ, H. R.; LABRUNA, M. B.; SERPA, M. C. A.; LIMA, S.; MATURANO, R.; FACCINI, J. L. H.; MCINTOSH, D. Multi-locus phylogenetic analysis groups the New World bacterium *Rickettsia* sp. strain ApPR with the Old World species *R. africae*; proposal of “*Candidatus Rickettsia paranaensis*”. **Ticks and tick-borne diseases**, v.10, n. 6. 2019.

PEIXOTO, M. P.; LUZ, H. R.; DE ABREU, D. P. B.; FACCINI, J. L. H.; MCINTOSH, D. Detection of *Rickettsia* sp. strain Itinguçu in *Ornithodoros faccinii* (Acari: Argasidae) parasitizing the toad *Rhinella ornata* (Anura: Bufonidae) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 12, n. 3, maio. 2021.

POWER, G. M.; VAUGHAN, A. M.; QUIAO, L.; CLEMENTE, N. S.; PESCARINI, J. M.; PAIXÃO, E. S.; LOBKOWICZ, N. L.; RAJA, A. I.; SOUZA, A. P.; BARRETO, M. L.; BRICKEY, E. B. Socioeconomic risk markers of arthropod-borne virus (arbovirus) infections: a systematic literature review and meta-analysis. **BMJ GLOBAL HEALTH**, v. 7, n. 4. 2022.

QUADROS, A. P.; RÊGO, G. M.; SILVA, T. F.; CARVALHO, A. D.; MARTINS, T. F.; BINDER, L. D.; CASTRO, M. B.; MATTOS, P. S.; LABRUNA, M. B.; PALUDO, G. R. Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) exposure to *Rickettsia* in the Federal District of Brazil, a non-endemic area for Brazilian spotted fever. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 28, p. 30. 2021.

RAGHUNATHAN, A.; FERGUSON, J. R. H. R.; BORNARTH, C. J.; SONG, W.; DRISCOLL, M.; LASKEN, R. S. Genomic DNA amplification from a single bacterium. **Applied and environmental microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3342-3347. 2005.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of ticketsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of bacteriology**, v.173, n.5, p. 1576-2589, 1991.

REIS, M. L., CHIARELLO, A. G., CAMPOS, C. B., MIRANDA, F. R., XAVIER, G. A. A. MOURÃO, G. M. JOSÉ OHANA, A. B., BARROS, N. M., ANACLETO, T. C. S. Avaliação do Risco de Extinção de *Tolypeutes tricinctus* (Linnaeus, 1758) no Brasil.

2016. In: **Avaliação do Risco de Extinção dos Xenartros Brasileiros** / editor Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - Brasília, DF: ICMBio; 2016

RICHARDSON, E. A.; ROE, R. M.; APPERSON, C. S.; PONNUSAMY, L. *Rickettsia amblyommatis* in Ticks: A Review of Distribution, Pathogenicity, and Diversity. **Microorganisms**, v. 11, n. 493. 2023.

ROCHA, J. M.; DE OLIVEIRA, P. B.; MARTINS, T. F.; FACCINI, J. L. H.; SEVÁ, A. P.; LUZ, H. R.; ALBUQUERQUE, G. R. Diversity of ticks and detection of *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks on wild birds in anthropogenic landscapes in Bahia state, northeast Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 84, p. 227-239. 2021.

ROCKLÖV, J.; DUBROW, R. Climate change: an enduring challenge for vector-borne disease prevention and control. **Nature immunology**, v.21, n5., p. 479-483. 2020.

RODRIGUES, A. C.; DE CASTRO, M. B.; LABRUNA, M. B.; SZABO, M. P. J. The inoculation eschar of *Rickettsia parkeri* rickettsiosis in Brazil: Importance and cautions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 14, n. 2, p. 1-5. 2023.

RODRIGUES, C. M.; GEISE, L.; GAZETA, G. S.; DE OLIVEIRA, S. V. Descriptive study of reported cases of spotted fever in São Paulo, Rio de Janeiro and Minas Gerais between 2007 and 2016. **Cad. Saúde Colet.**, v.31, n. 2. 2023

ROMANELLO, M.; MCGUSHIN, A.; DI NAPOLI, C.; DRUMMOND, P.; HUGHES, N.; JAMART, L.; KENNED, H.; LAMPARD, P.; RODRIGUES, B. S.; ARNELL, N. AYED-KARLSSON, S.; BELESOVA, K.; CAI, W.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; CAPSTICK, S.; CHAMBERS, J.; CHU, L.; CIAMPI, L.; DALIN, C.; DASANDI, N.; DASGUPTA, S.; DAVIES, M.; DOMINGUEZ-SALAS, P.; DUBROW, R.; EBI, K. L.; ECKELMAN, M.; EKINS, P.; ESCOBAR, L. E.; GEORGESON, L.; GRACE, D.; GRAHAM, H.; GUNTHER, S. H.; HARTINGER, S.; HE, K.; HEAVISIDE, C.; HESS, J.; HSU, C.; JANKIN, S.; JIMENEZ, M. P.; KELMAN, I.; KIESEWETTER, G.; KINNEY, P. L.; KJELLSTROM, T.; KNIVETON, D.; LEE, J. K. W.; LEMKE, B.; LIU, Y.; LIU, Z.; LOTT, M.; LOWE, R.; MARTINEZ-URTAZA, J.; MASLIN, M.; MCALLISTER, L.; MCMICHAEL, C.; MI, Z.; MILNER, J.; MINOR, K.; MOHAJERI, N.; MORADI-LAKEH, M.; MORRISSEY, K.; MUNZERT, S.; MURRAY, K. A.; NEVILLE, T.; NILSSON, M.; OBRADOVICH, N.; SEWE, M. O.; ORESZCZYN, T.; OTTO, M.; OWFI, F.; PEARMAN, O.; PENCHEON, D.; RABBANIHA, M.; ROBINSON, E.; ROCKLÖV, J.; SALAS, R. N.; SEMENZA, J. C.; SHERMAN, J.; SHI, L.; SPRINGMANN, M.; TABATABAEI, M.; TAYLOR, J.; TRINANES, J.; SHUMAKE-GUILLEMOT, J.; VU, B.; WAGNER, F.; WILKINSON, P.; WINNING, M.; YGLESIAS, M.; ZHANG, S.; GONG, P.; MONTGOMERY, H.; COSTELLO, A.; HAMILTON. The 2021 report of the Lancet Countdown on health and climate change: code red for a healthy future. **The Lancet**, v. 398, n. 10311, p. 1619-1662. 2021.

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. **Res. Microbiol.** v. 146, p. 385-396, 1995.

SAHNI, A.; FANG, R.; SAHNI, S. K.; WALKER, D. H. Pathogenesis of rickettsial diseases: pathogenic and immune mechanisms of an endotheliotropic infection. Annual Review of Pathology: **Mechanisms of Disease**, v. 14, p. 127-152. 2019.

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. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v. 35, n. 2, p. 68-73, 2013.

SARAIVA, D. G.; NIERE-BASTOS, F. A.; SOARES, H. S.; NICOLA, P. A.; PEREIRA, L. C.; LABRUNA, M. B. R. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, northeastern Brazil: isolation, transovarial transmission, and transstadial perpetuation. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, n. 9, p. 615-618. 2013.

SCHMITT, J. V.; DECHANDT, I. T.; DOPKE, G.; RIBAS, M. L.; CERCI, F. B.; VIESI, J. M. Z.; MARCHIORO, H. Z.; ZUNINO, M. M. B.; MIOT, H. A. Armadillo meat intake was not associated with leprosy in a case control study, Curitiba (Brazil). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 105, n.7, p.857-862. 2020

SHARMA, R.; SINGH, P.; LOUGHRY, W. J.; LOCKHART, J. M.; INMAN, W. B.; DUTHIE, M. S.; PENA, M. T.; MARCOS, L. A.; SCOLLARD, D. M. COLE, S. T.; TRUMAN, R. W. Zoonotic leprosy in the Southeastern United States, Emerg. **Infect. Dis.**, v. 21, p. 2127-2134. 2015.

SHPYNOV, S.N. et al. New approaches in the systematics of rickettsiae. **New Microbes and New Infections**, v. 23, p. 93–102, 2018.

SILVA, A. B.; CARDOSO, K. M.; DE OLIVEIRA, S. V.; COSTA, R. M. F.; OLIVEIRA, G.; AMORIM, M.; ALVES, L. C.; MONTEIRO, M. F. M.; GAZETA, G. S. *Rickettsia amblyommatis* infecting *Amblyomma pseudoconcolor* in area of new focus of spotted fever in northeast Brazil. **Acta Tropica**, v. 182, p. 305-308, 2018.

SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B. C.; SOARES, H. S.; TOLESANO-PASCOLIA, G. V.; TORGA, K.; SARAIVA, D. G.; RAMOS, V. N.; OSAVA, C. F.; DE CASTRO, M. B.; LABRUNA, M. B. Ticks biting humans in the Brazilian savannah: Attachment sites and exposure risk in relation to species, life stage and season. **Ticks and Tick-borne diseases**, n.11. 2020.

TAJUDEEN, Y. A.; OLADUNJOYE, I. O.; BAJINKA, O.; OLADIPO, H. J. Zoonotic Spillover in an Era of Rapid Deforestation of Tropical Areas and Unprecedented Wildlife Trafficking: Into the Wild. **Challenges**, v. 13, n. 2, p. 41. 2022.

TAZERJI, S. S.; NARDINI, R.; SAFDAR, M.; SHEHATA, A. A.; DUARTE, P. M. An overview of anthropogenic actions as drivers for emerging and re-emerging zoonotic diseases. **Pathogens**, v.11, n.11, p. 1376. 2022.

THOMAS, M. B. Epidemics on the move: Climate change and infectious disease. **PLoS biology**, v. 18, n. 11. 2020.

TIÓ-COMA, M.; AVANZI, C.; VERHARD, E. M.; PIERNEEF, L.; VAN HOOIJ, A.; BENJAK, A.; ROY, J. C.; KHATUN, M.; ALAM, K.; CORSTJENS, P.; COLE, S. T. Genomic characterization of *Mycobacterium leprae* to explore transmission patterns identifies new subtype in Bangladesh. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 1220. 2020.

TONGLUAN, N.; SHELTON, L. T.; COLLINS, J. H.; INGRAFFIA, P.; MCCOORMICK, G.; PENA, M.; SHARMA, R.; LAHIRI, R.; ADAMS, L. B.; TRUMAN, R. W.; MACALUSO, K. R. *Mycobacterium leprae* Infection in Ticks and Tick-Derived Cells. **Frontiers in Microbiology**. 2021

TRUMAN, R. W.; SINGH, P.; SHARMA, R.; BUSSO, P.; ROUGEMONT, J.; PANIZ-MONDOLFI, A.; KAPOPOULO, A.; BRISSE, S.; SCOLLARD, D. M.; GILLIS, T. P.; COLE, S. T. Probable Zoonotic Leprosy in the Southern United States. **N. Engl. J. Med.**, v. 364, n. 17, p. 1626–1633. 2011.

TSAO, J. I.; HAMER, S. A.; HAN, S.; SIDGE, J. L.; HICKLING, G. J. The Contribution of Wildlife Hosts to the Rise of Ticks and Tick-Borne Diseases in North America. **Journal of Medical Entomology**, v. 58, n.4, p.1565-1587. 2021.

VARELA, J. B. Influência dos Métodos de Conservação Sobre a Recuperação e a Frequência de Amplificação de Marcadores Mitocondriais e Nucleares de Carrapatos das Espécies *Amblyomma parvum* e *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae). Tese (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2016.

VUITIKA, L.; PRATES-SYED, W. A.; SILVA, J. D. Q.; CREMA, K. P.; CÔRTEZ, N.; LIRA, A.; LIMA, J. B. M.; CAMARA, N. O. S.; SCHIMKE, L. F.; CABRAL-MARQUES, O.; MOHAMMAD, S.; CHAVES, L. C. S.; CABRAL-MIRANDA, G. Vaccines against Emerging and Neglected Infectious Diseases: An Overview. **Vaccines**, v. 10, n. 9, p. 1385. 2022.

WEINERT, L. A.; WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **Bmc Biology**, v. 7, n. 1, 2009.

HAN, X. Y.; SEO, Y. H.; SIZER, K. C.; SCHOBERLE, T.; MAY, G. S.; SPENCER, J. S.; LI, W.; NAIR, R. G. A new *Mycobacterium* species causing diffuse lepromatous leprosy, **Am. J.Clin. Pathol.**, v. 130, n.6, p. 856-864. 2008.

YU, X.; CHENG, G. Adaptive Evolution as a Driving Force of the Emergence and Re-Emergence of Mosquito-Borne Viral Diseases. **Viruses**, v. 14, n. 2., p. 435. 2022.

ZAGO, D.; ONOFRIO, V. C.; SOARES, H. S.; MARCILI, A. Main parasitic and infectious diseases in Pantanal horses. **Brazilian journal of Development**, v. 9, n.1, p. 5303-5323. 2023.

ZERINGÓTA, V.; MATURANO, R.; LUZ, H. R.; SENRA, T. O.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L.; MCINTOSH, D. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in

the state of Minas Gerais, Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 1, p. 81-89. 2017.