

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS E
PARASITÁRIAS

ANDRÉ DE ABREU RANGEL AGUIRRE

Amblyomma spp. VETORES DE RIQUETSIOSSES: ASPECTOS BIOECOLÓGICOS
DE *Amblyomma coelebs*, EPIDEMIOLÓGICO EM ECÓTONO AMAZÔNIA-
CERRADO E MODELO DE CONTROLE POR MEIO DE VACINA

CAMPO GRANDE, MS

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
ANDRÉ DE ABREU RANGEL AGUIRRE

***Amblyomma* spp. VETORES DE RIQUETSIOSES: ASPECTOS BIOECOLÓGICOS
DE *Amblyomma coelebs*, EPIDEMIOLÓGICO EM ECÓTONO AMAZÔNIA-
CERRADO E MODELO DE CONTROLE POR MEIO DE VACINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito à obtenção do título de Doutor, sob orientação do Dr. Renato Andreotti e Silva, e coorientação do Dr. Jansen Fernandes de Medeiros.

CAMPO GRANDE
2018

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Renato Andreotti pela oportunidade dada, e por ter aceitado o desafio de me orientar nessa nova empreitada na minha vida.

Agradeço à minha esposa Lunna, meu amor, companheira nas aventuras da vida, pelo apoio e paciência neste processo, pelo qual necessitei me ausentar em momentos importantes.

Aos meus filhos Maria Eduarda e João Pedro, minhas fontes de energia.

Aos meus pais, Hugo e Lêda, e meu irmão, Henrique, sem os quais não teria tido instrução, educação, bases ideológicas e ferramentas para lidar com as situações adversas da vida.

Agradeço a todas as equipes da Embrapa Gado de Corte e Fiocruz Rondônia, e às novas amizades consumadas durante o processo.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato pela ajuda nas atividades, em especial a Marcos, Bárbara e Alexandre.

Aos novos colegas e amigos da Fiocruz Rondônia, que despertaram interesse na área e me deram apoio crucial no desenvolvimento dos estudos, especialmente a Jansen, Ivaneide, Fernando e Soraya.

Agradeço à Simone, Moacyr, Lucas e Isabela por apoio nos momentos difíceis.

RESUMO

As riquetsioses são doenças infecciosas, com manifestações clínicas de quadro febril a hemorrágico, causadas por bactérias do gênero *Rickettsia*. A mais grave delas a febre maculosa brasileira (FMB), ou febre maculosa das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain spotted fever* - RMSF), é causada pela *Rickettsia rickettsii*. São doenças graves para seres humanos, com baixa morbidade, mas alta letalidade, tendo a região Sudeste como a de maior incidência, embora haja indícios de sua existência em outras regiões. As únicas formas de controle dessas doenças se dão pelo controle dos vetores, seja por meio de aplicação de produtos químicos nos animais hospedeiros domésticos, ou apenas evitar áreas com presença de carrapatos e reservatório naturais. Com objetivo em contribuir com o conhecimento sobre vetores de riquetsioses no Brasil, e seu controle, este trabalho propôs: demonstrar parâmetros biológicos do *Amblyomma coelebs*, um potencial vetor de *Rickettsia* spp.; descrever as populações de carrapatos que naturalmente se encontram em fragmentos de mata próximo ao convívio com humanos, no bioma da Amazônia e seus ecótonos como o Cerrado; investigar a presença de *Rickettsia* spp. do GFM nos ixodídeos dessa região; avaliar um modelo de seleção de antígenos para o controle imunológico dos vetores em animais experimentais; e padronizar uma fórmula para cálculo de eficácia vacinal nesses carrapatos, que são heteroxenos. Os resultados gerados abrangeram desde o primeiro relato de repasto completo de ninfas de *A. coelebs* em seres humanos, a descrição inédita de parâmetros biológicos desta espécie de carrapato sob condições experimentais, novos registros de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa (GFM) associadas a carrapatos em ecótono Amazônia-Cerrado (com destaque na primeira confirmação de *Rickettsia* do GFM em *A. oblongoguttatum*), discussão sobre seleção de epítomos de serpinas expressas em glândula salivar de *A. cajennense* sensu lato e sua imunogenicidade em modelo murino, e uma fórmula padronizada para cálculo de eficácia de vacinas e substâncias sistêmicas em carrapatos heteroxenos.

Palavras-chave: *Amblyomma* spp., parâmetros biológicos, *Rickettsia* spp. do GFM, vacina de peptídeos, cálculo de eficácia vacinal.

ABSTRACT

Rickettsiosis are infectious diseases, performed by clinical signs such as fever or hemorrhagic cases, caused by bacteria from the genus *Rickettsia*. The Rocky Mountain Spotted Fever (RMSF), or Brazilian Spotted Fever (BSF), is the most lethal rickettsiosis, and is caused by *Rickettsia rickettsii*. They are severe illness to humans, presenting low morbidity, but high lethality. In Brazil, these diseases are of public health concern, mainly in the Southeastern region, but there is indication of incidence in other regions. The currently control measures for these illness are based only on the control of vectors, either through the application of chemical compounds in domestic host animals, or only to avoid areas with ticks and natural reservoirs. Aiming to contribute to the knowledge about vectors of rickettsiosis in Brazil and its control, this work proposed: demonstrate biological parameters of *Amblyomma coelebs*, a potential vector of *Rickettsia* spp.; describe tick populations in forest fragments in Amazon biome and ecotones with Brazilian Savannah; investigate the presence of SFG *Rickettsia* spp. in ticks within this region; evaluate a strategy of selecting peptide antigens for the immunological control of ticks in animal; and standardize a formula to calculate the efficacy of vaccines against three-host ticks. The results presented here include since the first report of *A. coelebs* nymphs in successful feeding on humans, inedited description of biological parameters of this tick species under experimental conditions, new records of tick-associated spotted fever group (SFG) *Rickettsia* spp. (with highlight on first confirmation of a SFG *Rickettsia* spp. in *A. oblongoguttatum*), epitope selection of serpins expressed in salivary glands of *A. cajennense* sensu lato and its immunogenicity in mice, and a standardized formula to evaluate the calculation of efficacy of vaccines and systemic substances against three-host ticks.

Keywords: *Amblyomma* spp., biological parameters, SFG *Rickettsia* spp., peptide vaccine, calculation of efficacy of vaccines.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

$\cong$	aproximadamente
-C	carboxi-terminal
ANCA	autoanticorpos anti-citoplasma de neutrófilos
COX-2	ciclooxigenase 2
DAB	diaminobenzidina
EUA	Estados Unidos da América
FMB	febre maculosa Brasileira
FMM	febre maculosa do Mediterrâneo
G	uma vez a gravidade da terra
GFM	Grupo da Febre Maculosa
gltA	gene codificante da enzima citrato sintase
GT	Grupo Tifo
IFN- γ	interferon gama
HO-1	enzima heme oxigenase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HPMECs	células endoteliais de pulmão humano
HUVEC	células endoteliais da veia umbilical humana
IFI	ensaio de imunofluorescência indireta
IgG	imunoglobulina G
kDa	kiloDalton
KLH	<i>Keyhole Limpet Hemocyanin</i>
m	metros

MAP	proteína cinase ativadora de mitose
mL	mililitros
N-	amino-terminal
NF- κ B	fator de transcrição nuclear <i>kappa</i> B
NK	células <i>Natural Killer</i>
nm	nanômetros
ompA	proteína da membrana externa A (<i>Outer membrane protein A</i>)
OmpB	proteína da membrana externa B (<i>Outer membrane protein B</i>)
OPD	ortofenilenodiamina
PBS	tampão fosfato-salino
PBS-T	PBS com <i>Tween</i> 20 a 0,5%
SC	subcutâneo
PCR	reação em cadeia da polimerase (<i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (<i>quantitative real time polymerase chain reaction</i>)
RMSF	<i>Rocky Mountain spotted fever</i>
TCD8+	linfócitos T citotóxicos
TCQ	tifo do carrapato de Queensland
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
μ L	microlitros

SUMÁRIO

RESUMO.....	3
ABSTRACT	4
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	5
SUMÁRIO.....	7
1 INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Riquetsioses: Aspectos gerais e antecedentes.....	13
2.2 Epidemiologia.....	14
2.3 Agentes etiológicos no Brasil	17
2.3.1 <i>Rickettsia rickettsii</i>	18
2.3.2 <i>R. parkeri</i> e <i>R. parkeri</i> cepa Mata Atlântica	21
2.3.3 <i>R. africae</i>	22
2.3.4 <i>R. amblyommatis</i>	22
2.4 Vetores no Brasil.....	23
2.4.1 Aspectos da biologia dos carrapatos do gênero <i>Amblyomma</i> no Brasil	24
2.4.2 Complexo <i>A. cajennense</i> sensu lato.....	25
2.4.3 <i>A. aureolatum</i>	26
2.4.4 <i>A. ovale</i>	27
2.4.5 Outros <i>Amblyomma</i> spp.	27
2.4.6 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	28
2.5 Reservatórios naturais silvestres e hospedeiros domésticos.....	30
2.5.1 Cavalos.....	30
2.5.2 Cães	31
2.5.3 Reservatórios silvestres.....	33
2.6 Fisiopatologia das riquetsioses em seres humanos.....	35
2.7 Diagnóstico	37
2.8 Tratamento e prognóstico	38
2.9 Prevenção e controle	39

3 OBJETIVOS	42
3.1 Objetivo geral	42
3.2 Objetivos específicos	42
4 ARTIGOS COM OS RESULTADOS GERADOS.....	43
4.1 Artigo 1 - Publicado na Journal of Medical Entomology (Qualis: B2)	43
4.2 Artigo 2 – Aceito na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária - Brazilian Journal of Veterinary Parasitology (Qualis: B3)	46
4.3 Artigo 3 - Submetido à Ticks and Tick-borne Diseases - Em revisão (Qualis: B1)	52
4.4 Artigo 4 - A ser submetido à Veterinary Parasitology (Qualis: B1)	81
RESUMO	82
INTRODUÇÃO.....	84
MATERIAL E MÉTODOS	85
RESULTADOS	90
DISCUSSÃO.....	97
CONCLUSÃO	99
AGRADECIMENTOS.....	100
REFERÊNCIAS	101
4.5 Artigo 5 - Publicado na International Journal for Parasitology (Qualis: A1)....	104
5 DISCUSSÃO	107
6 CONCLUSÃO.....	113
7 REFERÊNCIAS.....	114

1 INTRODUÇÃO

No mundo, mais de 900 espécies de carrapatos foram descritas, divididas em três famílias: Argasidae (193 espécies); Ixodidae (702 espécies) e, Nuttalliellidae, representada por uma espécie (GUGLIELMONE, 2010). No Brasil, até o momento, a fauna ixodídica é representada por 71 espécies (MARTINS et al., 2014; KRAWCZAK et al., 2015; LABRUNA et al., 2016; WOLF et al., 2016; MUÑOZ-LEAL et al., 2017).

Os carrapatos são importantes em saúde pública, por serem conhecidos como vetores de agentes infecciosos que acometem os seres humanos (PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2009; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). No país, a mais conhecida é a Febre Maculosa Brasileira (FMB), entre outras riquetsioses, a doença de Lyme símile (Síndrome de Baggio-Yoshinari) (MELO et al., 2016). A FMB é a riquetsiose mais importante por causar severos problemas em saúde pública, o agente etiológico é a *Rickettsia rickettsii*, que hoje é conhecida como a mais patogênica dentro do Grupo da Febre Maculosa (GFM), atingindo de 30 a 55% de letalidade (PACHECO et al., 2009; ANGERAMI et al., 2009).

Carrapatos têm sido associados a uma febre maculosa nas Montanhas Rochosas desde o início do século passado, quando estudos relacionaram diversos casos da doença a relatos dos pacientes de picada por carrapatos, registro desses parasitas ou marcas de picadas deixadas por estes nos enfermos quando atendidos (WILSON; CHOWNING, 2001). Desde então, pesquisas foram realizadas almejando a comprovação da importância dos carrapatos na transmissão de doenças a seres humanos. Assim, o gênero *Rickettsia* foi mais bem elucidado, com relatos de novas espécies e cepas, o que demonstrou a complexidade de sorotipos, que permitiu a diferenciação de espécies patogênicas de não-patogênicas (BELL, PICKENS, 1953; PHILLIP et al., 1978; LABRUNA, 2009).

O gênero *Rickettsia* inclui bactérias da ordem Rickettsiales, da classe das Proteobactérias. São cocobacilos Gram-negativos obrigatoriamente intracelulares (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005). No Cerrado brasileiro, este grupo de

bactérias é transmitido a seres humanos principalmente por carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense* sensu lato (s.l.), sendo o *A. sculptum* o mais importante por sua ampla predominância, no entanto, em regiões de Mata Atlântica, o *A. aureolatum* e *A. ovale* são os protagonistas no ciclo epidemiológico dessas bactérias (LABRUNA, 2009; SZABÓ et al., 2013; (MARTINS et al., 2016). A presença deste agente também já foi detectada no carrapato do cão, o *Rhipicephalus sanguineus*, (ALMEIDA et al., 2013) que eventualmente possui relatos de picarem seres humanos (MENTZ et al., 2016).

Relatos de riquetsioses são associados com alguns hábitos de pessoas, como trabalho em zona rural ou moradia de risco em região periurbana. Isto aumenta a possibilidade de contato de seres humanos com reservatórios naturais (capivaras, gambás, outros roedores, etc.), tendo hospedeiros amplificadores (cavalos e cães) como papel importante na disseminação dos carrapatos infectados com riquetsias do ciclo enzoótico (silvestre) para o zoonótico (urbano e rural) (ANGERAMI et al., 2012). Cães são responsáveis por realizarem a interface entre parasita/hospedeiro e seres humanos de *A. sculptum* em zonas rurais, principalmente no Cerrado, e *A. aureolatum* e *A. ovale* em ambientes periurbanos e rurais, na Mata Atlântica (MELO et al., 2011); ANGERAMI et al., 2012).

Os primeiros estudos da biologia do principal vetor, até então, *A. cajennense* s.l., e do controle da febre maculosa tiveram início na primeira metade do século XX, após este ter sido confirmado como principal vetor de riquetsioses (MONTEIRO et al., 1931; (MONTEIRO; FONSECA, 1933-34; (TRAVASSOS, VALLEJO-FREIRE, 1944). Até o momento, inexistem vacinas comerciais contra riquetsioses, tanto em animais quanto em seres humanos, e a principal medida de controle efetuada é o controle do carrapato vetor em animais domésticos (principalmente em equinos), pela aplicação de acaricidas, com destaque nos piretróides (PINHEIRO, 1987); CARVALHO-COSTA et al., 2015; CUNHA et al., 2007; LABRUNA et al., 2004). O aumento do número de reservatórios naturais em centros urbanos, como capivaras, e a facilidade de acesso de animais domésticos em ambientes silvestres criam entraves complexos no aspecto de controle dos vetores da febre maculosa (Szabó et al., 2013). Outra alternativa em

estudo é o uso de acaricidas no ambiente infestado por carrapatos, em locais de foco da doença (SUCEN, 2002). De todo modo, manter áreas de vegetação e gramados roçados pode ser eficaz para auxiliar o controle deste carrapato no ambiente (SMITH, 1975).

A FMB é a principal e mais letal riquetsiose que ocorre no Brasil. Casos dessa doença já foram notificados em todas as cinco regiões do Brasil, com um aumento expressivo no número de casos, até um pico de incidência em 2005, quando 172 casos foram notificados. Na região Norte do Brasil, já existem relatos de FMB nos estados do Amapá, Rondônia e Tocantins, com um caso notificado para cada estado (FIOL et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2016). No entanto, apesar de poucas notificações, existem relatos de cães soropositivos e carrapatos infectados com *Rickettsias*, inclusive do Grupo da Febre Maculosa, no estado de Rondônia, o que sugere que esta doença esteja circulando e sendo negligenciada no estado e na região, uma vez que a doença possui sintomas muito similares ao de doenças de alta incidência nesse estado, o que indica um alerta para as autoridades de saúde pública (LABRUNA et al., 2004a, 2004b, 2005).

As espécies que apresentam maior incidência e oferecem mais risco a seres humanos estão bem caracterizadas em grande parte do Brasil, principalmente no centro-sul do país, onde predominam os biomas do Cerrado e a Mata Atlântica (LABRUNA, 2009; SZABÓ et al., 2013). No entanto, na região do bioma da Amazônia, há uma fauna mais diversificada de carrapatos do gênero *Amblyomma*, contudo poucos estudos sobre epidemiologia de riquetsias foram realizados, havendo uma carência em pesquisas para esclarecer os principais carrapatos envolvidos no ciclo da Febre Maculosa Brasileira e de outras riquetsioses na região amazônica brasileira (MARTINS et al., 2014).

Este trabalho foi idealizado baseando-se no potencial do estado de Rondônia de ser favorável à disseminação de doenças transmitidas por carrapatos (é o estado brasileiro que alberga o maior número de espécies de carrapatos relatadas), e por haver relatos recentes de riquetsias em seu território. Desta forma, foi proposto:

abordar sobre o ciclo biológico em laboratório de uma espécie com potencial capacidade de ser vetor na Amazônia, o *A. coelebs*; investigar a presença de *Rickettsia* spp. do Grupo da Febre Maculosa (GFM) em carrapatos de vida livre em fragmentos de mata, próximos a ambiente periurbano, e rural do estado de Rondônia; propôr uma forma de controle imunológico de carrapatos em reservatórios naturais; padronizar um cálculo de eficácia de vacinas e substâncias sistêmicas em carrapatos de três hospedeiros, em condições experimentais controladas. A finalidade, portanto, é fornecer melhores informações sobre a biologia, epidemiologia e controle, e assim colaborar para maiores subsídios às autoridades de saúde, para que possam tomar medidas preventivas com maior eficiência.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Riquetsioses: Aspectos gerais e antecedentes

As riquetsioses são doenças infecciosas, causadas por Proteobactérias intracelulares obrigatórias, da ordem *Rickettsiales*, gênero *Rickettsia*, Grupo da Febre Maculosa (GFM), que são transmitidas por carrapatos da família Ixodidae (PAROLA et al., 2005a). A primeira riquetsiose conhecida foi denominada de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain Spotted Fever* - RMSF, em inglês) nos Estados Unidos da América (EUA), nos estados de Montana e Idaho, situados na cordilheira das Montanhas Rochosas, tendo sido descoberta como doença infecciosa e associada a carrapatos no início do século XX (RICKETTS, 1906). Possui sintomatologia de febre alta e aguda, com dores em articulações, formação de petéquias ou máculas em regiões localizadas na pele, e que se espalham por todo o corpo rapidamente. Existe relato de ser fatal em até 90% dos casos (RICKETTS, 1909).

Relatos sobre RMSF têm sido reportados desde os primeiros assentamentos humanos nos estados de Idaho e Montana, nos EUA, que remontam desde o século XIX (WOLBACH, 1919). No mesmo trabalho de Wolbach, há um relato de Michie e Parsons (1916) sobre uma menção de um velho índio sobre uma doença que circulava há décadas em nativos ameríndios, principalmente na primavera, época que estes supostamente eram visitados por “espíritos demoníacos”. Apesar de não haver relatos oficiais prévios dessa enfermidade, estimava-se que ela estaria ocorrendo em seres humanos há tempos.

No Brasil, esta não deve ser considerada uma doença emergente nos dias de hoje, pois seus primeiros relatos datam a partir de 1929, em São Paulo (PIZA et al., 1932 *apud* OLIVEIRA et al., 2016), o que sugere que esta enfermidade poderia ser já recorrente. Nas décadas subsequentes, houve vários relatos da doença em seres

humanos, que começaram a declinar na década de 1950, voltando a ser comumente reportados partir de 1980, quando desconfiou-se de uma reemergência da enfermidade no país. Desde então, até o presente momento, foram confirmados centenas de casos no Brasil, caracterizando-se então uma reemergência (revisado por LABRUNA, 2009).

Os dados do Ministério da Saúde (SINAN - NET), registraram 1143 casos de FMB, no período de 2001 a 2015. Os mesmos apontam os estados de São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais e Rio de Janeiro, como os de maior incidência, respectivamente. Apesar de a maioria dos casos se concentrar nas regiões Sul e Sudeste, existem casos isolados relatados em todas as regiões do Brasil, o que sugere que pode estar sendo negligenciada (Oliveira et al., 2016).

Nas Américas, ainda se sabe pouco sobre a classificação das riquetsioses e seus respectivos agentes e vetores. Há alguns tipos principais de riquetsioses já definidos, outros não: RMSF ou FMB (será denominado de RMSF/FMB em todo o trabalho), causada pela *R. rickettsii*; Febre Africana do carrapato, causada pela *R. africae*; e riquetsioses sem nomenclatura definida, com sintomas mais brandos e algumas vezes inespecíficos, causadas por *R. parkeri*, *R. massiliae*, *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e *R. amblyommatis* (PAROLA et al., 2009; LABRUNA, 2009; SZABÓ et al., 2013; KARPATHY et al., 2016).

2.2 Epidemiologia

A RMSF/FMB, causada pela *R. rickettsii*, já foi registrada desde o Canadá até a Argentina, passando por EUA (primeiros relatos), México, Costa Rica, Panamá, Colômbia e Brasil. Nos EUA, a taxa de casos fatais é baixa, entretanto, isto pode estar relacionado com diagnósticos errôneos de RMSF/FMB, que estariam vinculadas a outras riquetsioses mais brandas, mascarando a letalidade real da *R. rickettsii* nesse país (PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2009). Na América do Sul, a taxa de casos fatais

é alta, podendo chegar a 90% de letalidade, o que indica que seja a cepa de *R. rickettsii* com a maior virulência já conhecida (LABRUNA, 2009).

Desde o início do século XX, até a década de 1950, e posteriormente da década de 1980 até o início dos anos 2000, casos de RMSF/FMB nos EUA, tiveram relatos pontuais e esporádicos (LABRUNA et al., 2009). A partir de 2001, surtos de RMSF/FMB foram relatados nos estados de Santa Catarina, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Espírito Santo. São Paulo, até hoje, lidera como o estado com maior número de casos e surtos reportados, tanto em áreas consideradas endêmicas, quanto não-endêmicas, sempre aumentando no período de maio a agosto, especialmente em ambientes associados a fonte de água, vegetação nativa e animais; principalmente capivaras e cavalos (ANGERAMI et al., 2009).

Inicialmente, estimava-se a existência de apenas uma riquetsiose transmitida por carrapatos, prevalente em apenas uma área, causada por somente uma espécie de riquetsia (*R. rickettsii*, causadora da RMSF/FMB). Motivadas por relatos de patogenicidade variada em distintas regiões e pela suspeita de que várias espécies de carrapatos poderiam ser vetores competentes de riquetsioses, aliado ao advento de técnicas de cultura celular e biologia molecular, novas pesquisas relataram espécies de riquetsias relacionadas à riquetsioses, ao redor do mundo, como:

- *R. aeschlimannii*, na África, sul da Europa e Cazaquistão, idem outras riquetsioses, inicialmente tida como não patogênica, mas com recentes relatos de sintomas clínicos nessas localidades;
- *R. africae*, na África subsaariana e no Caribe, causadora da febre africana da picada do carrapato, tendo sido levada da África ao Caribe através de gado importado do Senegal (BARRÉ; GARRIS; CAMUS, 1995);
- *R. amblyommatis*, encontrada nas Américas de modo geral, possuía patogenicidade desconhecida até pouco tempo atrás, quando foi relacionada à quadros de febre branda, com ou sem *rash* maculopapular;

- *R. australis*, na Austrália, causadora do tifo do carrapato de Queensland (TCQ), com sintomas geralmente comuns a outras riquetsioses brandas, mas com casos graves que incluem insuficiência renal e pneumonia severa;
- *R. conorii* e subespécies, no centro-norte da África, Europa, Oriente Médio e Índia, causadoras das febres maculosas do Mediterrâneo (FMM), de Israel, de Astrakhan e tifo da picada do carrapato indiano;
- *R. heilongjiangensis*, no norte da Ásia, causadora da riquetsiose do carrapato do Extremo Oriente;
- *R. helvetica*, na Europa (inicialmente na escandinávia), causadora da perimiodcardite causada por riquetsia(NILSSON; et al. 1999);
- *R. honei*, na Austrália (Ilhas Flinders) e Tailândia, causa a febre maculosa das Ilhas Flinders, com sintomas similares ao TCQ, porém com ausência de *rash* maculopapular;
- *R. japonica*, no Japão e Tailândia, causadora da febre maculosa japonesa;
- *R. massiliae*, na América do Norte, Europa e norte da África, recentemente identificada e isolada, causa febre maculosa, com sintomas similares à FMM;
- *R. monacensis*, na Europa, norte da África e EUA, com apenas um caso humano relatado, no entanto, encontrado em carrapatos nas regiões mencionadas;
- *R. parkeri*, nas Américas do Norte e do Sul, causadora de uma febre maculosa, em áreas não endêmicas para RMSF/FMB, sem sintomas patognomônicos, o que a torna difícil sua patogenia ser diferenciada de outras riquetsioses;
- *R. rickettsii*, encontrada nas Américas de modo geral, foi a primeira riquetsia a ser classificada como tal, bem como sua enfermidade, denominada de RMSF/FMB, reporta os casos mais severos de riquetsioses já descritos;

- *R. sibirica* e subespécies, no norte da Ásia, causadoras do tifo do carrapato da Sibéria e riquetsiose associada à linfangite;
- *R. slovaca* e *R. raoultii*, nos arredores do mar Mediterrâneo (principalmente Europa), causadoras do DEBONEL (Dermacentor Borne Necrosis Erythema Lymphadenopathy) ou TIBOLA (Tick-Borne Lymphadenitis), caracterizadas por adenopatia regional e alopecia no local da picada;

(RENVOISÉ; MEDIANNIKOV; RAOULT, 2009).

No Brasil, um estudo apontou soropositividade de 4,7% para *R. rickettsii*, em humanos, no município de Londrina, Paraná (TOLEDO et al., 2011).

Os fatores de risco para RMSF/FMB, no interior do estado de São Paulo (estado com maior número de registros de casos) estão relacionados a idade, sendo mais frequente a incidência em adolescentes e adultos jovens, principalmente do sexo masculino (associado a trabalho em áreas de risco). Fatores ambientais como ambientes periurbanos, presença de vegetação média a densa, desmatamento (SCINACHI et al., 2017) próxima a fontes de água, com reservatórios naturais silvestre (capivara) e doméstico (cavalos e cães), e a presença do carrapato *A. sculptum* favorecem o risco de RMSF/FMB (SOUZA; PINTER; DONALISIO, 2015). Além do ambiente periurbano, estudos na Amazônia reportaram maior soroprevalência de riquetsioses em cães em área rural (LABRUNA et al., 2007).

2.3 Agentes etiológicos no Brasil

As riquetsioses são causadas por Proteobactérias intracelulares obrigatórias, pertencentes ao gênero *Rickettsia*, composto por diversas espécies. Este gênero sofreu várias reclassificações nos últimos anos, entretanto, predomina-se o consenso de dois grupos majoritários: Grupo da Febre Maculosa (GFM), onde encontram-se os

agentes de riquetsioses; e Grupo Tifo (GT), causador do tifo exantemático (LABRUNA et al., 2011; MERHEJ; RAOULT, 2011; RAOULT; ROUX, 1997).

O GT é representado pela *Rickettsia tiphy* e *R. prowazekii*, que causam uma enfermidade conhecida como tifo exantemático, ou epidêmico, transmitido pela picada de pulgas. O GFM é mais complexo, composto por mais de 20 espécies, sendo a *R. rickettsii* a mais patogênica e letal (LABRUNA et al., 2011; RAOULT; ROUX, 1997). Dentro do GFM, além da *R. rickettsii*, há registros de *R. parkeri*, *R. massiliae*, *R. conorii*, *R. slovaca*, *R. africae*, *R. sibirica*, *R. honei*, *R. japonica* e *R. heilongjiangensis* como causadoras de enfermidades, apresentando desde sintomas brandos, até letais, em seres humanos (MERHEJ, RAOULT, 2011). Contudo, este grupo ainda inclui algumas espécies, como a recém classificada *R. amblyommatis* (antiga *Candidatus* “*R. amblyommii*”), com relatos pontuais e às vezes controversos sobre patogenicidade em seres humanos (APPERSON et al., 2008; DELISLE et al., 2016) e animais (BURGDORFER et al., 1981).

2.3.1 *Rickettsia rickettsii*

Apesar de Howard T. Ricketts terem iniciado estudos sobre febre maculosa no início dos anos 1900, indicando o *Dermacentor andersoni* como principal vetor (RICKETTS, 1906; BURGDORFER et al., 1966), a *R. rickettsii* foi isolada em condições experimentais pela primeira vez somente em 1954, por Gould e Miesse. Desde então, e durante grande parte do século XX, esta bactéria foi considerada como a única responsável por riquetsiose humana transmitida por carrapato (PAROLA et al., 2005a).

Inicialmente, na América Anglo-saxônica, ela foi encontrada infectando as seguintes espécies de ixodídeos: *Dermacentor andersoni*, *D. variabilis*, *D. parumapertus*, *D. occidentalis*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Ixodes dentatus*, *I. scapularis*, *I. pacificus*, *I. cookei*, *I. brunneus*, *I. texanus*, *Amblyomma americanum*, *A.*

maculatum e *Rhipicephalus sanguineus* (RAOULT, ROUX, 1997; PAROLA et al., 2009). Por sua vez, na América Latina, posteriormente foi descrita a presença de *R. rickettsii* em outras espécies, principalmente do gênero *Amblyomma*: complexo *A. cajennense* sensu lato (s.l.), incluindo *A. mixtum*, no México e Panamá (PAROLA et al., 2005a; (BERMÚDEZ et al., 2016), *A. patinoi*, na Colômbia (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2015), *A. sculptum*, no Brasil (MONTENEGRO et al., 2017), *A. tonalliae*, na Argentina (TARRAGONA et al., 2016), e possivelmente *A. cajennense* sensu stricto (s.s.), na Amazônia, e *A. interandinum*, nos vales Andinos do Peru, *A. imitator* (OLIVEIRA et al., 2010), no México, *A. dubitatum* (MONTENEGRO et al., 2017) e *A. aureolatum*, no Brasil (MARTINS et al., 2017). Além do gênero *Amblyomma*, essa bactéria foi também encontrada em *Haemaphysalis leporispalustris* (carrapato do coelho), na Costa Rica (HUN; CORTÉS; TAYLOR, 2008), *Rhipicephalus sanguineus*, no Brasil e México (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005; PAROLA; LABRUNA; RAOULT, 2009; ALMEIDA et al., 2013; SILVA et al., 2017). Apesar do *A. sculptum* ser o vetor de maior importância no Brasil, de modo geral, ele é menos susceptível a se infectar por *R. rickettsii*, do que o *A. aureolatum* e o *R. sanguineus* (LABRUNA et al., 2008).

No Brasil, a enfermidade causada pela *R. rickettsii* é denominada de Febre Maculosa Brasileira (LEMOS et al., 1996). Possui baixa morbidade, entretanto com uma taxa de letalidade muito alta, com relatos de 30 a 40% e até mesmo de 80 a 90% (RAOULT, ROUX, 1997; LABRUNA, 2009; (PAROLA et al., 2013). Os reservatórios naturais silvestres mais comuns são a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e o gambá (*Didelphis* spp.) (PAROLA et al., 2013). Capivaras são eficientes amplificadores silvestres de *R. rickettsii*, em *A. cajennense* s.l., sem manifestarem sintomas (SOUZA et al., 2009). Gambás (*Didelphis aurita*) também são capazes de amplificar *R. rickettsii*, sem manifestarem sintomas clínicos, e infectar carrapatos *A. cajennense* s.l. que os parasitam (HORTA et al., 2009).

Dentre os animais domésticos, os cães e equinos estão como os responsáveis por serem hospedeiros amplificadores, e carreadores dos ixodídeos do ciclo enzoótico para o zoonótico (LABRUNA et al., 2007; LABRUNA, 2009). Em área endêmica para

RMSF/FMB, 80% de cães e 100% de equinos podem se mostrar soropositivos para *R. rickettsii*, mesmo tendo carrapatos *A. cajennense* s.l. com baixa taxa de infecção (VIANNA et al., 2008). Cães, assim como seres humanos, manifestam sintomas clínicos quando infectados com *R. rickettsii*, cepa sul-americana. Sintomas incluem febre, letargia, anorexia, lesões oculares, trombocitopenia e anemia, com ricketsemia iniciando e durando de 3 até 13 dias (PIRANDA et al., 2008). Por sua vez, cavalos possuem patogenia desconhecida em infecções com *R. rickettsii* (FREITAS et al., 2010). Isto torna estes animais com notável importância na vigilância da *R. rickettsii*. Gatos, por sua vez, embora não recebam tanta importância no ciclo da RMSF/FMB, já tiveram relato de contato com *R. rickettsii* (BAYLISS et al., 2009).

A presença de RMSF/FMB, causada pela *R. rickettsii*, está quase restrita aos estados do sul e sudeste do Brasil (LABRUNA, 2009; PAROLA et al., 2013). Entretanto, os vetores envolvidos são encontrados em todas as cinco regiões do país, e inclusive possuem relatos de parasitismo em seres humanos nessas localidades (MARTINS et al., 2016). No Brasil, estima-se que a taxa de infecção dessa bactéria em carrapatos *A. cajennense* s.l. de vida livre gira em torno de 1% (GUEDES et al., 2005).

Os mecanismos fisiopatológicos da *R. rickettsii* em seres humanos ainda não foram completamente elucidados. Sabe-se que essa bactéria possui tropismo por células do endotélio microvascular e modulação de células imunes do hospedeiro, envolvendo a ativação do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B), proteína cinase ativadora de mitose (MAP) p38, expressão da enzima heme oxigenase, antioxidante e vasoprotetora (HO-1), e indução da ciclooxigenase 2 (COX-2), tanto em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) quanto de células endoteliais de pulmão humano (HPMECs) (SPORN et al., 1997; RYDKINA et al., 2002, 2005, 2006, 2009).

Sabe-se também, que a *R. rickettsii*, ao contrário de bactérias intracelulares facultativas, possuem pouca capacidade de expressão gênica quando exposta a fatores ambientais desfavoráveis, como aumento ou diminuição brusca de

temperatura. Isto se deve, provavelmente, pelo fato de ser intracelular obrigatória, convivendo em ambientes (citosol), tanto de animais hospedeiros quanto de carrapatos vetores, com uma certa estabilidade em ambas questões físicas (temperatura, pressão oncótica) quanto química (nutrientes). Este fato indica que a bactéria perdeu genes com expressão induzida por fatores ambientais, que, portanto, pouco influenciam na virulência das cepas de *R. rickettsii* (ELLISON et al., 2009).

A virulência influenciada por fatores do meio externo à bactéria está mais relacionada a diferenças no microambiente presente no carrapato não ingurgitado e em fase de alimentação no hospedeiro (GALLETTI et al., 2013), fatores genéticos e especificidade por vetores e hospedeiros, do que ambientais. Paddock et al. (2014) relacionaram aspectos filogeográficos de genótipos de *R. rickettsii* com casos fatais da doença. Outro estudo apontou pequenas diferenças em alguns genes (polimorfismo de nucleotídeo único no gene OmpB e um códon extra no gene gltA) em cepas relacionadas a casos fatais nas Américas Central e Sul, quando comparadas com sequências de cepas causadoras de enfermidades mais brandas, na América do Norte (LABRUNA et al., 2014). Associações de polimorfismos entre cepas e virulência também foram reportadas por Clark et al. (2015). De fato, a combinação entre ambos aumentos de temperatura do carrapato e início do ingurgitamento aumentam a virulência de *R. rickettsii* (GALLETTI et al., 2016).

2.3.2 *R. parkeri* e *R. parkeri* cepa Mata Atlântica

A riquetsiose brasileira, causada pela *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica já foi registrada no estado Santa Catarina (KRAWCZAK et al., 2016a). Essa bactéria também foi encontrada infectando o carrapato *A. ovale* nos estados do Rio Grande do Sul e São Paulo (KRAWCZAK et al., 2016b; LUZ et al., 2016).

R. parkeri já foi encontrada infectando o carrapato *A. tigrinum* removidos de cães (28% de taxa de infecção), no estado do Rio Grande do Sul, em área onde houve registro de uma riquetsiose (WECK et al., 2016).

2.3.3 *R. africae*

R. africae possui relatos de apresentar virulência variável entre cepas distintas, o que pode estar relacionado a uma perda de alguns genes regulatórios (FOURNIER et al., 2009).

2.3.4 *R. amblyommatis*

O potencial patogênico de *R. amblyommatis* já foi avaliado em cobaias. Estes foram inoculados com uma cepa, isolada de *A. cajennense* s.l., da Costa Rica. Dois dias após a inoculação, alguns animais apresentaram aumento dos testículos, devido a um intenso infiltrado polimorfonuclear ao redor dos mesmos e epididimite. Estes animais inoculados com *R. amblyommatis*, quando desafiados com *R. rickettsii* posteriormente, não desenvolveram sinais severos da doença, nem morte, o que sugere que *R. amblyommatis* pode ser um “controlador” de mortalidade da RMSF/FMB, em locais onde ambas riquetsias são endêmicas (RIVAS et al., 2015).

Um estudo realizado em área endêmica para RMSF/FMB, no estado do Tennessee, EUA, não encontrou *R. rickettsii* em carrapatos coletados de humanos, animais silvestres ou de vida livre. A mesma investigação, por sua vez, apontou taxas de infecção por *R. amblyommatis* de 40% e 3% em *A. americanum* e *D. variabilis*, respectivamente, os carrapatos mais abundantemente encontrados na região (MONCAYO et al., 2010). *R. amblyommatis* foi encontrado em 57,1% de carrapatos

A. americanum no sudeste dos EUA, lugar onde houve casos suspeitos de RMSF/FMB, porém com ausência de detecção de *R. rickettsii* em locais de foco (SAYLER et al., 2014).

Outro estudo similar, investigou a presença de *R. rickettsii* em 5285 espécimes de *D. variabilis*, removidos de militares, no mesmo país. Embora nenhum carrapato tenha se mostrado infectado com *R. rickettsii*, 3,2% e 0,1% foram encontrados com *R. montanensis* e *R. amblyommatis*, respectivamente (STROMDAHL et al., 2011). É questionável a histórica correlação de casos de RMSF/FMB com o *A. americanum* e o *D. variabilis*. Estima-se que essa enfermidade deve estar sendo erroneamente diagnosticada como tal, sendo mais provável que outras riquetsioses estejam envolvidos em grande parte dos diagnósticos de RMSF/FMB no século XX, especialmente relacionadas à *R. amblyommatis* (STROMDAHL et al., 2011; STAYLER et al., 2014). Delisle et al. (2016) reportaram grande prevalência de soropositividade para *R. amblyommatis* em soros de humanos previamente reagentes para *Rickettsia* spp., com diagnóstico inconcluído.

No norte da Argentina, uma investigação em área endêmica de febre maculosa associada a *R. rickettsii* não encontrou esta bactéria em carrapatos de ambiente. Contudo, 21,3% de *A. hadanii* e 44% de *A. neumanni* foram positivos para *R. amblyommatis*. Ambas as espécies já tiveram relatos de picar seres humanos, assim tanto estes vetores quanto essa riquetsia podem estar relacionados a casos de riquetsioses na região (MASTROPAOLO et al., 2016).

O primeiro relato de *R. amblyommatis* fora dos EUA foi no estado de Rondônia, infectando os carrapatos *A. cajennense* s.l. e *A. coelebs* (LABRUNA et al., 2004b). *R. amblyommatis* foi detectada pela primeira vez em *A. sculptum*, parasitando equídeos, em Poconé, no Pantanal Mato-grossense (ALVES; MELO, 2014). No estado do Rio Grande do Sul, já foi encontrada infectando *A. longirostre* (KRAWCZAC et al., 2016b).

2.4 Vetores no Brasil

2.4.1 Aspectos da biologia dos carrapatos do gênero *Amblyomma* no Brasil

Os ixodídeos do gênero *Amblyomma*, no Brasil, comumente necessitam de três hospedeiros para completarem seu ciclo de vida: um para larvas, um para ninfas e outro para adultos. Cada uma das mais de 30 espécies deste gênero descritas no Brasil possui predileção a parasitar um ou alguns hospedeiros específicos (aves, reptéis, anfíbios e mamíferos - carnívoros, perissodáctilos, etc.), e possuem distintos aspectos de sazonalidade de seus ínstares no meio. No entanto, compartilham características elementares: a larva eclode dos ovos, sobe nas folhagens em busca de hospedeiro para realizar repasto sanguíneo (ingurgitamento), se desprende deste, depois de determinado período realiza ecdise para ninfas no ambiente, estas repetem o processo, bem como os adultos (macho e fêmea). Nesta fase, somente as fêmeas ingurgitam, se desprendem do hospedeiro e procuram um lugar seguro para realizar a oviposição. Os ovos ficam incubando no ambiente até a eclosão das larvas. Vale ressaltar que todos esses parâmetros do ciclo de vida destes ectoparasitas são diretamente influenciados por fatores climáticos, tais como temperatura e umidade (RODRIGUES et al., 2002; SANCHES et al., 2008; MARTINS et al., 2012, 2014, 2016, 2017) (Figura1).

Normalmente os carrapatos possuem especificidade a um hospedeiro ou um grupo destes (classe, ordem, família, gênero). Entretanto algumas espécies podem apresentar estágios imaturos sem grande especificidade o que proporciona uma ampla gama de possíveis hospedeiros, o que faz dessas espécies as mais preocupantes para saúde pública, pois são as mais prováveis por picar ou parasitar seres humanos e podendo assim transmitir agentes infecciosos (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; GARCIA et al., 2015).

Ciclo de *Amblyomma* spp.

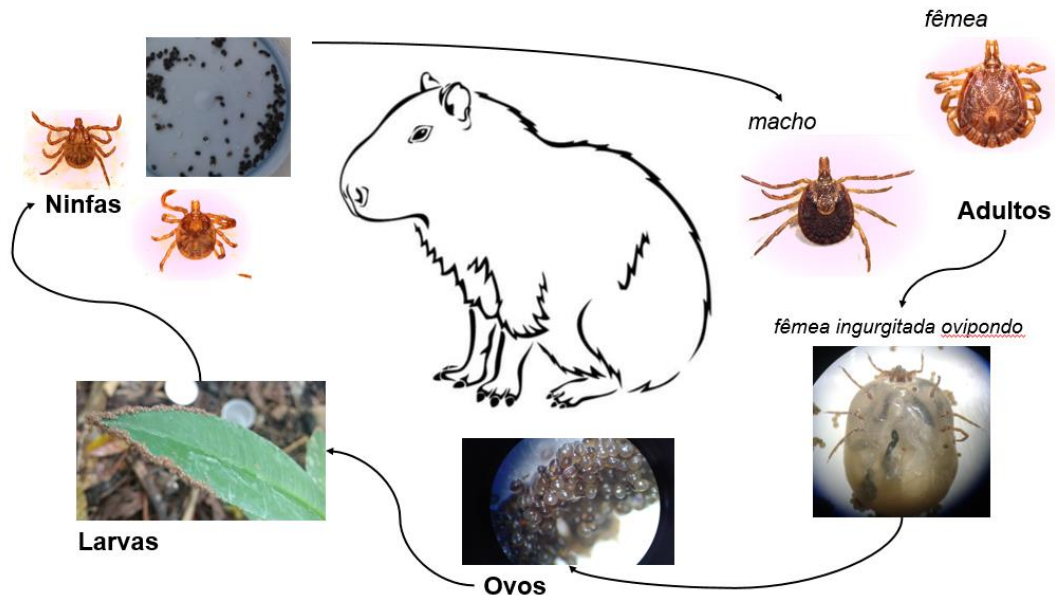


Figura 1: Figura ilustrativa do ciclo biológico de carrapatos *Amblyomma* spp. Fotos de arquivo pessoal: larvas na folha - *A. oblongoguttatum*; ninfas não ingurgitadas - *A. naponense* e *A. oblongoguttatum*; ninfas ingurgitadas, adultos (macho e fêmeas não ingurgitada e ingurgitada) e ovos - *A. cajennense* s.s.

2.4.2 Complexo *A. cajennense* sensu lato

O carrapato mais amplamente encontrado no território brasileiro, principalmente em regiões de Cerrado, é o *A. cajennense*, que recentemente foi classificado como um complexo de seis espécies. No Brasil, os mais abundantes são, respectivamente, o *A. sculptum* (Cerrado), e *A. cajennense* s.s. (bordas da Amazônia) (NAVA et al., 2014; MARTINS et al., 2016). Devido à recente discriminação do complexo *A. cajennense*, e no Brasil ter registro de duas espécies deste complexo, sendo uma delas homônima a ele, registros anteriores a 2014 serão denominados de *A. cajennense* s.l. neste trabalho.

O ciclo do *A. cajennense* s.l. dura em torno de 12 meses, sendo as larvas mais abundantes nos meses de abril a julho, ninfas de junho a outubro e adultos de outubro a dezembro (BRITES-NETO et al., 2013). Sugere-se que os meses de janeiro a março são reservados para a oviposição e maturação dos ovos para eclosão das larvas em abril.

O *A. cajennense* s.l. é capaz de transmitir *R. rickettsii* dentro do seu ciclo de vida, de modo transovariano (teleóginas para ovos e subsequente larvas) e transtadial (larvas para ninfas e ninfas para adultos), embora todos os seus ínstares serem de certa forma refratários à infecção pela bactéria, sendo assim incapazes de manter o agente por si só, dependendo de hospedeiros amplificadores para tal (SOARES et al., 2012).

No interior do estado de Minas Gerais, no Sudeste do Brasil, onde predomina-se o bioma do Cerrado, foi encontrada uma prevalência de *R. rickettsii* de 0,5% em 400 adultos de *A. cajennense* s.l. No mesmo município, pelo menos de 1% das ninfas foram positivas para a bactéria (GUEDES et al., 2011).

2.4.3 *A. aureolatum*

Este carrapato já foi encontrado associado a cães na região metropolitana de São Paulo, com uma prevalência de 19,3% na população desses animais (maior inclusive que a prevalência no carrapato-do-cão, o *R. sanguineus*, de 10,6%), no qual o estudo apontou taxa de infecção de 11,1% de *R. rickettsii* na população de *A. aureolatum* (OGRZEWALSKA et al., 2012). Este parasita é mais abundantemente encontrado na natureza em altitudes mais elevadas (acima de 700 m acima do nível do mar), no estado de São Paulo (BARBIERI et al., 2015).

Ninfas e adultos não ingurgitados de *A. aureolatum* requerem mais de 10 horas de fixação para transmitir *R. rickettsii* ao hospedeiro. No entanto, a transmissão por

machos adultos, previamente alimentados em outros hospedeiros infectados, leva até 10 minutos (SARAIVA et al., 2014). Assim, isto sugere que o estado fisiológico do carrapato influencia diretamente na virulência da bactéria.

Embora tenha-se suspeitado que variações genéticas em populações desta espécie estejam relacionado com susceptibilidade na transmissão de *R. rickettsii* a seres humanos, essas variações mostraram-se relativamente baixas em populações encontradas na região metropolitana de São Paulo, sendo improváveis de estarem associadas à transmissibilidade da bactéria (OGRZEWALSKA; PINTER, 2016).

2.4.4 *A. ovale*

Esta espécie de carrapato é conhecida por estar associada e transmitir um agente patogênico a seres humanos, no Brasil, a *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Esta é causadora de uma riquetsiose mais branda que a RMSF/FMB (SZABÓ et al., 2013).

A maior parte dos registros de ocorrência de *A. ovale* situam-se no estado de São Paulo, em locais onde há Mata Atlântica, principalmente em altitude inferior a 100 m acima do nível do mar (BARBIERI et al., 2015). Esta espécie comumente parasita carnívoros silvestres e domésticos, contudo também já foi encontrado parasitando pequenos roedores (SARAIVA et al., 2012; LOPES et al., 2016; LUZ et al., 2016).

2.4.5 Outros *Amblyomma* spp.

O *A. dubitatum* é um carrapato conhecido por parasitar capivaras, importante reservatório para *R. rickettsii* na natureza. Apesar de não ser uma espécie de carrapato conhecida como transmissora da RMSF/FMB, seu papel como vetor e

mantenedor de *R. rickettsii* em populações desses animais precisa ser mais bem elucidado, uma vez que foi comprovado que há transmissão transestadial, mas não transovariana, e capacidade de infectar cobaias saudáveis, por esta espécie de carrapato (SAKAI et al., 2014). Essa mesma espécie foi encontrada albergando *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica no nordeste da Argentina (MONJE et al., 2015).

A. coelebs costuma parasitar antas na fase adulta, mas possui predileção à alguns carnívoros, pequenos roedores e marsupiais, quando em ínstares imaturos (SOARES et al., 2015; LOPES et al., 2016; WITTER et al., 2016). Essa espécie já possui relatos de infecção por *R. amblyommatis*, e é capaz de parasitar e assim completar o repasto sanguíneo em seres humanos (LABRUNA et al., 2004b; GARCIA et al., 2015). Este fato torna esta espécie um potencial vetor desses agentes.

A. oblongoguttatum é um carrapato frequentemente encontrado no bioma da Amazônia, e agora apresenta relato de infecção por *R. amblyommatis*, a qual pertence ao GFM (dados não publicados). Há um único relato anterior de *Rickettsia* do GFM infectando este carrapato, entretanto a confirmação da espécie não pôde ser confirmada na ocasião (BERMÚDEZ et al., 2009). Este carrapato é capaz de picar seres humanos e parasitar cães, além de uma variedade de mamíferos silvestres, desde grandes carnívoros até pequenos roedores (LABRUNA et al., 2000; GUGLIELMONE et al., 2006). Isso sugere que esta espécie de ixodídeo seja importante na manutenção de riquetsioses, tanto no ciclo enzoótico, quanto zoonótico.

2.4.6 *Rhipicephalus sanguineus*

Este carrapato já provou ser um vetor competente de *R. rickettsii* em cães, sendo capaz de manter a infecção para os próximos ínstares (transmissão transovariana e transestadial), e capaz de transmitir a bactéria a outros hospedeiros, após a edcise (PIRANDA et al., 2011).

Este carrapato possui afinidade a seres humanos principalmente em situações de temperatura elevada, indicando que este pode ser um potencial vetor em um país tropical, como o Brasil (PAROLA et al., 2008). No país já há relatos de picada deste carrapato em seres humanos (MENTZ et al., 2016).

O *R. sanguineus* foi apontado como vetor de RMSF/FMB em dois cães com suspeita clínica para a enfermidade, no estado da Califórnia, EUA. *R. massiliae* foi encontrado nos carrapatos removidos desses cães, e os mesmos foram soropositivos para a bactéria (BEELER et al., 2011). No Arizona, o carrapato do cão foi detectado com *R. rickettsii* e abundantemente encontrado em uma região de surto de RMSF/FMB (DEMMA et al., 2005). Não longe desse relato, na Baixa Califórnia, México, DNA *R. rickettsii* foi amplificado dessa espécie de carrapato removido de cães, em local onde houve surto de RMSF. No entanto, não foi sugerida uma correlação entre este surto com os casos nos EUA, pois análises genômicas diferenciaram tanto a cepa de *R. rickettsii* quanto a de *R. sanguineus* mexicanas, das cepas americanas (EREMEEVA et al., 2011).

Em uma área endêmica para RMSF/FMB em Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, 13,1% (total de 122) dos *R. sanguineus* removidos de cães foram positivos para *R. rickettsii*, por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) (PACHECO et al., 2011). O mesmo estudo não encontrou DNA dessa bactéria em *A. cajennense* s.l. coletados de equinos, na mesma região, indicando que o carrapato-do-cão pode estar relacionado na transmissão da RMSF/FMB também no Brasil. Em área de Mata Atlântica, na região metropolitana de São Paulo, foi encontrada uma taxa de infecção de 11,2% em espécimes de *R. sanguineus* associados a cães (OGRZEWALSKA et al., 2012). Em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 98,9% de cães de zona urbana, infestados por carrapatos (total de 148), foram associados ao *R. sanguineus*, tendo sido detectado DNA de *R. rickettsii* em uma amostra, ao passo que apenas 1,1% estavam infestados com *A. cajennense* s.l (ALMEIDA et al., 2013).

Após a transmissão transestadial, a *R. rickettsii* pode se alojar em células de ovário de fêmeas adultas, parcialmente ou totalmente ingurgitadas. Isto sugere que a

própria bactéria pode influenciar negativamente nos parâmetros reprodutivos deste carrapato, apesar de existir também a transmissão transovariana (DA SILVA COSTA et al., 2011).

2.5 Reservatórios naturais silvestres e hospedeiros domésticos

2.5.1 Cavalos

Cavalos são importantes hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii*, bem como dispersor do seu principal vetor, *A. cajennense* s.l., no Brasil (LABRUNA et al., 2009). Ao contrário de seres humanos, cães e animais convencionais de laboratório (cobaias e coelhos), cavalos não manifestam sinais clínicos, hematológicos nem bioquímicos frente a uma infecção por *R. rickettsii*, embora possam produzir anticorpos detectáveis contra essa bactéria por período maior de um ano. Ademais, cavalos experimentalmente infectados com *R. rickettsii* não demonstraram bacteremia significativa e foram incapazes de transmitir essa bactéria, a um nível infectante efetivo, a carrapatos *A. sculptum*. Este fato sugere que apesar de cavalos não serem hospedeiros amplificadores competentes na manutenção de *R. rickettsii* em *A. sculptum*, podem ser importantes sentinelas na vigilância epidemiológica (UENO et al., 2016).

Em um estudo realizado em área rural na Colômbia, 16,3% dos cavalos avaliados por titulação de anticorpos foram positivos para *R. rickettsii* (HIDALGO et al., 2009). 43% de carrapatos (*A. cajennense* e *D. nitens*) coletados de cavalos, no Panamá, foram positivos para riquetsias do GFM, sendo apenas um (0,87%) positivo para *R. rickettsii* (BERMÚDEZ et al., 2009).

No Brasil, em uma área não endêmica para RMSF/FMB (mas com caso já registrado), no estado do Paraná, 9,33% (total de 75) de cavalos avaliados por

detecção de anticorpos anti *R. rickettsii*, se mostraram positivos (FREITAS et al., 2010). Em outra área não endêmica (município de Almirante Tamandaré), e sem registro caso de RMSF/FMB, no mesmo estado, 8,5% (total de 71) dos cavalos se mostraram soropositivos para ambas *R. rickettsii* ou *R. parkeri* (BATISTA et al., 2010). Em Londrina, 5,5% e 1,8% (total de 273) de cavalos foram soropositivos para *R. rickettsii* e *R. parkeri*, respectivamente (TAMEKUNI et al., 2010). Na mesma cidade, outro estudo apontou soropositividade de 38,5% para *R. rickettsii* e 11,5% para *R. parkeri* (total de 73) (TOLEDO et al., 2011).

61,6% de equídeos (500 cavalos e 47 jumentos) do Pantanal Mato-grossense apresentaram anticorpos reagentes a pelo menos uma espécie de *Rickettsia* spp. por meio de IFI - 26,5% para *R. amblyommatis* e 5,1% para *R. parkeri* (ALVES et al., 2014). Por sua vez, no interior de São Paulo, um estudo sorológico demonstrou 36,1% de equinos (de um total de 504) positivos para *R. rickettsii*, tanto em áreas endêmicas (44,5%) quanto não endêmicas (28,4%) (SOUZA et al., 2016).

2.5.2 Cães

Cães se mostraram como competentes hospedeiros amplificadores para *R. rickettsii*, infectando *R. sanguineus*, seu principal ectoparasita, tornando-os capazes de transmitir o agente horizontalmente, e apresentam a manifestação de alguns sintomas clínicos (PIRANDA et al., 2008, 2011).

Foi reportada prevalência de 18,2% de cães soropositivos para *R. rickettsii*, na Colômbia (HIDALGO et al., 2009). 68,2% (total de 44) de cães apresentaram IgG detectáveis contra *R. rickettsii*, na região de Cochabamba, Bolívia (TOMASSONE et al., 2010). No Panamá, 27% de carrapatos coletados de cães foram positivos para riquetsias do GFM, sendo nenhuma *R. rickettsii* amplificada no estudo (BERMÚDEZ et al., 2009).

Após duas comunidades no estado do Arizona (EUA) terem reportado surtos de RMSF/FMB, com cães tendo mostrado anticorpos contra riquetsias do GFM antes mesmo dos surtos, um estudo sorológico foi realizado em cães nas localidades. O resultado mostrou que 5,7% (total de 247) dos cães tinham anticorpos contra *R. rickettsii* (MCQUISTON et al., 2011). No mesmo país, cães com suspeita clínica para RMSF/FMB foram soropositivos para *R. massiliae* (BEELER et al., 2011). Um outro estudo realizou a exposição de 10 cães *naïve* para *Rickettsia* spp. a carrapatos de ambiente, durante um período de 8 semanas. Todos os animais tiveram contato com carrapatos (principalmente *A. americanum*) e se tornaram soropositivos para *R. amblyommatis* (BARRETT; LITTLE; SHAW, 2014).

Na Costa Rica, 18,5% (de 168 indivíduos) de cães em zona de surto de RMSF/FMB foram soropositivos para *Rickettsia* do GFM, enquanto a prevalência foi de 6,8% (total de 161 cães) em cães de locais sem registros, o que reforça a importância destes como sentinelas para os agentes (MOREIRA-SOTO et al., 2016).

Uma investigação realizada no estado do Rio Grande do Sul, 25,7% dos cães (total de 389) foram soropositivos para *R. parkeri*. Os mesmos autores apontaram que os cães que tinham contato com floresta ou pastagens foram duas vezes mais prevalentes para essa bactéria, do que animais sem este tipo de exposição (SAITO et al., 2008). Posteriormente um estudo reportou 19,7% de soropositividade para a mesma bactéria, em um total de 137 indivíduos (KRAWCZAC et al., 2016).

No estado do Paraná, 20% dos cães avaliados (total de 20) foram soropositivos para *R. rickettsii* ou *R. parkeri*, e 35% destes estavam sendo parasitados por *A. aureolatum* (BATISTA et al., 2010). Além de *R. rickettsii*, cães também se mostraram soropositivos para *R. bellii* e *R. felis* (patogênicas para seres humanos) no mesmo estado (FORTES et al., 2010). Na cidade de Londrina, 2,7% de cães (total de 73) foram soropositivos para *R. rickettsii* ou *R. parkeri* (TOLEDO et al., 2011). Já na Mata Atlântica, carrapatos *A. ovale* que foram encontrados parasitando cães estavam infectados com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (LUZ et al., 2016).

Na região do bioma do Pantanal, cães de zona rural, que geralmente apresentam hábito de caça, são mais frequentemente expostos ao carrapato *A. cajennense* s.l. do que cães de zona urbana, que normalmente residem em domicílios. Esta exposição ao vetor pode estar relacionada com uma soropositividade maior destes a *Rickettsia* spp. (principalmente *R. amblyommatis*) nessa região. No geral, na região pantaneira, 47% dos cães, de um total de 320 indivíduos, foram soropositivos para *Rickettsia* spp., sendo 19,3% de prevalência na zona urbana e 75,6% na zona rural (MELO et al., 2011).

Um estudo sorológico conduzido em cães em uma região endêmica de RMSF/FMB, no município do Rio de Janeiro, apontou que 97,5% destes (total de 114) eram soropositivos para *R. rickettsii*. O mesmo estudo investigou anticorpos em 115 trabalhadores da região, onde 2,6% foram positivos (ROZENTAL et al., 2015).

Fora do continente americano, um estudo na ilha da Tasmânia, Austrália, mostrou 59% dos gatos (total de 150) e 57% de cães (total de 368) soropositivos para riquetsias do GFM (preparado antigênico contendo *R. akari*, *R. australis*, *R. conorii*, *R. honei*, *R. rickettsii* e *R. sibirica*), por meio de ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) (IZZARD et al., 2010).

Estes resultados mostram que cães, além de importantes sentinelas para vigilância da RMSF/FMB, servem de reservatórios de riquetsias, levando a bactéria para próximo do convívio de seres humanos. Essa espécie animal deve ser sempre considerada em estudos acerca da epidemiologia de riquetsioses tanto em regiões endêmicas quanto silenciosas.

2.5.3 Reservatórios silvestres

Já foi demonstrado que pequenos roedores são hospedeiros importantes no ciclo enzoótico das riquetsioses, sendo importantes como reservatórios e

dispersadores das bactérias e carrapatos no ambiente. Em Taiwan, um estudo com 1375 pequenos roedores, entre ratos, camundongos e musaranhos, 60,5% tiveram presença de *Rickettsia* spp. em órgãos (KUO et al., 2015). No estado de Minas Gerais, Brasil, soropositividade para *Rickettsia* spp. foi mais prevalente em marsupiais (39,6%) do que em pequenos roedores (13,8%) (COELHO et al., 2016).

Em um estudo realizado com morcegos (451 espécimes), na cidade de São Paulo, foi mostrado que 8,6% foram soropositivos para *R. rickettsii*, 9,5% para *R. parkeri*, 7,8% para *R. amblyommatis*, e 1,1% para *R. rhipicephali*. No mesmo estudo, nenhum morcego foi positivo para *R. bellii* (D'AURIA et al., 2010).

Um outro estudo na região metropolitana do mesmo município, envolvendo pequenos mamíferos silvestres, apontou soropositividade a pelo menos uma espécie de *Rickettsia* spp. de 13,6% em gambás (total de 22) e 21,2% em pequenos roedores, a maioria relacionada a *R. rickettsii*. Os principais carrapatos encontrados nesses hospedeiros foram *Ixodes loricatus*, *Haemaphysalis juxtakochi*, *A. dubitatum* e *A. cajennense*, respectivamente. O mesmo trabalho abordou aves silvestres, encontrando larvas e ninfas de *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes*. Dentre os carrapatos encontrados em aves, 41,7% de *A. longirostre* foram positivos para *R. amblyommatis*, e *R. parkeri* cepa ApPR foi encontrado em estágios imaturos de *Amblyomma* spp. (OGRZEWALSKA et al., 2012). Já no interior do estado, 29,35% de gambás, de um total de 109, tiveram soro reagente para *R. rickettsii* (MELO et al., 2016).

Ainda no estado de São Paulo, 48,3% de capivaras (total de 172) se mostraram soropositivas para *R. rickettsii*. O mesmo estudo apontou que esta espécie de roedor silvestre é a única responsável por manutenção da população de *A. cajennense* s.l. em um parque, no município de Itu (KRAWCZAK et al., 2014). Estima-se que a introdução de uma capivara infectada por *R. rickettsii*, que tenha ao menos um carrapato fixado, é capaz de induzir a formação de um novo foco de RMSF/FMB. Sugere-se, portanto, o estabelecimento de um programa de controle epidemiológico

que vise ao controle populacional de capivaras a fim de evitar que estas migrem de um foco a outro, criando novas regiões endêmicas (POLO et al., 2017).

No Rio Grande do Sul, foram encontrados 37,5% de pequenos mamíferos, entre gambás e pequenos roedores silvestres, soropositivos para *R. parkeri* (KRAWCZAC et al., 2016).

2.6 Fisiopatologia das riquetsioses em seres humanos

De maneira geral, a sintomatologia das riquetsioses ocorre em consequência dos mecanismos patogênicos da bactéria frente a resposta imune do hospedeiro, que se inicia com a entrada do agente pela derme, se disseminando pelo sistema circulatório através do endotélio vascular, aumentando sua permeabilidade, gerando edema tecidual local (WALKER; VALBUENA; OLANO, 2003). As proteínas da membrana externa das bactérias se ligam ao receptor celular Ku70 das células dos hospedeiros (UCHIYAMA; KAWANO; KUSUHARA, 2006).

O mecanismo utilizado pelas riquetsias sobre o aumento da permeabilidade vascular foi elucidado com a demonstração que a interação das células endoteliais, relacionada à interação das moléculas de caderina, diminuem de intensidade durante uma riquetsemia, por meio das tecnologias de microscopia de força atômica, imunoprecipitação e ensaios *in vitro* de permeabilidade vascular (GONG et al., 2012).

Os sintomas de RMSF/FMB geralmente incluem a tríade febre alta e aguda, dores de cabeça e exantema maculopapular (inicialmente na região palmar e membros anteriores). Outros frequentes, contudo nem sempre presentes, são eritema, linfadenopatia, calafrios, hiperemia conjuntival, dispneia, mialgia, dor abdominal, náuseas, epistaxe e vômito (COUTO et al., 2015; FIELD-CORTAZARES et al., 2015). Riquetsiose causada pela *R. amblyommatis* foi associada a sintomas de

febre, dores de cabeça e mialgia, e, menos frequente *rash* maculopapular e trombocitopenia, nos EUA (DELISLE et al., 2016).

Em um surto de RMSF/FMB em Los Córdoba, Colômbia, com quatro casos fatais e outros sete casos não fatais, reportaram os seguintes sintomas: dor de cabeça, calafrios, mal-estar, mialgia (dor muscular), artralgia (dor articular), tontura, fadiga, anorexia, náuseas, vômito, dor abdominal, diarreia e dispnéia. O mesmo trabalho apontou o tradicional *rash* maculopapular em apenas 18% dos casos (HIDALGO et al., 2011). Esses relatos são similares aos previamente reportados em um surto na mesma região, com destaque para febre, cefaléia e artralgia (ACOSTA et al., 2006).

A cidade do Rio de Janeiro, em 2008, voltou a relatar caso de RMSF/FMB após 30 anos sem registros. O mesmo foi tratado inicialmente como leptospirose. O caso foi fatal, com a morte do paciente no sexto dia após a entrada em hospital, com sintomas de choque séptico e meningoencefalite (LAMAS et al., 2008).

Sintomas cardíacos são raros, mas já foi relatado em uma paciente de 25 anos. Os achados foram: níveis de troponina-I cardíaca e creatina quinase elevadas, eletrocardiograma demonstrou hipocinesia no ventrículo esquerdo, taquicardia e hipotensão no terceiro dia, efusão no pericárdio aumentando sua circunferência, inversão sistólica no átrio direito, diminuição do relaxamento do ventrículo direito, variação na velocidade de influxo mitral com tamponamento cardíaco. Uma pericardiocentese recolheu 650 mL de líquido exsudativo. Em biópsia, foi observado vasculite em capilares sanguíneos (NESBIT; HORTON; LITTMANN, 2011).

Lesões oculares também já foram reportadas, com início de perda de visão unilateral, seguido de vitrite, retinite, hemorragia na retina e edema macular severo (GERWIN; READ; TAYLOR, 2011). Outra possível consequência de infecções por *R. rickettsii*, porém rara, é a produção de autoanticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCA), que foram associados a vasculite severa (NICKERSON; MARIK, 2012).

Interessantemente, ao mesmo tempo preocupante, é o fato de algumas vezes a enfermidade não manifestar os sintomas clássicos de riquetsioses - febre, *rash* maculopapular, dor de cabeça - dificultando o diagnóstico, e podendo levar o paciente à morte. Sintomas inespecíficos de doenças virais comuns e choque séptico, como diarreia, dores musculares, dispneia, miocardite, palidez e cianose (BACCI; NAMURA, 2012; KUSHAWAHA et al., 2013). Um caso de aumento de pressão intracraniana por edema cerebral foi reportado em uma garota de seis anos de idade, que não respondeu ao tratamento com doxiciclina (RAVISH et al., 2013). Fatores associados a casos fatais de RMSF/FMB incluem: sexo masculino; encaminhamento à internação; e sinais de hipotensão e choque. Por sua vez, a presença de linfadenopatia foram relacionados a melhores índices de sobrevivência (OLIVEIRA et al., 2017).

2.7 Diagnóstico

Há desafios quanto ao diagnóstico preciso da RMSF/FMB, pois os principais testes, baseados em identificação de anticorpos circulantes por sorologia, produzem resultados cruzados entre espécies, permitindo apenas a diferenciação destas quanto ao grupo a que pertencem. Estudos utilizando antígenos recombinantes confirmaram a reação cruzada entre as proteínas groEL, Adr2, murC e EF-Tu, que apresentam alta conservação em sequências entre distintas espécies, sugerindo que um teste diagnóstico deva ser baseado em distintos antígenos (KOWALCZEWSKA et al., 2012).

Na América Latina, o método mais largamente utilizado para o diagnóstico de riquetsioses é a IFI, que consiste na detecção de anticorpos circulantes no soro do indivíduo. Este método permite a visualização de riquetsias em microscópio de fluorescência, caso haja a presença de anticorpos. No Brasil, o diagnóstico oficial de riquetsioses humanas é baseada na sorologia contra apenas antígenos de *R. rickettsii*, o que dificulta o diagnóstico de outras riquetsioses, sendo muitas vezes

diagnosticadas erroneamente como RMSF/FMB (WECK et al., 2016). Embora o cultivo de *Rickettsia* spp. seja o padrão ouro como prova de referência, por ser a técnica mais específica, é um método restrito pelo alto custo e exigência de laboratório nível 3 de biossegurança.

A PCR tem se mostrado uma técnica rápida, sensível e específica. Tem a versatilidade de se poder utilizar distintas amostras biológicas para a detecção de DNA de *Rickettsia* spp. O sequenciamento dos genes *gltA*, *opmA* e *OmpB* (OTEO et al., 2014). A PCR foi inicialmente testada para amplificação de DNA de *Rickettsia* spp. em coágulo de sangue de seres humanos por Tzianabos, Anderson e McDade (1989), quando utilizaram um par de *primers* específicos para amplificação de DNA das espécies pertencentes ao GFM, *R. rickettsii* e *R. conorii*. Posteriormente, o método de PCR em tempo real (qPCR) se mostrou mais sensível que a tradicional *nested* PCR, amplamente utilizada nos EUA, tanto para detecção de *Rickettsia* spp., quanto para a espécie *R. rickettsii* (KATO et al., 2013). Em ensaios utilizando biomodelos, a detecção de DNA de *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. slovaca*-símile foi mais eficiente em amostras de pele do que de sangue (em até 60-70% dos animais infectados) (LEVIN; SCHUMACHER, 2016).

Recentemente foi desenvolvido um imunossensor amperométrico, método de diagnóstico sorológico indireto baseado em aplicação de corrente elétrica, capaz de detectar a presença de anticorpos contra *Rickettsia* spp. do GFM quando utilizado um peptídeo sintético Omp3, derivado de um epítipo linear de células B da proteína H6PGA4R (homóloga à OmpA), de *R. rickettsii* de cepa brasileira, como antígeno de captura. Este método se mostrou sensível o suficiente para detectar anticorpos anti-*Rickettsia* spp. utilizando uma pequena quantidade de soro (20 µL) (PRADO et al., 2018).

2.8 Tratamento e prognóstico

Para a determinação de um tratamento mais acurado, e um prognóstico preciso para a RMSF/FMB, alguns fatores acerca do agente e hospedeiro devem ser levados em consideração, como: idade, sexo, comorbidades, etnia, fatores genéticos, resposta imune do hospedeiro - hospedeiro -; virulência entre espécies, subespécies e cepas de *Rickettsia* spp. Após considerados estes fatores, o prognóstico pode ser estimado em conjunto com o tempo de início de tratamento e a escolha de uma antibioticoterapia, baseada em tetraciclina ou cloranfenicol (BOTELHO-NEVERS; RAOULT, 2011).

Dentre as tetraciclinas, a doxiciclina deve ser a molécula de eleição no tratamento de riquetsioses. Apesar de ser um análogo das sulfonamidas, estas provaram ser ineficazes no tratamento de infecções por *Rickettsia* spp., tanto em animais quanto seres humanos. Este fato se deve pela bactéria não conter genes codificantes de proteínas que participam das vias metabólicas alvo das sulfonamidas (REN; HSU, 2014).

2.9 Prevenção e controle

Ensaio vacinais com cepas de *R. rickettsii* mortas foram iniciados na primeira metade do século XX, em cobaios e macacos, mostrando proteção destes animais contra sintomas da doença (SPENCER et al., 1925). Mais tarde, ensaios humanos foram realizados com dois tipos de vacinas com cepas mortas, uma contendo a bactéria em tecidos de carrapato, e outra com a bactéria crescida em sacos vitelínicos de ovos embrionados. Ambas as vacinas não evitaram o desenvolvimento de sintomas, porém, estes foram mais brandos e os pacientes se recuperaram mais rápido, em comparação com aqueles que foram desafiados sem vacinação prévia (DUPONT et al., 1973).

Embora nenhuma vacina esteja comercialmente disponível contra riquetsioses, esforços estão sendo realizados, seja com vacinas com proteínas recombinantes (por

exemplo a rAdr2), de subunidades ou com cepas vivas atenuadas, com a intenção de estimular uma memória imunológica, principalmente via ambas células TCD4+ ou TCD8+ (RICHARDS, 2004; WALKER, 2009; GONG et al., 2014). A proteína recombinante de OmpB (rOmpB) derivada de *R. rickettsii* também demonstrou potencial imunoprotetor, e quando inoculada associada à rAdr2 mostrou-se ainda mais eficaz em redução da infecção por *R. rickettsii* em órgãos de camundongos. A imunoproteção dessas proteínas associadas deve-se principalmente ao estímulo da resposta Th1, com ampla produção de IFN- γ e TNF- α (GONG et al., 2015a). Outro estudo mostrou efeito similar na utilização de rOmpB derivada de *R. rickettsii* na imunoproteção contra a mesma, contudo, nenhum efeito protetor de rOmpB, derivada de *R. conorii*, foi demonstrado contra a *R. rickettsii*, mesmo com ambas proteínas apresentando 92% de identidade entre seus aminoácidos (RILEY et al., 2015). Outra proteína de membrana externa com resultados promissores contra *R. rickettsii* em ensaios em modelo murino é a YbgF, com forte produção de IFN- γ (GONG et al., 2015b).

Curiosamente, foi demonstrado que *R. amblyommatis*, quando infectada em cobaias experimentalmente, induzem no hospedeiro o desenvolvimento de resistência à infecção letal por *R. rickettsii*, o que pode ser relevante para que essa espécie seja um candidato a compor uma vacina baseada em cepas atenuadas (BLANTON et al., 2014; RIVAS et al., 2015).

A falta de uma medida de controle eficaz e definitiva induz à comunidade a procurar por alternativas e integradas. Um projeto de prevenção de RMSF/FMB em população de ameríndios no estado do Arizona (EUA), onde era endêmica a ocorrência de RMSF/FMB, procurou medidas direcionadas ao controle de *R. sanguineus* nos hospedeiros caninos, que receberam colar com flumetrina e imidacloprid para evitar ectoparasitas. Este mesmo projeto também realizou a aplicação de acaricidas líquidos (beta-ciflutrina e imidacloprid) mensalmente nos gramados das casas onde haviam cães participantes. O estudo reportou diminuição na infestação ambiental de *R. sanguineus* por pelo menos dois anos (DREXLER et al., 2014). Aplicação de alfa-cipermetrina e flufenoxuron, ambas a 3%, dispersadas no

ambiente (gramado) é eficiente no controle de carrapatos com efeito residual de até dois meses (BRITES-NETO et al., 2017).

Apesar de haverem estudos sobre medidas de controle do carrapato e vacinas contra riquetsioses em humanos, as medidas eficazes ainda se limitam à prevenção dos seres humanos à picada pelo carrapato, como uso de vestimentas fechadas, repelentes e inspeção corpórea frequente em lugares com alta exposição aos parasitas (MINNIEAR; BUCKINGHAM, 2009).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Elucidar aspectos da biologia e epidemiologia de ixodídeos vetores de *Rickettsia* spp. do GFM, com foco em ecótono Amazônia-Cerrado, Brasil, e propor uma alternativa no controle desses carrapatos por meio de modelo de seleção de antígenos para vacina em hospedeiros animais (domésticos e silvestres).

3.2 Objetivos específicos

- a) Caracterizar o ciclo biológico de *Amblyomma coelebs* e sob condições controladas, utilizando coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) como hospedeiro;
- b) Investigar a presença de *Rickettsia* spp. do GFM em carrapatos de vida livre em fragmentos de mata próximos a ambientes peri-urbano e rural, em ecótono Amazônia-Cerrado, no estado de Rondônia, Brasil;
- c) Avaliar potencial imunogênico de peptídeo sintético de serpinas expressas na glândula salivar de *A. cajennense* s.l. em camundongos Balb/c;
- d) Padronizar cálculo para avaliação de eficácia vacinal e substâncias sistêmicas em carrapatos heteroxenos, sob condições controladas.

4 ARTIGOS COM OS RESULTADOS GERADOS

4.1 Artigo 1 - Publicado na Journal of Medical Entomology (Qualis: B2)

Journal of Medical Entomology Advance Access published February 5, 2015

ARTHROPOD/HOST INTERACTION, IMMUNITY

Successful Feeding of *Amblyomma coelebs* (Acari: Ixodidae) Nymphs on Humans in Brazil: Skin Reactions to Parasitism

MARCOS V. GARCIA,¹ JAQUELINE MATIAS,² ANDRÉ DE A. R. AGUIRRE,² BARBARA G. CSORDAS,² MATIAS P. J. SZABÓ,³ AND RENATO ANDREOTTI^{1,4}

J. Med. Entomol. 1–3 (2015); DOI: 10.1093/jme/tju060

ABSTRACT Identifying the tick species that successfully feed on humans would increase knowledge of the epidemiology of several tick-borne diseases. These species salivate into the host, increasing the risk of pathogen transmission. However, there is a lack of data in the literature regarding the ticks that prefer to feed on humans. Herein, we describe the successful feeding of *Amblyomma coelebs* Neumann nymphs on two of the authors after accidental tick bites occurred during field surveys in two preserved areas of Mato Grosso do Sul, Brazil. One of the host–parasite interactions was closely monitored, and the tick development, gross host skin alterations, and related sensations are presented.

KEY WORDS human parasitism, *Amblyomma coelebs*, tapir, nymph, Brazil

Introduction

Ticks are the primary vectors of a diverse set of pathogens to animals and human beings (Jongejan and Uilenberg 2004). Many of these pathogens are associated with one or a few tick species. Therefore, the geographical distribution of the vector determines where a disease occurs. Because disease onset after a human tick-bite may take several days, the tick vector is often lost, and the origin of the pathogen remains unknown or uncertain. Furthermore, within a given area, one might have various levels of contact with multiple tick species, which may be a determinant for pathogen vectoring. It is, therefore, important to distinguish among ticks that are found crawling on a human host, those that bite but are unable to feed, and those that actually feed, enhancing the likelihood of disease transmission. Unfortunately, information on the tick species that feed on humans is lacking in the literature, and increasing knowledge in this area would certainly improve our understanding of the epidemiology of several tick-borne diseases.

Brazil has 66 ticks species (Martins et al. 2014, Nava et al. 2014), with >50% in the genus *Amblyomma*. A key for identifying *Amblyomma* nymphs has only recently become available (Martins et al. 2010). Therefore, although there is a comprehensive list of tick species in South America that bite humans (Guglielmone et al.

2006), the list does not identify ticks that successfully feed on humans and primarily describes only the adult stage. To our knowledge, only one study has described successful feeding with engorgement and molting of *Amblyomma* ticks on humans (Szabó et al. 2006). We herein describe the successful feeding of *Amblyomma coelebs* nymphs on two of the authors after they received accidental tick bites during field surveys.

Material and Methods

During a survey for tick fauna within two preserved areas of Mato Grosso do Sul, Brazil, several ticks bit the researchers, and in two cases, the tick nymphs remained unnoticed for several hours. These ticks were firmly attached to the skin of the hosts and were able to feed until engorgement. After detachment, the ticks were taken to the laboratory and kept at 28°C with 80% humidity and a photoperiod of 12:12 (L:D) h to encourage molting. The ticks emerged as adults and were identified using standard dichotomous keys (Barros-Battesti et al. 2006).

The first parasitism occurred on the 5th April 2013, on animal trails within a patch of forest in the Aquidauana municipality (20°44'52" S; 55°64'91" W, 220 m above sea level). A tick was found on the right side of the back of one of the authors (A.A.R.A.) 24 h after fieldwork. The second parasitism occurred on the 14th February 2014, on animal trails within a patch of forest in the Terenos municipality (20°56'42" S; 54°51'003" W, 500 m above sea level) and was ~110 km away from the first parasitism. In this case, the tick attached to the left arm of one of the authors (J.M.S.) and was noticed after returning from fieldwork. Both municipalities are rich in wildlife, and the sampled trails are located within the Cerrado Biome. Both human hosts

¹ Laboratório de Biologia Molecular, Empresa Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brazil.

² Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil.

³ Departamento de Patologia, Universidade Federal de Uberlândia, MG, Brazil.

⁴ Corresponding author, e-mail: renato.andreotti@embrapa.br

© The Authors 2015. Published by Oxford University Press on behalf of Entomological Society of America.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>), which permits non-commercial reproduction and distribution of the work, in any medium, provided the original work is not altered or transformed in any way, and that the work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

Table 1. Biological parameters of both tick nymphs of *A. coelebs* that fed on humans

Tick	Host ^a	Probable date of attachment	Species ^b /stage	Attachment site	Feeding period (d)	Engorged nymph weight (mg)	Skin reaction ^c
1	A.A.R.A.	5 April 2013	<i>A. coelebs</i> /nymph	Right side of back	5	6.1	++
2	J.M.S.	14 Feb. 2014	<i>A. coelebs</i> /nymph	Left arm	7	8.8	+++

^aCapital letters are the initials of the authors, who were also the individuals parasitized in this study.

^bSpecies determined through examination of the adult ticks that molted in the laboratory from the engorged nymphs.

^cHyperemia, itching and/or swelling at attachment site during the tick feeding: – insignificant; + slight; ++ moderate; +++ intense.

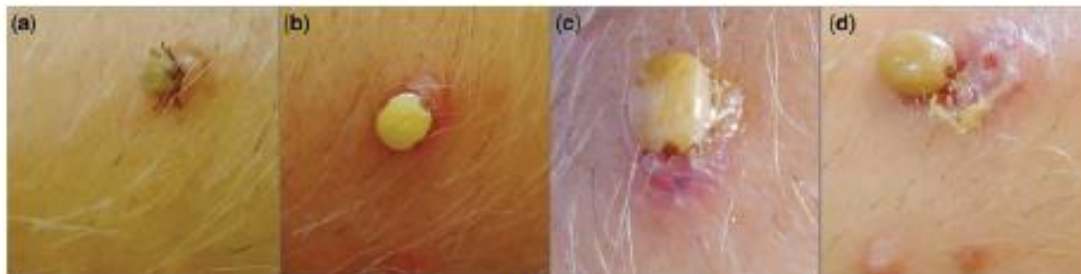


Fig. 1. *A. coelebs* nymph feeding on a human host (J.M.S.): fourth (a), fifth (b), sixth (c), and seventh (d) day of attachment. Note the slight hyperemia of the skin throughout the parasitism and the initially clear (c) and later caseous exudate (d).

were tick-bitten before, although tick species were not recorded.

Ethics

All procedures were performed in accordance with ethical standards specified by the World Medical Association Declaration of Helsinki.

Results and Discussion

The biological parameters of the two tick nymphs found feeding on humans is shown in Table 1. The nymphs were fully engorged 5–7 d after attachment, and both nymphs molted into *A. coelebs* adults. To our knowledge, no information is available in the literature on the biology of *A. coelebs*. Consequently, the feeding period and engorgement weight of the nymphs are provided here for the first time. Similarly, we are unable to compare our findings to tick performance on natural or laboratory hosts. However, the uninterrupted feeding and molting of both nymphs after engorgement indicates that humans are a suitable host for this species. In fact, there are only a few records of human *A. coelebs* bites from both nymphs and adults in Brazil (Labruna et al. 2005, Guglielmo et al. 2006), and none of these records specifies whether the tick was able to feed.

Under natural conditions, *A. coelebs* adults feed primarily on tapirs (Labruna and Guglielmo 2009), whereas nymphs parasitize a greater variety of hosts (Labruna et al. 2005; Martins et al. 2011, 2014). Tapirs were known to use the trails at both survey locations; however, several other wild animals also used the trails. As a result, the previous host for these nymphs is uncertain, although tapirs are clearly the host of many adult ticks. This tick species should, therefore, be considered

an important source of human parasitism, although it has never been associated with pathogen transmission to either human or animal hosts. However, adult ticks in Rondonia, northern Brazil, can be infected with *Rickettsia amblyommii*, a spotted-fever type of *Rickettsia* with an unknown pathogenicity (Labruna et al. 2004).

The reactions to the tick bites were localized, and neither lymphadenopathy nor fever occurred in either human host. One of the parasitisms was closely monitored (J.M.S.), and the tick development, gross skin alterations, and related sensations were noted (Figs. 1 and 2). During the three first days, the tick attachment site was characterized by slight pruritus, swelling, and hyperemia. Tick engorgement appeared on the fourth day and was associated with slight hyperemia and a vesicle on the surface of the skin. This reaction persisted on the fifth day, but the tick size noticeably increased. On the sixth day, a clear fluid (probably an exudate) was seen underneath the tick, and on the seventh day (6 d of feeding) the tick detached from the skin and left a small red ulcer and a caseous exudate on the skin. Intense pruritus occurred on the first day after tick detachment and persisted for the next 6 d. Thereafter, the pruritus decreased in intensity until the 25th day postdetachment. The skin lesion after tick detachment was elevated and slightly hyperemic for several days, and it presented a caseous spot on the sixth day with crusts afterwards. On the 25th day, a small, slightly bulging scar remained at the tick-attachment site.

The observed skin reactions to the ticks were minor. The slight hyperemia and exudate can be attributed to an inflammatory reaction that was undoubtedly modulated at unknown levels by tick saliva (reviewed in Wikel 2013). The variations in pruritus intensity can be similarly explained, and increased pruritus occurred after tick detachment, despite the fact that no additional saliva was inoculated into the skin.

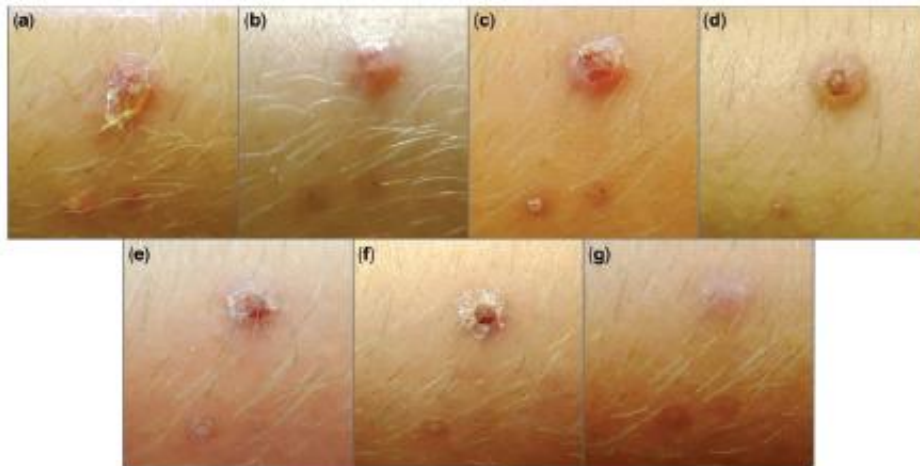


Fig. 2. Tick attachment site 1 (a), 3 (b), 6 (c), 9 (d), 13 (e), 16 (f), and 25 (g) d after host detachment. Note the small red ulcer and a caseous exudate on the skin (a); elevated and slight hyperemia for several days (b–f); and small, slightly bulging scar at the end of the follow-up period (g).

In conclusion, we report that humans are suitable hosts for *A. coelebs* nymphs. The saliva from this tick species seems to effectively modulate human reactions; the nymphs engorge within a few days; the reactions were minor; and pruritus worsened only after tick detachment. Consequently, further information on this tick species, such as the associated pathogens throughout its range and its biological characteristics, are important future research topics.

Acknowledgments

This work was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Gado de Corte (EmbrapaCGC).

References Cited

- Barros-Battesti, D. M., M. Arzua, and G. H. Becham. 2006. Carnipatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical. Um Guia Ilustrado para Identificação de Espécies. Vox International Consortium on Ticks and Tick Borne Diseases (ICTTD-3)/Butantan, São Paulo, Brazil.
- Guglielmo, A. A., L. Beati, D. M. Barros-Battesti, M. B. Labruna, S. Nava, J. M. Venzal, A. J. Mangold, M. P. Szabó, J. R. Martins, D. González-Acuña, et al. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp. Appl. Acarol.* 40: 83–100.
- Jongejans, F., and G. Uilenberg. 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129: S3–S14.
- Labruna, M. B., and A. A. Guglielmo. 2009. Ticks of new world tapirs. *Tapir Conserv.* 18: 21–28.
- Labruna, M. B., T. Whitworth, D. H. Bouyer, J. McBride, L. M. A. Camargo, E. P. Camargo, V. Popov, and D. H. Waller. 2004. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J. Med. Entomol.* 41: 1073–1081.
- Labruna, M. B., L. M. Camargo, F. A. Terrasini, E. Ferreira, T. S. Schumaker, and E. P. Camargo. 2005. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Syst. Appl. Acarol.* 10: 17–32.
- Martins, T. F., V. C. Onofrio, D. M. Barros-Battesti, and M. B. Labruna. 2010. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. *Ticks Tick Borne Dis.* 1: 75–89.
- Martins, T. F., M. M. Furtado, A. T. Jacomo, L. Silveira, R. Sollmann, N. M. Tôres, and M. B. Labruna. 2011. Ticks on free-living wild mammals in Emas National Park, Goiás State, Central Brazil. *Syst. Appl. Acarol.* 16: 201–206.
- Martins, T. F., J. M. Venzal, F. A. Terrasini, F. B. Costa, A. Marcili, L. M. Camargo, D. M. Barros-Battesti, and M. B. Labruna. 2014. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 62: 121–128.
- Nava, S., L. Beati, M. B. Labruna, A. G. Cáceres, A. J. Mangold, and A. A. Guglielmo. 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* () with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. And *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 5: 252–276.
- Szabó, M. P. J., M. B. Labruna, C. C. Castagnoli, M. V. Garcia, A. Pinter, V. A. Veronez, G. M. Magalhães, M. B. Castro, and A. Vogliotti. 2006. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. *Exp. Appl. Acarol.* 39: 339–346.
- Wikel, S. K. 2013. Ticks and tick-borne pathogens at the cutaneous interface: host defenses, tick countermeasures, and a suitable environment for pathogen establishment. *Front. Microbiol.* 4:337.

Received 13 August 2014; accepted 8 December 2014.

4.2 Artigo 2 – Aceito na Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária - Brazilian Journal of Veterinary Parasitology (Qualis: B3)

Braz. J. Vet. Parasitol., Jaboticabal,
ISSN 0103-846X (Print) / ISSN 1984-2961 (Electronic)
Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612018003>

Biological parameters of *Amblyomma coelebs* Neumann, 1906 (Acari: Ixodidae) under experimental conditions

Parâmetros biológicos de *Amblyomma coelebs* Neumann, 1906 (Acari: Ixodidae) em condições experimentais

André de Abreu Rangel Aguirre^{1,2}; Vinicius da Silva Rodrigues^{1,3}; Ivancide Nunes da Costa⁴; Marcos Valerio Garcia^{3,5};
Leandro de Oliveira Souza Higa^{1,3}; Jansen Fernandes Medeiros²; Renato Andreotti^{1,3*}

¹ Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias – FAMED, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, MS, Brasil

² Laboratório de Entomologia, Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ, Porto Velho, RO, Brasil

³ Laboratório de Biologia do Carrapato, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil

⁴ Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia – UNIR, Porto Velho, RO, Brasil

⁵ Programa de Desenvolvimento Científico Regional – DCR, Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia – FUNDECT, Governo do Estado de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

Received November 10, 2017

Accepted January 11, 2018

Abstract

One generation of *Amblyomma coelebs* life cycle under experimental conditions was evaluated. Ten tick pairs were allowed to feed on rabbits under laboratory conditions (LC), resulting six engorged females with a mean weight of 1,403.9 mg. Two females were maintained in a forest reserve under natural conditions (NC), and four were maintained in incubators (LC). The engorgement period lasted 10.33 days. Pre-oviposition periods were 10.75 (NC) and 22 days (LC). The mean egg-mass weight was 514.76 mg, and the blood meal conversion index was 36.67% (LC). Incubation period under NC and LC were 91 and 56.33 days and hatching rates were 50% and 28.33%, respectively. Larval engorgement period ranged from 4 to 10 days, with average weight of 1.1 mg. Engorged larvae were incubated under NC and LC, with a premolt period of 27 to 36 days and molting rate of 7.1% and 28.7%, respectively. Nymphal engorgement period ranged from 5 to 7 days, with a mean weight of 18.8 mg and a recovery rate of 54.54%. In LC, the ecdysis mean period was 24.5 days, and molting rate was 44.44%, resulting in 24 adult *A. coelebs*. Our results show a life cycle of 187.45 (NC) and 149 (LC) days.

Keywords: *Amblyomma coelebs*, life cycle, biological parameters, experimental conditions, rabbits.

Resumo

Uma geração do ciclo de vida de *Amblyomma coelebs* em condições laboratoriais foi avaliada. Dez casais de carrapatos foram alimentados em coelhos sob condições laboratoriais (CL), resultando em seis fêmeas ingurgitadas, com um peso médio de 1.403,9 miligramas (mg). Duas fêmeas foram mantidas em uma reserva florestal sob condições naturais (CN), e quatro foram mantidas em incubadoras (CL). O período de ingurgitamento durou 10,33 dias. Períodos de pré-postura foram de 10,75 (CN) e 22 dias (CL). O peso médio das massas de ovos foi de 514,76 mg e o índice de conversão alimentar foi de 36,67% (CL). O período de incubação em CN e CL foi de 91 e 56,33 dias e os percentuais de eclosão foram de 50% e 28,33%, respectivamente. O período de ingurgitamento larval variou de quatro a 10 dias, com peso médio de 1,1 mg. Larvas ingurgitadas foram incubadas em CN e CL, com período de pré-muda de 27 a 36 dias e percentual de ecdise de 7,1% e 28,7%, respectivamente. O período de ingurgitamento das ninfas oscilou de cinco a sete dias, com peso médio de 18,8 mg e uma taxa de recuperação de 54,54%. Em CL, o período médio de ecdise foi de 24,5 dias, e o percentual de muda foi 44,44%, resultando em 24 adultos de *A. coelebs*. Estes resultados demonstram um ciclo de vida de 187,45 (CN) e 149 (CL) dias.

Palavras-chaves: *Amblyomma coelebs*, ciclo de vida, parâmetros biológicos, condições experimentais, coelhos.

*Corresponding author: Renato Andreotti. Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, nº 830, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil. e-mail: renato.andreotti@embrapa.br

Introduction

Amblyomma coelebs Neumann is one of the 71 species composing the Brazilian tick fauna, which included 46 species from the Ixodidae family and 25 from the Argasidae family (KRAWCZAK et al., 2015; LABRUNA et al., 2016; WOLF et al., 2016; MUÑOZ-LEAL et al., 2017). *Amblyomma coelebs* is geographically distributed in Neotropical and Nearctic regions (ONOFRIO et al., 2006). In Brazil, it has been reported to occur in the states of São Paulo, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Rondônia, Acre, Mato Grosso, Roraima, Pará and Espírito Santo (GUIMARÃES et al., 2001; LABRUNA et al., 2002b, 2004b; ARZUA et al., 2005; SARAIVA et al., 2012).

Adults of this species prefer parasitizing tapirs (*Tapirus terrestris*) (LABRUNA & GUGLIELMONE, 2009; GUGLIELMONE et al., 2014) but can also be found parasitizing equines (BELDOMÉNICO et al., 2003). They have also been found parasitizing other mammals and birds (OGRZEWSKA et al., 2010; NAVA et al., 2017; LOPES et al., 2016). Nymphs appear to be more generalists and exploit a larger host range that includes carnivores, marsupials, rodents, birds and, occasionally, humans (BELDOMÉNICO et al., 2003; SPONCHIADO et al., 2015; GARCIA et al., 2015; OGRZEWSKA & PINTER, 2016; OGRZEWSKA et al., 2009; 2010; ITO et al., 2017).

The importance of this tick as a pathogen vector has been described by Labruna et al. (2004b), who in a study of ixodid species with *Rickettsia* infections found that *A. coelebs* may be a carrier of *Rickettsia amblyommatis*, formerly known as "*Candidatus Rickettsia amblyommi*" (KARPATY et al., 2016), as also reported by Silveira et al. (2015). The pathogenicity of this *Rickettsia* species is still uncertain (NAVA et al., 2017), but findings from these studies suggest that *A. coelebs* is a possible vector and may be a carrier of other agents with zoonotic potential for animals and humans.

In view of this information, there is a need for a better understanding of the biological aspects of this species under experimental conditions and its relationships with its hosts.

Materials and Methods

Study location and animal use

The study was carried out in the Tick Biology Laboratory (Laboratório de Biologia do Carrapato) in the Animal Health Department of Embrapa Gado de Corte (20°25'03" S / 54°42'20" W), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil.

The Ethics Commission on the Use of Animals (CEUA) at the Federal University of Mato Grosso do Sul (UFMS) approved this study under protocol number 699/2015.

Tick collection

Twelve adult *A. coelebs* (four female and eight male) were captured using dry ice traps (CO₂) as described by Oliveira et al. (2000), and fourteen ticks (seven female and seven male) were captured using

the cloth dragging technique (RECHAV, 1982). These free-living ticks were captured in a forest reserve belonging to the Embrapa Gado de Corte experimental farm in the municipality of Terenos (20°33'11.7" S / 54°48'49.0" W), Mato Grosso do Sul, Brazil.

After capture, the ticks were placed in tubes with perforated tops, transported to the Tick Biology Laboratory and identified according to the dichotomous key proposed by Barros-Battesti et al. (2006).

Experimental infestation with adult *A. coelebs*

Six New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) with no previous tick contact and of undetermined sex were used for infestation. Rabbits were chosen as the experimental host because they are easy to acquire and to handle in the laboratory. In addition, juvenile instars of various tick species are known to parasitize small mammals (TATCHELL, 1987). Tick feeding chambers were used following the technique previously described by Szabó et al. (1995). Two rabbits were infested with *A. coelebs*. Five pairs of adult ticks were placed in separate feeding chambers on each rabbit.

Recovery of engorged females

Six engorged female ticks were collected after completing their blood meal. They were placed into individual tubes with perforated tops, weighed individually and divided into two groups:

Group 1: Four engorged females were maintained in B.O.D. incubators at 28°C (82.4°F) and 80% humidity in individual tubes with perforated tops (laboratory conditions; LC).

Group 2: Two engorged females were packed into cylindrical stainless steel wire tubes (60 mesh/cm², 61 mm length, 37 mm diameter) that were sealed with rubber stoppers. The females were taken to a riparian forest reserve located within the Embrapa Gado de Corte in Campo Grande in July (07/16/2016). The tubes were placed horizontally on the soil surface along the roots of vegetation. The area was on the edge of a stream under dense vegetation and had a high humidity (natural conditions; NC). The temperature and humidity at the site were measured daily using a thermo-hygrometer (Highmed) to record maximum and minimum values. The thermos-hydrometer was placed in contact with the ground.

Infestation with *A. coelebs* larvae and nymphs

Approximately 2,200 larvae were used to infest two rabbits in individual feeding chambers. All larvae used in experimental infestations were between 15 and 25 days old. After their blood meal, engorged larvae were collected daily from the chambers, counted and weighed. Engorged larvae were separated into two lots: Lot 1 was composed of 113 larvae that were taken to the forest reserve (NC) in November (11/21/2016); and Lot 2 was composed of 317 larvae that were maintained in B.O.D. incubators (LC) (28°C, 80% relative humidity, 12:12 light: dark) until ecdysis.

A total of 99 nymphs developed from the larvae maintained in the laboratory and in the forest reserve, which were used to infest two rabbits. The chambers were monitored daily, and

engorged nymphs were collected, individually weighed, placed in vials and taken to the laboratory, where they were held in B.O.D incubators for posterior ecdysis.

Biological parameters evaluated

The recovery rate, engorgement period, engorged female weight, pre-oviposition period, egg-mass weight, blood meal conversion index (BENNETT, 1974), egg incubation period and hatching rate, determined by visual estimation (LABRUNA et al., 2000), were evaluated. The egg-mass weight and blood meal conversion index were not determined in the engorged female ticks allocated to the NC treatment because we decided not to manipulate them to prevent stress, death and egg desiccation.

For larval and nymphal instars, the following parameters were measured following the methods described by Sanches et al. (2008) and Szabó et al. (2009): period of engorgement, weight, molting duration, recovery rate and molting success rate.

Results

The biological parameters measured in *A. coelebs* are presented in Tables 1, 2 and 3.

The mean engorgement period of *A. coelebs* females was 10.33 days; after the blood meal, six engorged ticks were recovered (60% recovery rate), with an average weight of 1,403.91 mg. The pre-oviposition periods of engorged females under natural (NC) and laboratory (LC) conditions were 22 and 10.75 days, respectively. The mean egg-mass weight was 514.76 mg, and the blood meal conversion index was 36.67% under LC. Incubation periods

for the eggs maintained in NC and LC were 91 and 56.33 days, respectively, and the larval hatching rates were 50% and 28.33%, respectively (Table 1).

Only one engorged female tick recovered and maintained under NC oviposited, and larvae were subsequently obtained from these eggs. Only one engorged female tick maintained under LC died after initiating oviposition, while the others successfully completed oviposition (Table 1).

The larval engorgement period ranged from 4 to 10 days. The mean weight of larvae was 1.1 mg, and the recovery rate was 19.54%. The molting success rates for nymphs were 7.1% and 28.7%, under NC and LC, respectively. Biological parameters for larvae are shown in Table 2.

A total of 99 nymphs were obtained from engorged larvae maintained under NC (8) and LC (91). Fed nymphs showed an engorgement period ranging from 5 to 7 days, a mean weight of 18.8 mg and a recovery rate of 54.54% (54 engorged nymphs). All nymphs were maintained under LC. The duration of the molting process was 24.5 days, and the molting success rate was 44.44%, resulting in 24 adult ticks (Table 3).

Discussion

We present, for the first time, the biological parameters of the life cycle of *A. coelebs* when allowed to engage in natural feeding behaviors on laboratory hosts (New Zealand rabbits) and maintained under experimental conditions (NC and LC).

The adult phase of *A. coelebs* was able to exploit rabbits as an experimental host, and the ticks were able to successfully engorge, as demonstrated by the recovery rate of engorged females, their mean weight and the mean egg-mass weight. However, some

Table 1. Mean, Standard Deviation and Amplitude (in parentheses) related to the biological parameters of *Amblyomma coelebs* female ticks in laboratory condition (LC) and natural condition (NC) in Campo Grande, MS, Brazil.

Biological parameters	E.P.* (days)	E.F.W.* (mg)	P.O.P (days)	E.M.W. (mg)	F.C.R. (%)	Inc.P. (days)	L.H.R. (%)
Laboratory (LC)	10.33±1.36 (8-12)	1403.91± 574.72 (544-2146.9)	10.75±1.70 (9-13)	514.76± 364.9 (175-905.5)	36.67± 9.35 (32.2-50)	56.33±11.37 (47-69)	28.33± 36.17 (5-70)
Natural (NC)			22±0 (22)	-	-	91±0 (91)	50±0 (50)

- Values not obtained; E.P. = Engorgement Period (days); E.F.W. = Engorged Female Weight (mg); P.O.P = Pre-oviposition Period (days); E.M.W. = Egg Mass Weight (mg); F.C.R. = Feed Conversion Ratio (%); Inc.P. = Incubation period (days); L.H.R. = Larvae Hatching Rate (%). *Parameters "E.P." and "E.F.W." both performed only in laboratory conditions.

Table 2. Mean, Standard Deviation and Amplitude (in parentheses) related to the biological parameters of *Amblyomma coelebs* larvae fed on rabbit and maintained in laboratory condition (LC) and natural condition (NC) in Campo Grande, MS, Brazil.

Biological parameters	E.P.* (days)	Weight (mg)*	P.M.P. (days)	M.S. (%)
Laboratory (LC)	5.62±1.62 (4-10)	1.11±0.17 (0.7-1.5)	36	28.7
Natural (NC)			28±1 (27-29)	7.1

E.P. = Engorgement Period; P.M.P. = Premolt period; M.S. = molting success. *Parameters "E.P." and "Weight" both performed only in laboratory conditions.

Table 3. Mean, Standard Deviation and Amplitude (in parentheses) related to the biological parameters of *Amblyomma coelebs* nymphs in laboratory conditions, Campo Grande, MS, Brazil.

Biological Parameters					
Number of exposed nymphs	Number of nymphs that engorged	Engorgement Period (days)	Weight (mg)	Pre-molt period (days)	Molting success (%)
99	54 (54.54%)	6±1.41 (5 -7)	18.8±10.2 (11,6 – 26,03)	24.5±2.12 (23 – 26)	44.44

difficulties were observed in the subsequent developmental stages of the life cycle of this species.

Difficulties have also been reported by other authors for several tick species, which has required the use of hosts either similar to or different than the natural hosts to facilitate the successful rearing of ticks and maintenance of colonies; this can alter the duration of the life cycle in some species (e.g., in Argasidae and Ixodidae) (RODRIGUES et al., 2002; LABRUNA et al., 2002b; SANCHES et al., 2008; OLEGÁRIO et al., 2011).

The use of rabbits as alternative hosts is a well-established method for the maintenance of colonies of diverse tick species of the genera *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Dermacentor*, and *Haemaphysalis*. Rabbits are easy to maintain and handle in the laboratory, and it is easy for juvenile instars of certain tick species to successfully parasitize them (GUGLIELMONE et al., 1991; MANGOLD & GUGLIELMONE, 1993; BECHARA et al., 1995; TROUGHTON & LEVIN, 2007; RODRIGUES et al., 2017).

In this study, we attributed some of the difficulties in perpetuating several generations of *A. coelebs* to issues related to egg incubation, the low rate of recovery for engorged larvae and the death of larva. Most of the tick eggs became desiccated, preventing larva from hatching. A considerable number of engorged larvae died under conditions where the temperature and humidity were controlled and in the natural environment. Considering the results presented here, the abiotic conditions were not ideal for some stages of the tick life cycle; however, the conditions were satisfactory for the analysis of the biological parameters we assessed. The engorged larvae allocated to the NC were introduced in the transition period between spring and summer, which is a period with hot and humid days and high light levels, which is theoretically unfavorable for this instar stage: according to Labruna et al. (2002a, 2003a), from studies on the population dynamics of *Amblyomma sculptum* (published as *Amblyomma cajennense*), conditions corresponding to those that occur in November are only favorable for adult ticks of the genus *Amblyomma* in Brazil.

These observations corroborate the data presented by Szabó et al. (2009) in a study of the life cycle of *A. incisum*. These authors changed their protocol to include a natural reserve area in the study in an attempt to observe some of the biological parameters of this tick species. In the current study, due to the difficulties of observing some of the biological parameters of the tick free-living stage, we attempted to maintain *A. coelebs* in a natural environment as described by Szabó et al. (2009).

Maintaining abiotic factors such as temperature, humidity and photoperiod within acceptable ranges is fundamental for the maintenance of tick colonies. Most studies concerning the maintenance of ticks under controlled conditions report temperatures varying from 27 to 29°C and a range of relative humidity values between 70 and 90% (BECHARA et al., 1995; RODRIGUES et al., 2002; LABRUNA et al., 2002a, 2003a; SZABÓ et al., 2009; OLEGÁRIO et al., 2011), which is in agreement with the methodology of the current study as we maintained a temperature of 28°C and a relative humidity of least 80% for ticks raised under LC.

The average ambient temperatures for engorged female ticks and engorged larvae under NC (forest) were 25°C and 28°C, respectively. However, because the area is near a stream, the

relative humidity for the two periods ranged from 75 to 90%. It is important to keep in mind that the experimental ticks were, at least theoretically, in a favorable microenvironment, with suitable temperatures and humidity due to the abiotic effects of the forest and river. This area is also a natural habitat and part of the ecosystem of the tick's main host, the tapir (unpublished data).

Life cycles, under laboratory conditions, of other tick species which parasite tapirs were already described, such as *Amblyomma ovale* (MARTINS et al., 2012), *Amblyomma dubitatum* (published as *Amblyomma cooperi* – LABRUNA et al., 2004a), *Amblyomma triste* (LABRUNA et al., 2003b) and *Amblyomma oblongoguttatum* (MARTINS et al., 2017). When fed on rabbits, larvae of *A. triste*, *A. ovale* and *A. oblongoguttatum* present a recovery rate lower than 20%, a value similar to the one obtained on this study. For nymphs, on the same host species, recovery rates described for these tick species is also lower than 20% (LABRUNA et al., 2003b; MARTINS et al., 2012; 2017). Nymphs of *A. dubitatum*, when submitted to feeding on *Cavia porcellus*, present a recovery rate of 36% (LABRUNA et al., 2004a). This differed from results of the present study, which demonstrated a recovery rate higher than 50%. Regarding engorging periods of larvae and nymphs of different cited tick species, results are similar amongst each other (LABRUNA et al., 2003b; 2004a; MARTINS et al., 2017) and corroborate with values obtained on this experiment.

The abovementioned colony management practices together with the use of rabbits as hosts for the larval stage may have caused death, especially for eggs and engorged larvae, because little is known about the dynamics of larval parasitism in this species. The low rate of recovery of engorged larvae demonstrated in the present study is also worth mentioning as it suggests that the rabbits were not adequate hosts for this instar stage. Data from Ogrzewalska et al. (2009, 2010) show that birds can serve as hosts but that this is not common, and only a few individuals of this tick species have been found parasitizing birds in two different study areas, including the Amazon in northern Brazil and the Atlantic rain forest region.

The nymphal stage was the only stage that was amenable to both the experimental host and the controlled temperature and humidity (LC), and this stage showed a high recovery rate in which the majority of individuals became engorged and later molted to adults. However, it is known that this instar stage shows non-selective parasitism and exploits a wide variety of hosts, including humans, even if only occasionally (BELDOMÉNICO et al., 2003; LABRUNA et al., 2005; SARAIVA et al., 2012; SPONCHIADO et al., 2015; GARCIA et al., 2015; OGRZEWSKA & PINTER, 2016; OGRZEWSKA et al., 2009, 2010; ITO et al., 2017).

It is worth mentioning that despite the difficulties encountered in this study, the results are consistent and highly informative because until now nothing was known about the biological parameters related to the life cycle of *A. coelebs*. There has only been one previously published study regarding adult and nymphs ticks of this species parasitizing humans (BELDOMÉNICO et al., 2003; GARCIA et al., 2015).

On the basis of the biological parameters evaluated in this study, we can infer that the life cycle of *A. coelebs* maintained under partially NC and under LC can be completed in 187.45 and 149.53 days, respectively. Part of the knowledge gap concerning the biological

parameters of this tick species under experimental conditions has been filled here; however, there is still a need for additional studies to better understand the influences of abiotic factors and host-related factors on the life cycle of this tick species.

Acknowledgements

We thank the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul (Fundect, MS) - Governo do Estado de Mato Grosso do Sul and Embrapa Gado de Corte. We also thank the Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Rondônia (Fapero-RO) - Governo do Estado de Rondônia and the Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rondônia.

References

- Arzua M, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Rev Bras Zool* 2005; 22(3): 623-632. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-81752005000300015>.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. 223 p.
- Bechara GH, Szabó MPJ, Ferreira BR, Garcia MV. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Rev Bras Parasitol Vet* 1995; 4(2): 61-66.
- Beldoménico PM, Baldi JC, Antoniazzi LR, Orduna GM, Mastropaolo M, Macedo AC, et al. Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) present at Parque Nacional El Rey, Argentina. *Neotrop Entomol* 2003; 32(2): 273-277. <http://dx.doi.org/10.1590/S1519-566X2003000200012>.
- Bennett GF. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia* 1974; 16(1): 52-61. PMID:4463680.
- Garcia MV, Matias J, Aguirre AAR, Csordas BG, Szabo MPJ, Andreotti R. Successful feeding of *Amblyomma coelebs* (Acari: Ixodidae) nymphs on humans in Brazil: skin reactions to parasitism. *J Med Entomol* 2015; 52(2): 117-119. PMID:26336294. <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tju060>.
- Guglielmone AA, Mangold AJ, Garcia MD. The life cycle of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari, Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 1991; 13(2): 129-136. PMID:1786743. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01193663>.
- Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG. *The hard ticks of the world (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. London: Springer; 2014.
- Guimarães JC, Tucci EC, Barros-Battesti DM. *Ectoparasitos de importância veterinária*. São Paulo: Plêiade; 2001. 213 p.
- Ito K, Taniguchi H, Ohtaki N, Ando S, Kawabata H. A first case of tick bite by *Amblyomma coelebs* in Japan. *J Dermatol* 2017; 1-2. PMID:28326613.
- Karpathy SE, Slater KS, Goldsmith CS, Nicholson WL, Paddock CD. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia* associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in North, Central and South America. *Int J Syst Evol Microbiol* 2016; 66(12): 5236-5243. PMID:27638476. <http://dx.doi.org/10.1099/ijsem.0.001502>.
- Krawczak FS, Martins TF, Oliveira CS, Binder LC, Costa FB, Nunes PH, et al. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. *J Med Entomol* 2015; 52(1): 28-37. PMID:26336277. <http://dx.doi.org/10.1093/jme/tju007>.
- Labruna MB, Amaku M, Metzner JA, Pinter A, Ferreira F. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. *J Med Entomol* 2003a; 40(2): 170-178. PMID:12693845. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.170>.
- Labruna MB, Fugisaki EYM, Pinter A, Duarte JMB, Szabó MJ. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 2003b; 30(4): 305-316. PMID:14756395. <http://dx.doi.org/10.1023/B:APPA.0000006514.02451.6d>.
- Labruna MB, Camargo LMA, Terrassini FA, Ferreira F, Schumaker TS, Camargo EP. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Syst Appl Acarol* 2005; 10(0): 17-32. <http://dx.doi.org/10.11158/saa.10.1.4>.
- Labruna MB, Guglielmone AA. Ticks of New World tapirs. In: Traeholt C, editor. *Tapir conservation*. Houston: Zoo Inc.; 2009. p. 21-28.
- Labruna MB, Kasai N, Ferreira F, Faccini JLH, Gennari MS. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2002a; 105(1): 65-77. PMID:11879967. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00649-5](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00649-5).
- Labruna MB, Paula CD, Lima TF, Sana DA. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto Primavera Hydroelectric power station area, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002b; 97(8): 1133-1136. PMID:12563479. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000800012>.
- Labruna MB, Leite RC, Faccini JLH, Ferreira F. Life cycle of the tick *Haemaphysalis leporis-palustris* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 2000; 24(9): 683-694. PMID:11227826. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1010768511790>.
- Labruna MB, Nava S, Marcili A, Barbieri AR, Nunes PH, Horta MC, et al. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. *Parasit Vectors* 2016; 9(1): 511. PMID:27655282. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1796-7>.
- Labruna MB, Pinter A, Teixeira RHE. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. *Exp Appl Acarol* 2004a; 32(1-2): 79-88. PMID:15139274. <http://dx.doi.org/10.1023/B:APPA.0000018228.05088.26>.
- Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LMA, Camargo P, et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol* 2004b; 41(6): 1073-1081. PMID:15605647. <http://dx.doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1073>.
- Lopes MG, May LJ, Foster RJ, Harmsen BJ, Sanchez E, Martins TF, et al. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. *Parasit Vectors* 2016; 9(1): 62. PMID:26831147. <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1348-1>.
- Mangold AJ, Guglielmone AA. The life cycle of *Amblyomma pseudoparvum* (Acari: Ixodidae) in the laboratory. *Exp Appl Acarol* 1993; 17(5): 377-380. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00058600>.
- Martins TF, Luz HR, Faccini JLH, Labruna MB. Life-cycle of *Amblyomma oblongoguttatum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl*

- Acarol* 2017; 71(4): 415-424. PMID:28493036. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-017-0135-9>.
- Martins TF, Moura MM, Labruna MB. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 2012; 56(2): 151-158. PMID:22113779. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-011-9506-9>.
- Muñoz-Leal S, Toledo LF, Venzal JM, Marcili A, Martins TF, Acosta ICL, et al. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: *Ornithodoros*) associated with stream-breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: *Cycloramphus*) in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8(5): 682-692. PMID:28506539. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.04.015>.
- Nava S, Venzal JM, González-Acuná D, Martins TF, Guglielmone AA. *Ticks of the Southern Cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance*. London: Elsevier; 2017.
- Ogrzewalska M, Pacheco RC, Uezu A, Richtzenhain LJ, Ferreira F, Labruna MB. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in Atlantic rain forest region of Brazil. *J Med Entomol* 2009; 46(5): 1225-1229. PMID:19769058. <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0534>.
- Ogrzewalska M, Pinter A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. *Braz J Vet Res Anim Sci* 2016; 53(1): 1-31. <http://dx.doi.org/10.11606/issn.1678-4456.v53i1p1-31>.
- Ogrzewalska M, Uezu A, Labruna MB. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitol Res* 2010; 106(4): 809-816. PMID:20140452. <http://dx.doi.org/10.1007/s00436-010-1733-1>.
- Olegário MMM, Gerardi M, Tsuruta AS, Szabó MPJ. Life cycle of the tick *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) and suitability of domestic hosts under laboratory conditions. *Vet Parasitol* 2011; 179(1-3): 203-208. PMID:21353392. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.01.056>.
- Oliveira PR, Borges LMF, Lopes CML, Leite RC. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Vet Parasitol* 2000; 92(4): 295-301. PMID:10996741. [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00322-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00322-8).
- Onofrio VC, Venzal JM, Pinter A, Szabo MPJ. Família Ixodidae: Características gerais, comentários e chave para gêneros. In: Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006. p. 29-39.
- Rechav Y. Dynamics of tick populations (Acari: Ixodidae) in the Eastern Cape province of South-Africa. *J Med Entomol* 1982; 19(6): 679-700. PMID:7154025. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/19.6.679>.
- Rodrigues DS, Carvalho HA, Fernandes AA, Freitas CMV, Leite RC, Oliveira PR. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97(6): 853-856. PMID:12386709. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000600018>.
- Rodrigues VS, Garcia MV, Cruz BC, Maciel WG, Zimmermann NP, Koller WW, et al. Life cycle and parasitic competence of *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae) on different animal species. *Ticks Tick Borne Dis* 2017; 8(3): 379-384. PMID:28063831. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.12.014>.
- Sanches GS, Bechara GH, Garcia MV, Labruna MB, Szabó MPJ. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol* 2008; 44(1): 43-48. PMID:18188669. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-007-9127-5>.
- Saraiva DG, Fournier GF, Martins TF, Leal KP, Vieira FN, Câmara EM, et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. *Exp Appl Acarol* 2012; 58(2): 159-166. PMID:22585005. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-012-9570-9>.
- Silveira I, Martins TF, Olegário MM, Peterka C, Guedes E, Ferreira F, et al. Rickettsial infection in animals, humans and ticks in Paulicéia, Brazil. *Zoonoses Public Health* 2015; 62(7): 525-533. PMID:25643912. <http://dx.doi.org/10.1111/zph.12180>.
- Sponchiado J, Melo GL, Martins TF, Krawczak FS, Labruna MB, Cáceres NC. Association patterns of ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) of small mammals in Cerrado fragments, western Brazil. *Exp Appl Acarol* 2015; 65(3): 389-401. PMID:25633262. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-014-9877-9>.
- Szabó MPJ, Mukai LS, Rosa PCS, Bechara GH. Differences in the acquired resistance of dogs, hamsters, and guinea pigs to repeated infestations with adult ticks *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Braz J Vet Res Anim Sci* 1995; 32(1): 43-50.
- Szabó MPJ, Pereira LF, Castro MB, Garcia MV, Sanches GS, Labruna MB. Biology and life cycle of *Amblyomma incisum* (Acari: Ixodidae). *Exp Appl Acarol* 2009; 48(3): 263-271. PMID:19130270. <http://dx.doi.org/10.1007/s10493-008-9234-y>.
- Tatchell RJ. Interactions between ticks and their hosts. *Int J Parasitol* 1987; 17(2): 597-606. PMID:3294670. [http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519\(87\)90136-6](http://dx.doi.org/10.1016/0020-7519(87)90136-6).
- Troughton DR, Levin MLL. Life Cycles of Seven Ixodid Tick Species (Acari: Ixodidae) Under Standardized Laboratory Conditions. *J Med Entomol* 2007; 44(5): 732-740. PMID:17915502. <http://dx.doi.org/10.1093/jmedent/44.5.732>.
- Wolf RW, Aragona M, Muñoz-Leal S, Pinto LB, Melo ALT, Braga IA, et al. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 2016; 7(3): 449-456. PMID:26782931. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.01.005>.

4.3 Artigo 3 - Submetido à Ticks and Tick-borne Diseases - Em revisão (Qualis: B1)

Manuscript Details

Manuscript number	TTBDIS_2017_215_R1
Title	New records of tick-associated spotted fever group Rickettsia in an Amazon-Savannah ecotone, Brazil
Article type	Research Paper

Abstract

Human rickettsiosis has been recorded in the Amazon Biome. However, the epidemiological cycle of rickettsiosis has not been fully accounted for in the Amazon region. This study investigates the presence of spotted fever group (SFG) Rickettsia spp. in free-living ticks of the Amblyomma genus. The study was conducted in seven municipalities in Rondonia State, Brazil, where the main biomes are Amazon forest, Brazilian Savannah and their ecotones (areas of ecological tension between open ombrophilous forest and savannah). The species of tick collected, included: Amblyomma cajennense (sensu lato) (s.l.), A. cajennense (sensu strictu) (s.s.), A. coelebs, A. naponense, A. oblongoguttatum, A. romitti, A. sculpturatum and A. sculptum. A total of 167 adults, 248 nymphs and 1004 larvae were subjected to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) to determine the presence of SFG Rickettsia spp. PCR positive samples included: one A. cajennense (s.s.) female and one A. cajennense (s.l.) male from a rural area in Vilhena Municipality; 10 nymphs and a sample of larvae of A. cajennense (s.l.) from a peri-urban area in Cacoal Municipality; and an A. oblongoguttatum adult male from a rural area of Pimenta Bueno Municipality. All sequences obtained exhibited 100% identity with Rickettsia amblyommatis sequences. This is the first confirmation of SFG Rickettsia in an A. oblongoguttatum tick. Furthermore, this is the first record of SFG Rickettsia in the municipalities targeted by this study. These results warn that SFG Rickettsia circulation poses a threat in Rondonia State (among Amazon-Savannah ecotones), and that this threat is heightened by the fact that SFG Rickettsia infect a species of human-biting tick hitherto unconfirmed as a vector.

Keywords	Brazilian Spotted Fever; Rickettsia amblyommatis; Amblyomma oblongoguttatum; Amazon-Savanna ecotone
Corresponding Author	Andre de Abreu Rangel Aguirre
Order of Authors	Andre de Abreu Rangel Aguirre, Marcos Garcia, Ivaneide Costa, Bárbara Csordas, Vinícius Rodrigues, Jansen Medeiros, Renato Andreotti
Suggested reviewers	Maria Ogrzewalska, MATIAS PABLO JUAN SZABO

Submission Files Included in this PDF

File Name [File Type]

Cover letter.docx [Cover Letter]

response-reviewers-TTBD-290617.docx [Response to Reviewers]

Editing Certification.pdf [Review Reports]

revised-manuscript-andre-TTBD-290617.docx [Manuscript File]

Figure1.tiff [Figure]

Figure2.tif [Figure]

Table1.docx [Table]

To view all the submission files, including those not included in the PDF, click on the manuscript title on your EVISE Homepage, then click 'Download zip file'.

COVER LETTER

Porto Velho – RO, Brazil, June 30th, 2017.

From the authors: André de Abreu Rangel Aguirre, Marcos Valério Garcia, Ivaneide Nunes da Costa, Bárbara Guimarães Csordas, Vinícius da Silva Rodrigues, Jansen Fernandes Medeiros and Renato Andreotti.

Dear Editor.

We are forwarding to Ticks and Tick-borne Diseases the research paper entitled **“New records of tick-associated spotted fever group Rickettsia in an Amazon-Savannah ecotone, Brazil”**. We hope to contribute to this journal, within the scope of ecology/eoepidemiology of tick-borne diseases, showing new records of tick-pathogen interactions, in South America. We ensure that the manuscript was written according to the journal guidelines and edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native.

If accepted for publication, we pledge to consider all questions of the reviewers and respond as soon as possible.

Without more and available for necessary adjustments to the manuscript.

Sincerely,

The authors.

Cover letter

Porto Velho, Rondônia (Brazil), 14th, January, 2018.

Dear Editor,

Please find enclosed the manuscript reviewed entitled “New records of tick-associated spotted fever group *Rickettsia* in an Amazon-Savannah ecotone, Brazil” by André de Abreu Rangel Aguirre, Marcos Valério Garcia, Ivaneide Nunes da Costa, Bárbara Guimarães Csordas, Vinícius da Silva Rodrigues, Jansen Fernandes Medeiros, Renato Andreotti, to be considered for publication.

This manuscript was written according to the journal rules and, all observations of the editors and the reviewer were included, the scientific information and with respect to translation again reviewed.

Below we present the detailed answers to the reviewers.

Sincerely,

The Authors

The author Contact: Fiocruz Rondônia, Rua da Beira, 7671, Bairro Lagoa, CEP 76812-245 – Porto Velho, RO, Brazil. phone: +55 (69) 9 9995 9583

Editorial points:

Associate Editor:

1- Dear authors,

As you can see the comments of the only Review so far received for your paper are positive, but mentioned several points to be addressed before resubmittance of this manuscript. I would also like to suggest that the manuscript must be carefully edited. Some sentences have various issues. For example, in line 177, one can read "A. oblongoguttatum carrying SFG Rickettsia ompA to be confirmed by 100%..." which I guess means that has been "already confirmed" and not "to be confirmed". There are several of such issues in the manuscript.

I am thus recommending a revision of this paper.

Answer) The questions asked by the editor were resolved, including the line 177 issue.

Managing Editor

The whole text needs careful language editing and copy-editing. There much too many typos in the text. The same is true for the 'References'. Please, strictly follow the TTBDi format in the 'References'. In the following some examples of mistakes in the text:

1- L24: 'ecological cycle of the causative rickettsiae' instead of 'epidemiological cycle of rickettsiosis'

Answer) Ok, corrected.

2- L29 (and elsewhere in the text): (sensu lato) (s.l.) (no italics)

After introducing the abbreviations 's.l.' or 's.s.', there is no need to put them in brackets.

Answer) Ok, corrected.

3- L32-33: PCR-positive

Answer) Ok, corrected.

4- L46: Rickettsiales (no italics)

Answer) Ok, corrected.

5- L47: cocobacilli

Answer) Ok, corrected.

6- L50: Raoult and Roux, 1997;

Answer) Ok, corrected.

7- L54: SFG Rickettsia spp. Have u

Answer) Ok, corrected.

8- L56: Labruna et al.,

Answer) Ok, corrected.

9- L59: The *Amblyomma* fauna is...[or:*Amblyomma* ticks are more...]

Answer) Ok, corrected. We chose "fauna".

10- L60: ...studies of the tick fauna

Answer) Ok, corrected.

11- L65: Brazilian spotted fever (BSF)

Answer) Ok, corrected in all the manuscript.

12- L83-85: How were ticks collected and determined?

Answer) We added the observation between brackets “(described below)” in line 84. The description of the tick collections are in lines 100-102.

13- L103-104 (and elsewhere in the text): (*sensu strictu*) (s.s) [no italics]

Answer) Ok, corrected.

14- L124: a 532-pb fragment

Answer) Ok, corrected.

15- L149, L150: (a) region ... (b) region [This needs to be phrased in a different way. Don't the region have names?]

Answer) Ok, corrected. We put “Amazon biome” for (a) region and “Amazon-Savannah ecotone” for (b) region between brackets, lines 150-151.

16- L155: spp. [no italics]

Answer) Ok, corrected.

17- L218 (and elsewhere in the text): GenBank

Answer) Ok, corrected.

18- L242: *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato

Answer) Ok, corrected.

Reviewer 1

In the manuscript “New records of tick-associated spotted fever group *Rickettsia* in an Amazon-Savannah ecotone, Brazil” Aguirre and colleagues describe ticks from environment and *Rickettsia* over quite an extensive area at the Amazon-Cerrado ecotone. The manuscript is well written and presented. I have only a few suggestions to improve it:

1- Line 134 – the phrase: “(other groups have also been discussed)” is somewhat loose within the text. Authors should either explain other *Rickettsia* groups in more details or take this phrase out.

Answer) We cut this phrase out.

2- Line 147 – Labruna and not Labuna

Answer) Ok, corrected.

3- Line 223- Citations of Del Fiol and Szabó are unnecessary in this context

Answer) Ok, removed.

4- Lines 263-265 – the sentence “each species exhibited clear differences on the genital aperture (Soares et al., 2015)” is unnecessary. Work by Nava et al., 2014 mentioned before support this observation.

Answer) Ok, we taked this sentence out.

5- Lines 394-400 – Include in results the observation that from nine DNA positive samples four were inadequate for sequencing due to low quality of DNA and that the remaining five samples shared sequence homology with ompA sequences on GenBank.

Answer) The following sentence was included in lines 163-164 (of the editable manuscript): “from the nine samples PCR-positive, four were inadequate for sequencing due to low quality of DNA, and..”

Line 431 – oblongoguttatum

Answer) Ok, corrected.

6- Line 622 – Care must be taken with the affirmation that “Dogs and humans are viable hosts for *A. oblongoguttatum*”. I would rather affirm that dogs and humans are frequently bitten by *A. oblongoguttatum*. Viable host indicates that parasitism is coupled with adequate blood-feeding of the tick and that is uncertain in the case of this tick species biting humans.

Answer) We edited lines 265-266 (editable manuscript), and included the citation of Martins et al. (2017), who demonstrated that dogs are viable hosts to *A. oblongoguttatum*, to explain better this issue according to the Reviewer’s comment:

“Dogs are viable hosts for *A. oblongoguttatum* and humans are frequently bitten by this tick species (Labruna et al., 2000; Guglielmone et al., 2006; Martins et al., 2017).”

Ashley Academic Publishing Service

Certification of English Editing

This certifies that the paper “Ticks and Tick-borne Diseases: New records of tick-associated spotted fever group *Rickettsia* in an Amazon-Savannah ecotone, Brazil” has been corrected for English. All English prose therein conforms to standard grammar, style and usage.

Ashley APS

1912 Avenue Van Horne

Montreal, QC. H3S 1N7

john.ashley@ashleyaps.com

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'John Ashley', is written over a light blue rectangular background.

John Ashley
Senior Editor

Ticks and Tick-borne Diseases

New records of tick-associated spotted fever group *Rickettsia* in an Amazon-Savannah ecotone, Brazil

André de Abreu Rangel Aguirre^{*1,5}; Marcos Valério Garcia³; Ivaneide Nunes da Costa^{2,4};
Bárbara Guimarães Csordas^{3,5}; Vinícius da Silva Rodrigues³; Jansen Fernandes Medeiros²;
Renato Andreotti³

¹Plataforma de Criação e Experimentação Animal, Fiocruz Rondônia, Oswaldo Cruz Foundation, nº 7671, Bairro Lagoa, Porto Velho, RO, Brazil, CEP 76812-245

²Laboratório de Entomologia Médica, Fiocruz Rondônia, Oswaldo Cruz Foundation, Rua da Beira, nº 7671, Bairro Lagoa, Porto Velho, RO, Brazil, CEP 76812-245

³Laboratórios de Biologia Molecular e do Carrapato, Brazilian Agricultural Research Corporation, Av. Rádio Maia, nº 830, Zona Rural, Campo Grande, MS, Brazil, CEP 79106-550

⁴Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Rodovia BR 364, Km 9,5, Porto Velho, RO, Brazil CEP 76801-059

⁵Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Av. Costa e Silva, Bairro Universitário, Campo Grande, MS, Brazil CEP 79070-900

***Corresponding author:** André de Abreu Rangel Aguirre, andre.a.r.aguirre@gmail.com / andreaguirrevet@hotmail.com

ABSTRACT

Human rickettsiosis has been recorded in the Amazon Biome. However, the epidemiological cycle of causative rickettsiosis-rickettsiae has not been fully accounted for in the Amazon region. This study investigates the presence of spotted fever group (SFG) *Rickettsia* spp. in free-living ticks of the *Amblyomma* genus. The study was conducted in seven municipalities in Rondonia State, Brazil, where the main biomes are Amazon forest, Brazilian Savannah and their ecotones (areas of ecological tension between open ombrophilous forest and savannah). The species of tick collected, included: *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ~~(s.l.)s.l.~~, *A. cajennense* (sensu strictu) ~~(s.s.)s.s.~~, *A. coelebs*, *A. naponense*, *A. oblongoguttatum*, *A. romitti*, *A. sculpturatum* and *A. sculptum*. A total of 167 adults, 248 nymphs and 1004 larvae were subjected to DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR) to determine the presence of SFG *Rickettsia* spp. PCR-PCR-positive samples included: one *A. cajennense* ~~(s.s.)s.s.~~ female and one *A. cajennense* ~~(s.l.)s.l.~~ male from a rural area in Vilhena Municipality; 10 nymphs and a sample of larvae of *A. cajennense* ~~(s.l.)s.l.~~ from a peri-urban area in Cacoal Municipality; and an *A. oblongoguttatum* adult male from a rural area of Pimenta Bueno Municipality. All sequences obtained exhibited 100% identity with *Rickettsia amblyommatis* sequences. This is the first confirmation of SFG *Rickettsia* in an *A. oblongoguttatum* tick. Furthermore, this is the first record of SFG *Rickettsia* in the municipalities targeted by this study. These results warn that SFG *Rickettsia* circulation poses a threat in Rondonia State (among Amazon-Savannah ecotones), and that this threat is heightened by the fact that SFG *Rickettsia* infect a species of human-biting tick hitherto unconfirmed as a vector.

Keywords: Brazilian Spotted Fever, *Rickettsia amblyommatis*, *Amblyomma oblongoguttatum*, Amazon-Savanna ecotone

INTRODUCTION

Rickettsia is a genus of bacteria of the order Rickettsiales, α -Proteobacteria subgroup. These bacteria are obligate intracellular Gram-negative ~~cocobacillus-cocobacilli~~ (Parola et al., 2005). This genus includes: typhus group (TG), comprised of *Rickettsia typhi* and *R. prowazekii*; and spotted fever group (SFG), which includes several species, *R. rickettsii* being the most lethal ~~(other groups have also been discussed)~~ (Raoult and Roux, 1997; Gillespie et al., 2007; Weinert et al., 2009; Tarragona et al., 2015).

In Brazil, SFG *Rickettsia* spp. infection is transmitted to humans by ticks. The primary transmission vectors are: *Amblyomma sculptum*, in the Brazilian Savannah biome; and *A. aureolatum*, in the Atlantic rainforest biome (Labruna, 2009). SFG *Rickettsia* spp. ~~has~~have been detected in several species of the *Amblyomma* genus; some of these species parasitize dogs and humans, and some have already been recorded in Rondonia State (Labruna et al., 2004a, 2004b, 2005a, 2005b, 2007; Barbieri et al., 2008; Szabó et al., 2013 Martins et al., 2014; Oliveira et al., 2016a, 2016b).

Tick fauna of the *Amblyomma* ~~genus-fauna~~ is more diversified in the western Amazon than in other regions of Brazil (Martins et al., 2014). Although many studies of the tick fauna and SFG *Rickettsia* have been conducted in this region, little is known about the dynamic dispersion of these pathogens and their relation to human illness is poorly understood (Labruna et al., 2004a, 2004b, 2005a, 2005b, 2007; Martins et al., 2014; Oliveira et al., 2016a, 2016b).

Ticks and dogs carrying SFG *Rickettsia* have been recorded in Rondonia State; this suggests that human infection may be occurring unreported. Brazilian spotted fever (BSF) presents symptoms that are similar to highly prevalent regional illnesses, such as dengue, malaria and leptospirosis, and BSF may therefore be subject to misdiagnosis (~~Labruna~~Labruna et al., 2004a, 2004b, 2005a, 2005b, 2007). The first confirmed case of BSF in Rondonia State

was reported in 2016, by Oliveira et al (2016a). All of these concerns highlight the need for further studies.

This study addresses the potential for the dissemination of tick-borne diseases in Rondonia State, as evidenced by the first confirmed case of BSF (Oliveira et al., 2016a), and by several reports of SFG *Rickettsia* circulation in animals and ixodid vectors (Labruna et al., 2004a, 2004b, 2005a, 2007). The aim of this study was to assess the presence of SFG *Rickettsia* in ixodid ticks via molecular analysis; samples were collected along animal trails where the likelihood of contact between humans and *Amblyomma* ticks was high, and collections were performed in two distinct biomes.

MATERIAL AND METHODS

Study site

Tick collections (described below) were performed between April 2015 and December 2016. ~~Ticks were collected~~ along ~~animals~~animals' trails in forest fragments that provided favorable conditions for the transmission of BSF. Conditions were considered favorable if target locations were close to human shelters (peridomiles and rural areas), near water sources (stream, brooks, ponds), and likely to be frequented by domestic animals (dogs and horses) and by wild animals (capybaras, tapirs, armadillos and small rodents) ~~(Del-Fiol et al., 2010; Szabó et al., 2013)~~. Collections were performed in two distinct biomes split between seven municipalities in Rondonia State, Brazil: (a) Amazon rainforest - including the municipalities of Porto Velho (08° 45' 43" S, 63° 54' 14" W), Candeias do Jamari (08° 48' 35" S, 63° 41' 44" W), Itapuã do Oeste (9° 11' 51" S, 63° 9' 56" W) and Ariquemes (9° 54' 50" S, 63° 2' 38" W); and (b) Amazon-Savannah ecotone - areas bordering BR-364 road, including the municipalities of Cacoal (11°

25' 53" S, 61° 26' 52" W), Pimenta Bueno (11° 40' 29" S, 61° 11' 28" W) and Vilhena (12° 44' 3" S, 60° 8' 41" W) (IBGE, 2012) (Figure 1).

Tick collections and identification

Tick collections were performed using the following methods: CO₂ (dry ice) traps; drag flagging; and visual inspection of vegetation up to one meter beyond the edge of animal trails (Oliveira et al., 2000; Castro and Clover, 2010). Collected ticks were taken to the laboratory alive. Adults and nymphs were identified taxonomically under a stereoscopic microscope (Barros-Battesti et al., 2006; Martins et al., 2010). Identification was verified for *A. cajennense* (sensu stricto) (s.s.) and *A. sculptum* females (both from the *A. cajennense* complex) according to Nava et al. (2014); each species exhibited clear differences on the genital aperture (Soares et al., 2015). Males and nymphs from the *A. cajennense* complex were identified as *A. cajennense* (sensu lato) (s.l.). The genus of larvae collected in bunches was identified taxonomically (Barros-Battesti et al., 2006), and a portion of the larvae was allocated to feed on rabbits (Bechara et al., 1995) with the aim of molting nymphs for species identification (Martins et al., 2010). Following identification, ticks were preserved in absolute ethanol at -18°C until DNA extraction and polymerase chain reaction (PCR). All procedures with animals were carried out according to ARRIVE guidelines and in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, and the Ethics Commission on the Use of Animals/CEUA of Fiocruz Rondônia, under protocol number 2015/18, approved this study.

DNA extraction, PCR and sequencing analysis

DNA was extracted from all samples and molecular analysis was performed using PCR. The presence of SFG *Rickettsia* was tested via amplification of the *ompA* gene fragment. Extractions were performed individually for adults, in pools of up to 10 specimens for nymphs, and in pools of bunches for larvae, following the guanidine isothiocyanate-phenol technique, as previously described by Sangioni et al., 2005. The obtained DNA was amplified using the primers Rr190.70p and Rr190.602n to amplify a ~~532-532~~-pb fragment of the *ompA* gene, present in only SFG *Rickettsia* (Regnery et al., 1991).

DNA from positive samples were purified using Purelink™ PCR Purification Kit (Invitrogen, CA, USA). Further sequencing was performed with the Sequencing and Genotyping DNA Platform in René Rachou Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Brazil. The Sanger method (Sanger et al., 1977) was used in an ABI 3730 (Life Technologies) sequencer, and samples were sequenced in duplicate. Sequences were then aligned with ClustalW algorithm using the MEGA 7.0 program (Kumar et al., 2016). Sequences were deposited on GenBank, with major identity criteria determined by the BLASTn search tool.

The evolutionary history was inferred by using the Maximum Likelihood method based on the Tamura 3-parameter model (Tamura, 1992) for phylogenetic tree analysis. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically by applying Neighbor-Join and BioNJ algorithms to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood (MCL) approach, and then selecting the topology with superior log likelihood value. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites (5 categories (+G, parameter = 0,6801)). The tree was drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. The proportion of sites where at least one unambiguous base is present in at least one sequence for each descendant clade is shown next to each internal node in the tree. The analysis involved 38 nucleotide sequences. Codon positions included were 1° + 2° + 3° + Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7 program (Kumar et al., 2016).

RESULTS

A total of 1420 *Amblyomma* specimens were collected in this study. Of these, 178 were obtained from (a) region (Amazon biome) (4 larvae, 132 nymphs and 42 adults), and 1242 were obtained from (b) region (Amazon-Savannah ecotone) (1000 larvae, 117 nymphs and 125 adults). Table 1 shows the total number of ticks, instars and species, and the results of SFG *Rickettsia* detection with respect to the relevant biomes and municipalities. Nine species were identified: *A. cajennense* ~~(s.l.)~~s.l. (1173, including a bunch of 1000 larvae), *A. oblongoguttatum* (98), *A. naponense* (59), *A. cajennense* ~~(s.s.)~~s.s. (43), *A. coelebs* (13), *A. sculpturatum* (13), *A. sculptum* (7), *A. ovale* (5), *A. romittii* (4), *A. calcaratum* (1), and *Amblyomma* spp. larvae (4). Additionally, four *A. oblongoguttatum* and four *A. ovale* adults (two males and two females each) were collected from a domestic dog in a rural area in Candeias do Jamari Municipality (data not shown).

Nine samples were PCR positive, all from free-living ticks: two *A. oblongoguttatum* females from Candeias do Jamari Municipality; one *A. oblongoguttatum* male from Pimenta Bueno Municipality; one *A. cajennense* ~~(s.l.)~~s.l. male and one *A. cajennense* ~~(s.s.)~~s.s. female from Vilhena Municipality; three nymph pools containing 10 specimens each, and a bunch of 1000 larvae of *A. cajennense* ~~(s.l.)~~s.l. from Cacoal Municipality. Nevertheless, from the nine samples PCR-positive, four were inadequate for sequencing due to low quality of DNA, and only five samples shared sequence homology with *ompA* sequences on GenBank. All five of these samples exhibited 100% identity with a *Rickettsia amblyommatis* sequence, An 13 isolate (GenBank: CP015012), as determined by BLASTn program analysis. Furthermore, all five samples exhibited 100% identity with more than 10 sequences from several "*Candidatus* *Rickettsia amblyommii*" records, and 99% identity with the "ARANHA" strain (GenBank AY360213), which has been recorded near the regions targeted by this study. The identity of *R.*

amblyommatis was determined by phylogenetic analysis of *ompA* sequences (access numbers GenBank MF188911, MF188912, MF188913, MF188914) (Figure 2).

DISCUSSION

This is the first study to report the presence of SFG *Rickettsia* in a specimen of *A. oblongoguttatum* in South America. The specimen was collected in an Amazon-Savannah ecotone (IBGE, 2012), in Pimenta Bueno Municipality, Rondonia, Brazil. This is the first record of *A. oblongoguttatum* carrying SFG *Rickettsia ompA* ~~to be~~already confirmed by 100% sequence identity. An earlier detection of SFG *Rickettsia* in *A. oblongoguttatum* was reported in Panama (Central America), but the authors of that study emphasized that the speciation analysis could not be completed due to a low number of DNA copies (Bermúdez et al., 2009). In addition, two specimens of *A. oblongoguttatum* from Candeias do Jamari Municipality tested positive for SFG *Rickettsia*; however, the species could not be confirmed by sequencing due most likely to low DNA integrity.

One larvae and one nymph DNA sample of *A. cajennense* ~~(s.l.)~~s.l. from Cacoal Municipality, and an *A. cajennense* ~~(s.l.)~~s.l. male and an *A. cajennense* ~~(s.s.)~~s.s. female from Vilhena Municipality exhibited 100% sequence identity with *R. amblyommatis ompA* (along with other “*Candidatus R. amblyommii*” strains). Thus, this study is also the first confirmed record of *R. amblyommatis* in *A. cajennense* ~~(s.s.)~~s.s., in Rondonia State (an adult female from Vilhena Municipality).

It is worth mentioning that *A. cajennense* ~~(s.s.)~~s.s. belongs to a namesake complex which encompasses six species (including *A. sculptum*) (Nava et al., 2014), and that the last SFG *Rickettsia* report of this complex in Rondonia was made a decade before the complex was first described (Labruna et al., 2004b). Since there have also been reports in Rondonia State of *A.*

sculptum (in Pimenta Bueno Municipality), records made prior to the complex description tend to be treated as *A. cajennense* ~~(s.l.)~~s.l..

In this study, *A. cajennense* ~~(s.s.)~~s.s. was identified in the municipalities of Cacoal, Pimenta Bueno, and Vilhena, which accords with previous reports (Martins et al., 2016). This indicates that the enzootic cycle and circulation of *R. amblyommatis* is complex, and may involve several tick vectors and potentially utilize several animal species as natural reservoirs. Aside from the records cited, the presence of *R. amblyommatis* is unprecedented in the municipalities of Rondonia that were the focus of this study.

Recently, "*Candidatus R. amblyommii*" was formally named *R. amblyommatis* sp. nov., according to the International Code of Nomenclature of Prokaryotes (Karpthy et al., 2016). The tick species most commonly infected by this pathogen is *A. americanum*, which has a rate of infection above 40% in North America (Burgdorfer et al., 1981; Karpthy et al., 2016). However, this pathogen has also been found in several Central and South American countries, where it infects many other *Amblyomma* species (Sánchez-Montes et al., 2016). In Brazil, this bacteria has already been detected in *A. auricularium*, *A. cajennense* ~~(s.s.)~~, *A. coelebs*, *A. geayi*, *A. humerale*, *A. longirostre*, *A. parkeri* and *A. sculptum*, and has been recorded in the states of Bahia, Mato Grosso, Pará, Paraná, Pernambuco, Rondônia and São Paulo (Labruna et al., 2004a, 2004b; Ogrzewalska et al., 2008, 2010, 2011; Pacheco et al., 2012; Saraiva et al., 2013; Alves et al., 2014; Lopes et al., 2014; Soares et al., 2015).

BLAST analysis of all positive samples exhibited 100% identity with: the An13 isolate of *R. amblyommatis*; "*Candidatus R. amblyommii*" isolates 11-TC-1-1, GP4A, AcCR and TX116, and other rickettsiae isolates from North and Central America, including isolates that have been related to human pathogens by Billeter et al. (2007), ([Genbank](#)[GenBank](#): EF063690); and with the AcaIII isolate of "*Candidatus R. amblyommii*" from the municipalities of Governador Jorge Teixeira and Monte Negro, Rondonia, an isolate that was not deposited on GenBank because it exhibited 100% identity with ArR/SoCarolina ([Genbank](#)[GenBank](#): AF453408), according to

Labruna et al. (2004b). The sequences reported here exhibited 99% identity with sequences from other studies conducted in Brazil, including: Ariquemes (RO), "ARANHA" strain (GenbankGenBank: AY360213), Confresa (MT), Confresa2 clone (GenbankGenBank: KM042860), Ibimirim (PE), AaPE strain (GenbankGenBank: JX867426) and Santarém (PA), Santarem clone (GenbankGenBank: KM042861) (Labruna et al., 2004a; Saraiva et al., 2013; Soares et al., 2015).

Since the discovery of *R. amblyommatis*, its pathogenesis in humans has remained unclear. Laboratory assays with experimentally infected animals did not elicit evident clinical signs. In the same study, the authors evaluated humans in a region with high rates of tick-borne infection and constant exposure to *A. americanum* parasitism, yet no relevant clinical signs were detected (Burgdorfer et al., 1981). Nevertheless, recent reports suggest that some correlation exists between mild illness and rickettsiosis in people that test seropositive for *R. amblyommatis* and have had previous contact with *A. americanum* (Apperson et al., 2008; Delisle et al., 2016).

In Rondonia State, *Rickettsia* genera were described for the first time in Ariquemes Municipality, where *A. longirostre* was infected by the "ARANHA" strain (AY360213) (Labruna et al., 2004a). Shortly thereafter, a strain 100% identical to ArR/SoCarolina (AF453408) was detected infecting 26.8% of *A. cajennense* ~~(s.l.)~~s.l. (collected from Governador Jorge Teixeira Municipality) and 14.3% of *A. coelebs* (collected from Monte Negro Municipality) (Labruna et al., 2004b). In Monte Negro, 11.6% of dogs from rural areas and 3.9% of dogs from urban areas tested seropositive for at least one of three *Rickettsia* species: *R. parkeri*, *R. amblyommatis* and *R. rhipicephali* (Labruna et al., 2007). After these studies were conducted, *Rickettsia* was not reported in Rondonia State until the first confirmed case of BSF in Ariquemes Municipality (Oliveira et al., 2016a, 2016b). These authors had already confirmed *Rickettsia* spp. in *Dermacentor nitens*, *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* and *R. microplus*, in Rondonia State. However, these authors did not identify the species of *Rickettsia* in the human case of BSF, nor

did they identify the species of *Rickettsia* infecting the three types of tick. It is worth noting that up to now there has been no record of *A. cajennense* complex in Ariquemes Municipality, which suggests that other tick species are involved in the transmission cycle.

While performing collections, the authors of this study found *A. oblongoguttatum* and *A. ovale* parasitizing a dog in Candeias do Jamari Municipality. According to the literature, dogs may be accidental hosts for these ticks even though adult ticks normally parasitize wild camivores (Labruna, et al., 2000). Furthermore, dogs play an important role in the zoonotic cycle of rickettsiosis: dogs can serve as an amplifier host to several SFG *Rickettsia* spp. by transmitting ticks between wild animals and also by transmitting ticks from wild animals to humans (Labruna et al., 2007; Melo et al., 2011).

A. oblongoguttatum has been reported parasitizing humans in Brazil, mainly in Amazon forest areas (including in Rondonia State), and there have been additional reports in the South Region of Brazil, as well as in neighboring countries (Labruna et al., 2000, 2005b; Arzua et al., 2005; Guglielmone et al., 2006). *A. oblongoguttatum* is very common in the region studied. Now that we have confirmed *A. oblongoguttatum* as a potential vector of SFG *Rickettsia*, local public health authorities should be alerted and systems for the control and surveillance of zoonotic diseases should include this tick as a species of concern.

Dogs ~~and humans~~ are viable hosts for *A. oblongoguttatum* and humans are frequently bitten by this tick species (Labruna et al., 2000; Guglielmone et al., 2006; Martins et al., 2017), and SFG *Rickettsia* infection has been reported in both dogs and humans in the region studied. Given these facts, we would like to reiterate the strong possibility that the *A. oblongoguttatum* is involved in the zoonotic transmission cycle of BSF, and that this vector may pose a threat especially in areas where the *A. cajennense* complex has not been reported. Knowledge of this possible threat and the new records of SFG *Rickettsia* in Rondonia add information of great value to our limited understanding of the circulation dynamics of rickettsiosis in animals, ixodid vectors and humans, especially with respect to the Amazon region.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank CAPES, CNPq, FAPERO and Fundect for financial support, and we wish to thank the sequencing service of Sequencing and Genotyping DNA Platform in René Rachou Research Center, Oswaldo Cruz Foundation, Belo Horizonte, Brazil.

REFERENCES

- Alves, A.S., Melo, A.L.T., Amorim, M.V., Borges, A.M.C.M., Silva, L.G., Marins, T.F., Labruna, M.B., Aguiar, D.M., Pacheco, R.C., 2014. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in Equids and Molecular Detection of *Candidatus Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma cajennense* Senu Lato Ticks from the Pantanal Region of Mato Grosso, Brazil. *J. Med.* 1242–1247. <https://doi.org/10.1603/ME14042>
- Apperson, C.S., Engber, B., Nicholson, W.L., Mead, D.G., Engel, J., Yabsley, M.J., Dail, K., Johnson, J., Watson, D.W., 2008. Tick-Borne Diseases in North Carolina: Is "*Rickettsia amblyommii*" a Possible Cause of Rickettsiosis Reported as Rocky Mountain Spotted Fever? *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 8, 597–606. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0271>
- Arzua, M., Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., 2005. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de Historia Natural Capao da Imbuia, Curitiba, Parana, Brazil. *Rev. Bras. Zool.* 22, 623–632. <https://doi.org/10.1590/S0101-81752005000300015>
- Barbieri, F.S., Brito, L.G., Labruna, M.B., Barros-Battesti, D.M., Camargo, L.M.A., Farnadas, K.M., 2008. Description of the larva of *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) by light and scanning electron microscopy. *Syst. Appl. Acarol.* 13, 109. <https://doi.org/10.11158/saa.13.2.3>
- Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H., 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies.
- Bechara, G.H., Szabó, M.P.J., Ferreira, B.R., Garcia, M.V., 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects. *Braz. Jour. Parasitol. Vet.* 4(2), 61–66.
- Bermúdez, S.E., Ereemeeva, M.E., Karpathy, S.E., Samudio, F., Zambrano, M.L., Zaldivar, Y., Motta, J.A., Dasch, G.A., 2009. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in Eastern Panama. *J. Med. Entomol.* 46, 856–861. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0417>

- Billeter, S.A., Blanton, H.L., Little, S.E., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2007. Detection of "*Rickettsia amblyommii*" in Association with a Tick Bite Rash. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7(4), 607-610.
- Burgdorfer, W., Hayes, S.F., Thomas, L., 1981. A new spotted fever group rickettsia from the lone star tick. In: R.W. Anacker (ed) *Rickettsiae and Rickettsial Diseases*. Academic Press, New York, 213-267.
- Castro, M.B., Clover, J.R., 2010. A comparison of visual and flagging methods for estimating adult *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae) tick abundance. *J. Vector Ecol.* 35, 435-438. <https://doi.org/10.1111/j.1948-7134.2010.00104.x>
- Delisle, J., Mendell, N.L., Stull-Lane, A., Bloch, K.C., Bouyer, D.H., Moncayo, A.C., 2016. Human Infections by Multiple Spotted Fever Group Rickettsiae in Tennessee. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 94, 1212-1217. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0372>
- Gillespie, J.J., Beier, M.S., Rahman, M.S., Ammerman, N.C., Shallom, J.M., Purkayastha, A., Sobral, B.S., Azad, A.F., 2007. Plasmids and Rickettsial evolution: Insight from *Rickettsia felis*. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000266>
- Guglielmone, A.A., Beati, L., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Nava, S., Venzal, J.M., Mangold, A.J., Szabó, M.P.J., Martins, J.R., González-Acuña, D., Estrada-Peña, A., 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp. Appl. Acarol.* 40, 83-100. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2012. *Manual Técnico da Vegetação Brasileira*, Rio de Janeiro.
- Karpathy, S.E., Slater, K.S., Goldsmith, C.S., Nicholson, W.L., Paddock, C.D., 2016. *Rickettsia amblyommatis* sp. Nov., a spotted fever group Rickettsia associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in north, Central and South America. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66, 5236-5243. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001502>
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870-1874. <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of rickettsia in South America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1166, 156-166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>
- Labruna, M.B., Horta, M.C., Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., Pinter, A., Gennari, S.M., Camargo, L.M.A., 2007. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7, 249-255. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0621>
- Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Camargo, E.P., Walker, D.H., 2005a. Detection of a spotted fever group Rickettsia in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. *Vet. Parasitol.* 127, 169-174. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2004.09.024>
- Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Terrassini, F.A., Ferreira, F., Schumaker, T.T.S., Camargo, E.P., 2005b. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Syst. Appl. Acarol.* 10, 17-32.

- Labruna, M.B., McBride, J.W., Bouyer, D.H., Camargo, L.M. a, Camargo, E.P., Walker, D.H., 2004a. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. J. Med. Entomol. 41, 533–537. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.3.533>
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Bouyer, D.H., McBride, J., Camargo, L.M. a, Camargo, E.P., Popov, V., Walker, D.H., 2004b. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. J. Med. Entomol. 41, 1073–1081. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.6.1073>
- Labruna, M.B., Homem, V.S.F., Heinemann, M.B., Neto, J.S.F., 2000. Ticks (Acari : Ixodidae) Associated with Rural Dogs in Uruará , Eastern Amazon , Brazil Ticks (Acari : Ixodidae) Associated with Rural Dogs in Uruara Eastern Amazon , Brazil. J. Med. Entomol. 37, 774–776. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.5.774>
- Lopes, L.B., Guterres, A., Rozental, T., Carvalho de Oliveira, R., Mares-Guia, M., Fernandes, J., Figueredo, J., Anschau, I., de Jesus, S., V Almeida, A.B.M., Cristina da Silva, V., Gomes de Melo Via, A., Bonvicino, C., D'Andrea, P., Barreira, J., Sampaio de Lemos, E., 2014. *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. Parasit. Vectors 7, 191. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-191>
- Martins, T.F., Luz, H.R., Faccini, J.L.H., Labruna, M.B., 2017. Life-cycle of *Amblyomma oblongoguttatum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. Exp. Appl. Acarol. 71, 415–424. <https://doi.org/10.1007/s10493-017-0135-9>
- Martins, T.F., Barbieri, A.R.M., Costa, F.B., Terassini, F.A., Camargo, L.M.A., Peterka, C.R.L., de C. Pacheco, R., Dias, R.A., Nunes, P.H., Marcili, A., Scofield, A., Campos, A.K., Horta, M.C., Guilloux, A.G.A., Benatti, H.R., Ramirez, D.G., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). Parasit. Vectors 9, 186. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>
- Martins, T.F., Venzal, J.M., Terassini, F.A., Costa, F.B., Marcili, A., Camargo, L.M.A., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2014. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. Exp. Appl. Acarol. 62, 121–128.
- Martins, T.F., Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2010. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions, redescrptions, and identification key. Ticks Tick. Borne. Dis. 1, 75–99. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.03.002>
- Melo, A.L.T., Martins, T.F., Horta, M.C., Moraes-Filho, J., Pacheco, R.C., Labruna, M.B., Aguiar, D.M., 2011. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. Ticks Tick. Borne. Dis. 2, 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.09.007>
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B., Cáceres, A.G., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A., 2014. 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, 1. Ticks Tick. Borne. Dis. 5, 252–276.
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>
- Ogrzewalska, M., Uezu, A., Labruna, M.B., 2011. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. Parasitol. Res. 108, 665–670. <https://doi.org/10.1007/s00436-010-2111-8>
- Ogrzewalska, M., Uezu, A., Labruna, M.B., 2010. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. Parasitol. Res. 106, 809–816.
- Ogrzewalska, M., Pacheco, R.C., Uezu, A., Ferreira, F., Labruna, M.B., 2008. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in an Atlantic forest area in the state of São Paulo, Brazil, with isolation of rickettsia from the tick *Amblyomma longirostre*. J. Med. Entomol. 45, 770–774. [https://doi.org/10.1603/0022-2585\(2008\)45\[770:Taiwb\]2.0.Co;2](https://doi.org/10.1603/0022-2585(2008)45[770:Taiwb]2.0.Co;2)
- Oliveira, P.R., Borges, L.M.F., Lopes, C.M.L., Leite, R.C., 2000. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. Vet. Parasitol. 92, 295–301. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(00\)00322-8](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(00)00322-8)
- Oliveira, S.V. de, Pereira, S.V.C., Silva, Amorim, M., Serra-Freire, N.M., , Eduardo Pacheco de Caldas, G.G.S., Caldas, 2016a. Vigilância de ambientes da febre maculosa : explorando as áreas silenciosas do Brasil. Rev Pan-Amaz Saude 2016; 55, 65–72. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232016000300008>
- Oliveira, S.V., Guimarães, J.N., Reckziegel, G.C., Neves, B.M. da C., Araújo-Vilges, K.M. de, Fonseca, L.X., Pinna, F.V., Pereira, S.V.C., de Caldas, E.P., Gazeta, G.S., Gurgel-Gonçalves, R., 2016b. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis. 22, 22. <https://doi.org/10.1186/s40409-016-0077-4>
- Pacheco, R.C., Arzua, M., Nieri-Bastos, F.A., Moraes-Filho, J., Marcili, A., Richtzenhain, L.J., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2012. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) collected on birds in southern Brazil. J. Med. Entomol. 49, 710–6. <https://doi.org/10.1603/ME11217>
- Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. Clin. Microbiol. Rev. 18, 719–756. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.719-756.2005>
- Raoult, D., Roux, V., 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clin. Microbiol. Rev. 10, 694–719.
- Regnery, R.L., Spruill, C.L., Plikaytis, B.D., 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. J. Bacteriol. 173, 1576–1589. <https://doi.org/10.1128/JB.173.8.1576-1589.1991>
- Sánchez-Montes, S., Ríos-Muñoz, C.A., Espinosa-Martínez, D. V., Guzmán-Cornejo, C., Berzunza-Cruz, M., Becker, I., 2016. First report of “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” in

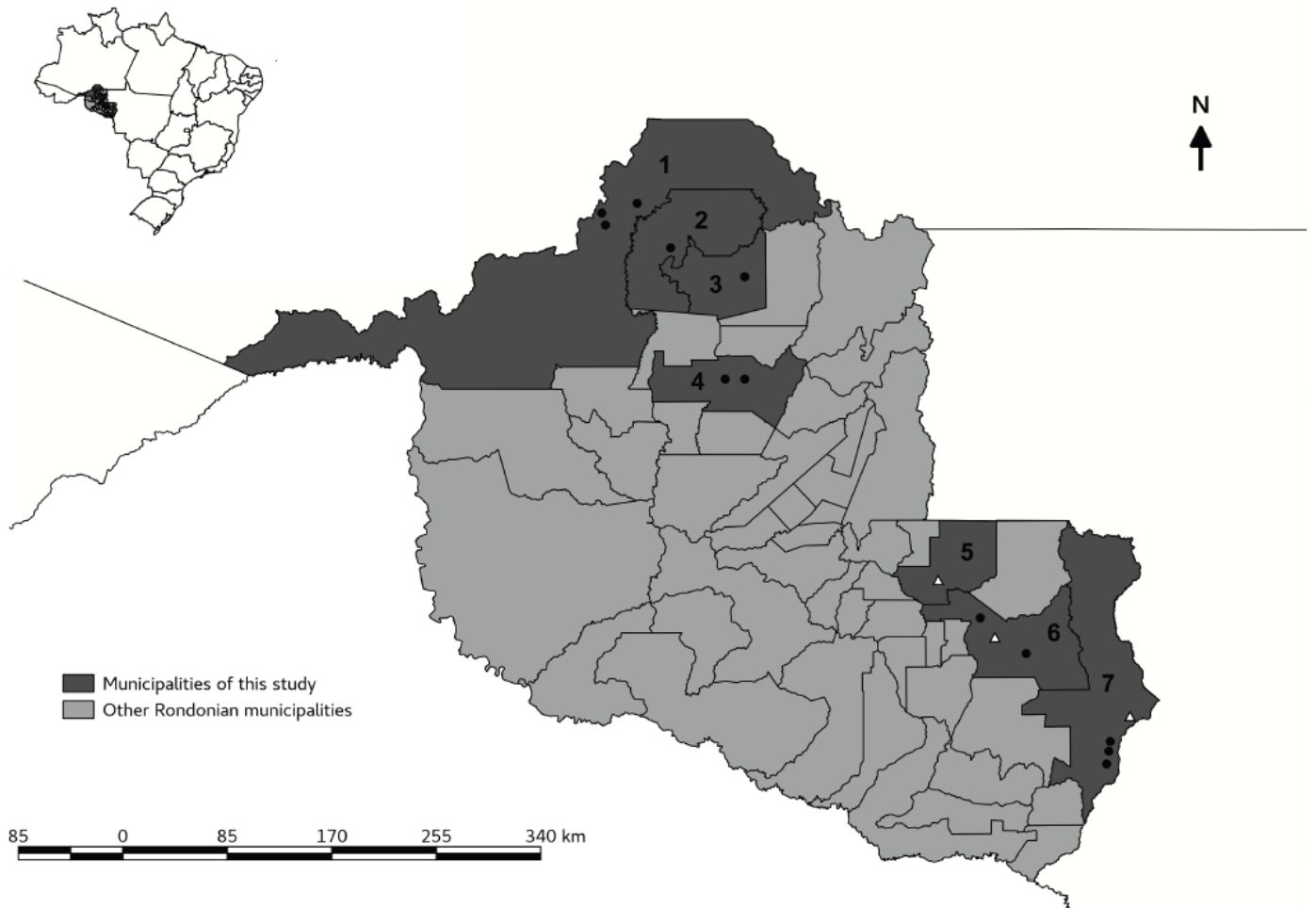
887 425 west coast of Mexico. Ticks Tick. Borne. Dis. 7, 1139–1145.
888 426 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.08.007>
889
890 427 Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R., 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
891 428 Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 5463–5467. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>
892
893 429 Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A.M.,
894 430 Schumaker, T.T.S., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M.B., 2005. Rickettsial Infection in
895 431 Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. Emerg. Infect. Dis. 11(2), 265–270.
896
897 432 Saraiva, D.G., Nieri-Bastos, F.A., Horta, M.C., Soares, H.S., Nicola, P.A., Pereira, L.C.M.,
898 433 Labruna, M.B., 2013. *Rickettsia amblyommii* Infecting *Amblyomma auricularium* Ticks in
899 434 Pernambuco, Northeastern Brazil: Isolation, Transovarial Transmission, and Transstadial
900 435 Perpetuation. Vector-Borne Zoonotic Dis. 13, 615–618.
901 436 <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1223>
902
903 437 Soares, H.S., Barbieri, A.R.M., Martins, T.F., Minervino, A.H.H., de Lima, J.T.R., Marcili, A.,
904 438 Gennari, S.M., Labruna, M.B., 2015. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two
905 439 regions of the Brazilian Amazon. Exp. Appl. Acarol. 65, 125–140.
906 440 <https://doi.org/10.1007/s10493-014-9851-6>
907
908 441 Szabó, M.P.J., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-
909 442 fever tick vectors in Brazil. Front. Cell. Infect. Microbiol. 3, 1–9.
910 443 <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>
911
912 444 Tamura, K., 1992. Estimation of the number of nucleotide substitutions when there are strong
913 445 transition-transversion and G+C-content biases. Mol. Biol. Evol. 9, 678–87.
914 446 <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040752>
915
916 447 Tarragona, E.L., Cicuttin, G.L., Mangold, A.J., Mastropaolo, M., Nazarena De Salvo, M., Nava,
917 448 S., 2015. Rickettsia infection in Amblyomma tonelliae, a tick species from the Amblyomma
918 449 cajennense complex. Ticks Tick. Borne. Dis. 6, 173–177.
919 450 <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.11.010>
920
921 451 Weinert, L.A., Werren, J.H., Aebi, A., Stone, G.N., Jiggins, F.M., 2009. Evolution and diversity of
922 452 Rickettsia bacteria. BMC Biol. 7, 6. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6>
923
924 453
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941

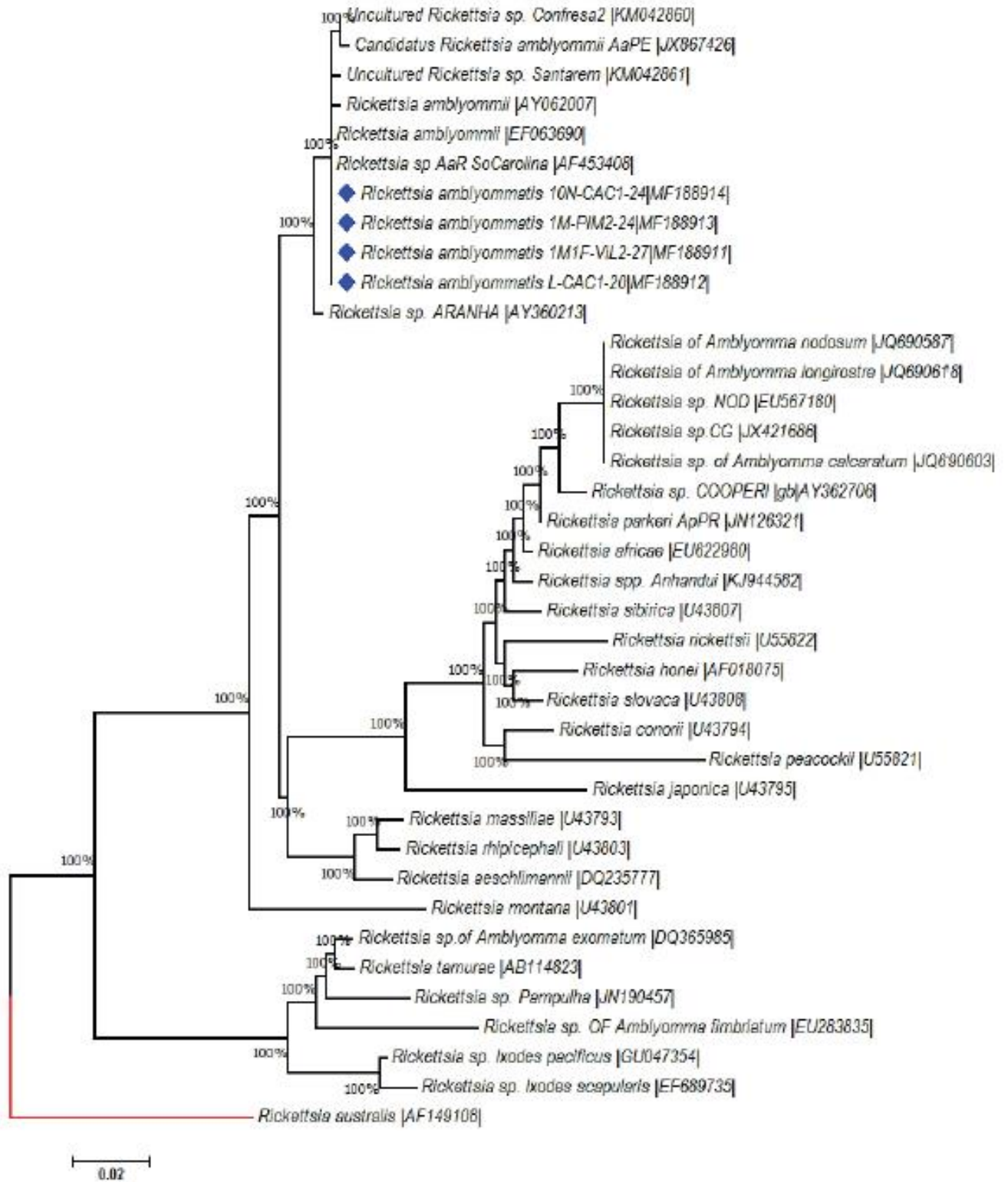
CAPTIONS

Figure 1: Map representing Rondonia State, Brazil. Numbered areas in dark gray represent the municipalities in this study: Amazon biome (a) - (1) Porto Velho, (2) Candeias do Jamari, (3) Itapuã do Oeste, (4) Ariquemes; Amazon-Savannah ecotone region (b) - (5) Cacoal, (6) Pimenta Bueno, (7) Vilhena. Areas in light gray represent other Rondonian municipalities. Small black circles represent tick collection sites where samples were negative, and white triangles represent sites where samples were positive and confirmed for *Rickettsia amblyommatis*.

Figure 2: Phylogenetic tree of *Rickettsia amblyommatis*. The evolutionary history was inferred by the Maximum likelihood method for the *ompA* gene. Sample sequences obtained in this study are indicated by blue rhombuses with species name followed by identification code for the sample from which the DNA was isolated (Table 1).

Table 1: Total number of ticks collected and PCR analysis for spotted fever group *Rickettsia* spp. identification, categorized by biome and municipality, in Rondonia State, Brazil, 2015-2016.





					Ticks					
					Collected (n)					
	Biomes	Municipalities	Geographic coordinates	Species	Larvae	Nymphs	Adults	Infected (n)	Rickettsia species	
4	(a) Amazon	Ariquemes	9° 54' 50" S, 63° 2' 38" W	Amblyomma naponense		52		0		
5				Amblyomma oblongoguttatum		57	4	0		
6				Amblyomma ovale		1		0		
7				Amblyomma sculpturatum			1	0		
8				Amblyomma coelebs		1	2	0		
9				A. naponense			6	0		
10				A. oblongoguttatum		5	12	0		
11				A. ovale			4	0		
12				A. sculpturatum		1	2	0		
13				A. coelebs			6	1	0	
14				Amblyomma spp.		4			0	
15				A. oblongoguttatum				1	0	
16				A. oblongoguttatum			5	8	0	
17				A. sculpturatum			4	1	0	
18				Total			4	132	42	0
19	(b) Amazon-Savannah ecotone	Cacoal	11° 25' 53" S, 61° 26' 52" W	Amblyomma cajennense (s.l.)	1000	105	28	1 larvae pool and 1 nymph pool	Rickettsia amblyommatis	
20				Amblyomma cajennense (s.s.)			18	0		
21				Amblyomma romitti		4		0		
22				A. cajennense (s.l.)			20	0		
23				A. cajennense (s.s.)			13	0		
24				Amblyomma calcaratum		1		0		
25				A. coelebs		2		0		
26				A. naponense			1	0		
27				A. oblongoguttatum		2	4	1		
28				A. sculpturatum		2	1	0		
29				Amblyomma sculptum			7	0		
30				A. cajennense (s.l.)			20	1		
31				A. cajennense (s.s.)			12	1		
32				A. coelebs			1	0		
33				A. sculpturatum			1		0	
34	Total			1000	117	125	5			
35	TOTAL			1004	249	167	5			

4.4 Artigo 4 - A ser submetido à Veterinary Parasitology (Qualis: B1)

AVALIAÇÃO DE POTENCIAL IMUNOGÊNICO DE PEPTÍDEO SINTÉTICO ORIUNDO DE SERPINAS EXPRESSAS PELA GLÂNDULA SALIVAR DE *Amblyomma cajennense* s.l. EM CAMUNDONGOS BALB/C

André de A. R. Aguirre^{a,b,+}; Fernando B. Zanchi^b; Alexandre da Silva Souza^c; Marcos Valério Garcia^c; Bárbara Guimarães Csordas^{a,c}; Ivaneide N. Costa^b; Jansen F. Medeiros^b; Renato Andreotti^c

^aUniversidade Federal de Mato Grosso do Sul, Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, Av. Costa e Silva, Bairro Universitário, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, CEP 79070-900

^bFundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Rondônia, Rua da Beira, 7671, Bairro Lagoa, Porto Velho, Rondônia, CEP 76812-110

^cEmpresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Gado de Corte, Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato, Av. Rádio Maia, 830, Zona Rural, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, CEP 79106-550

+ Autor correspondente: . Endereço: Rua Piaba, 6070, casa 09, Bairro Lagoa, 76.812-110, Porto Velho, Rondônia, Brasil.

RESUMO

O controle dos carrapatos vetores de riquetsioses no Brasil, o *Amblyomma aureolatum* e o complexo *A. cajennense* sensu lato (s.l.) nos hospedeiros domésticos, por aplicação de acaricidas tem se mostrado um método usual. Como forma de propor uma alternativa a esta medida, este estudo visou o controle desses carrapato em seus hospedeiros, por meio de uma vacina, metodologia que já vem sendo estudada contra o carrapato-do-boi *Rhipicephalus microplus*. Com base em resultados recentes do laboratório, optou-se por utilizar peptídeos como antígenos vacinais. Dessa forma, foi optado por análise de inibidores de proteinases (serpinas) expressas pela glândula salivar de *A. cajennense* s.l., e assim foi desenhado um peptídeo baseado em epítipo linear de linfócitos B e ligante de MHC de classe II murino, com sequência conservada entre quatro serpinas expressas de *A. cajennense* s.l. O peptídeo foi sintetizado na forma pura (AcSP1) e conjugado ao carreador *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH) (AcSP1KLH). Camundongos Balb/c foram inoculados com AcSP1, AcSP1KLH, e grupo controle apenas com PBS e adjuvante de Freund. Após quatro doses, foi realizado ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) e Dot Blot dos soros dos animais. Como resultado, ambos os imunoenaios não mostraram resposta imune consistente em qualquer dos camundongos inoculados dos três grupos. Os resultados de Dot Blot mostraram que apenas os animais inoculados com AcSP1KLH responderam contra este próprio antígeno, quando adsorvido em membrana de nitrocelulose. Este resultado indica que houve apresentação do complexo hapteno-carreador ao sistema imune do hospedeiro, via células apresentadoras de antígeno (APCs) a linfócitos T auxiliares. No entanto, de alguma forma o peptídeo AcSP1 não foi apresentado adequadamente, o que gerou uma resposta humoral apenas contra o carreador KLH. Assim, mais estudos devem ser realizados a fim de se aprimorar o processo de seleção de epítopos antigênicos e conjugação a carreadores moleculares, a fim de que esta associação possa desencadear uma resposta imune eficaz contra proteínas alvo do carrapato.

Palavras-chave: *Amblyomma cajennense* s.l., serpinas, peptídeos sintéticos, imunoinformática.

INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), doença causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, é grave para seres humanos, possuindo baixa morbidade, mas alta letalidade, o que lhe confere importância em saúde pública (PACHECO et al., 2009). O gênero *Rickettsia* inclui bactérias da ordem Rickettsiales, da classe das Proteobactérias. São cocobacilos Gram-negativos obrigatoriamente intracelulares (PAROLA; PADDOCK; RAOULT, 2005).

Esse grupo de bactérias é transmitido principalmente para seres humanos, no Brasil, pelos carrapatos *Amblyomma cajennense* sensu lato (s.l.), na região do cerrado, e *A. aureolatum*, na região de mata atlântica (LABRUNA, 2009). A presença deste agente já foi detectada no carrapato do cão, o *Rhipicephalus sanguineus*, que pode parasitar eventualmente seres humanos, sendo este também uma possível fonte de transmissão (ALMEIDA et al., 2013).

A principal medida de controle da FMB é pelo controle de seu vetor, juntamente com o controle de hospedeiros amplificadores (KAZAR, BREZINA, 1991). O controle do vetor se dá principalmente pela aplicação de piretróides e organofosforados no hospedeiro. Porém, essa alternativa, além de levar ao surgimento de resistência e ser uma prática onerosa, é viável apenas aos hospedeiros domésticos, sendo limitado aos silvestres (CLEMENTE et al., 2010; CUNHA et al., 2007; FREITAS; ZAPATA; FERNANDES, 2011).

O controle imunológico de carrapatos, tem sido estudado quase exclusivamente para o *R. microplus*, carrapato importante que causa prejuízo à cadeia produtiva de carne. O único antígeno vacinal comercializado foi a proteína proveniente do sistema digestivo do carrapato denominado de Bm86. Esta foi capaz de induzir imunoproteção em bovinos (RAND et al., 1989), e está presente na superfície apical de células do intestino do carrapato (GOUGH; KEMP, 1993). As vacinas comerciais contendo a proteína recombinante Bm86, GavacTM e TickGard^{PLUS}, mostraram

eficiência contestável (menor que 50%), contra cepa de *R. microplus* de Mato Grosso do Sul, Brasil (ANDREOTTI, 2006). Dessa forma, outros antígenos e estratégias de seleção vêm sendo abordados. Nesse contexto, o estudo de inibidores de proteases (serpinas) como antígeno ganhou atenção, uma vez que estes possuem papel crucial no sucesso do parasitismo, por manterem o sangue fluido para a ingestão pelo carrapato (TIRLONI et al., 2016).

Com o surgimento da era pós-genômica e novas ferramentas de bioinformática, tornou-se viável uma melhor compreensão sobre genomas de organismos complexos como carrapatos. Dentre os avanços, tornou-se possível discriminar a variabilidade genética entre as cepas, que aliado às ferramentas de bioinformática, permitem a busca por estruturas conservadas entre as espécies e possíveis candidatos à vacina (KOPP et al., 2009; MARITZ-OLIVIER; VAN ZYL; STUTZER, 2012).

Assim, este estudo propõe a validação de um modelo para seleção de candidatos a antígenos vacinais de carrapatos que ainda estão muito longe de ter uma vacina desenvolvida, como o caso do *A. cajennense* s.l. Este estudo visou avaliar a capacidade de um peptídeo selecionado a partir de um epítipo linear de superfície de linfócitos B e T (MHC II murino) desencadear resposta imune em camundongos quando associado a um carreador molecular, e testar sua eficácia contra o *A. cajennense* s.s. e *A. sculptum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Seleção de epítopos de linfócitos B, T e MHC classe II murino

O acesso às proteínas de *A. cajennense* s.l. se deu pelo o sialotranscriptoma do mesmo, publicado por Garcia et al. (2014). Também foram acessadas as sequências provenientes do transcriptoma da glândula salivar de *R. microplus*, projeto

ainda em andamento no laboratório (dados não publicados). Assim, a família das serpinas, compreendendo um total de 19 sequências, foi selecionada para análises de imunoinformática.

Para avaliar a similaridade entre as sequências a fim de se buscar epítomos conservados foi procedido o alinhamento entre as 19 serpinas pelo programa Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Também foi utilizada a ferramenta blastp, do *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST - <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para checar identidade deste peptídeo com serpinas de outras espécies já analisadas (PORTER et al., 2015). As atividades de imunoinformática de análise e avaliação dos EST(s) e sequências foram realizadas com algoritmos livres disponíveis *online*, como o IEDB, contendo ferramentas como o NetMHCIIpan (<http://tools.iedb.org/mhcii/>), para predição de epítomos ligantes de MHC II murino, alelos H2-IA_D e H2-IA_B, *Emmini Surface Accessibility Scale* e *Bepipred Linear Epitope Prediction* (<http://tools.iedb.org/bcell/>), que predizem epítomos lineares de linfócitos B, e o IUPred, cutoff de 0.3 (<http://iupred.enzim.hu/pred.php>), para a predição de regiões intrinsecamente desordenadas. As estruturas depositadas no *Protein Data Bank* () foram utilizadas para análise estrutural realizadas com softwares Swiss-PDB viewer (GUDEX; PEITSCH, 1997) e UCSF Chimera. Caso a proteína não tenha a estrutura tridimensional resolvida, foi executada a modelagem por homologia com o *software* MODELLER v9.10. Desta forma aliamos as análises mais atuais de sequências com análises estruturais para identificarmos com mais precisão os epítomos em sua forma estrutural (estrutura terciária).

O algoritmo NetMHCIIpan calcula o resultado de predição de IC₅₀ de peptídeos formados iniciando com cada aminoácido da sequência da proteína. Cada peptídeo recebe um valor, e isso gera uma tabela contendo os peptídeos e seus respectivos valores. Esses valores foram trabalhados com o programa Excel para gerar um gráfico, para melhor visualização da distribuição dos valores ao longo da proteína (figura 2).

Assim foi definido um epítipo compreendido entre os resíduos 358-376, conservado entre quatro serpinas expressas pela glândula salivar de *A. cajennense* s.l., números de acesso: Ac-23315; Ac-103003; Ac-115795; Ac-16381. A proteína Ac-103003 foi modelada por homologia com o *software* MODELLER v9.10 (SALI e BLUNDEL, 1993) utilizando como molde a estrutura de antitrombina humana (PDB: 3EVJ) com 35.41% de similaridade. Desta forma, as análises mais atuais de seqüências com análises estruturais foram conjugadas para identificarmos com mais precisão os epítipos em sua forma estrutural (estrutura terciária).

Síntese do peptídeo AcSP1

A sequência selecionada para a síntese do peptídeo foi: N-HKAFVEVNEEGTEAAAATA-C. Os peptídeos foram sintetizados pela empresa WatsonBio, LLC (Houston, Texas, EUA) e enviados liofilizados, com pureza mínima de 70%, sob duas formas:

- peptídeo puro, denominado AcSP1: total de 14,2 mg;
- com a conjugação do carreador *Keyhole Limpet Hemocyanin* (KLH), no amino-terminal (-N), denominado AcSP1KLH: total de 30 mg.

Para a conjugação ao carreador KLH, o foi adicionada uma cisteína no amino-terminal ao AcSP1 e conjugado usando um m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester. Do total de 30 mg de AcSP1KLH, 5 mg correspondem ao total de AcSP1 com cisteína (2,39 kDa) e 25 mg ao total de KLH ($\cong$ 390 kDa). Dessa forma, há uma proporção de aproximadamente 33 AcSP1/KLH. Assim, neste trabalho consideramos essa proporção como uma unidade de AcSP1KLH. Portanto, cada molécula de AcSP1KLH possui o peso aproximado de 468 kDa.

Eletroforese em gel de poliacrilamida - SDS-PAGE

Para confirmação da presença e integridade de AcSP1 e conjugado AcSP1KLH, foram preparados géis de poliacrilamida, a 8% (AcSP1KLH) e a 15% (AcSP1). Foi realizada dosagem de proteínas de ambos com o kit RC DC Protein Assay (Bio-Rad, California, EUA). Assim, 15 µg de AcSP1 e AcSP1KLH foram adicionados ao tampão de amostra, em duplicata e aquecidos a 95°C por 10 minutos. Após, as amostras foram aplicadas nos géis e foi procedido com a corrida aplicando-se uma corrente de 15 mA por aproximadamente 3 horas. Foi utilizado o Precision Plus Protein, modelos All Blue (10 a 250 kDa), para AcSP1KLH, e Dual Xtra (2 a 250 kDa) (Bio-Rad, California, EUA), para AcSP1 como marcadores de peso molecular. Brevemente, géis foram corados em solução de azul de Comassie, sob agitação por 20 min, e descorados com solução descorante à base de ácido acético glacial, até as bandas serem evidenciadas.

Imunizações de camundongos Balb/c

Para o ensaio de resposta imune, foram utilizados 18 camundongos Balb/c, fêmeas, com idade de cinco a seis semanas cada. Todas as metodologias envolvendo o uso dos animais foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fiocruz Rondônia, sob protocolo nº 2015/11.

Tanto o AcSP1 quanto AcSP1KLH liofilizados foram ressuspensos inicialmente em tampão fosfato-salino, pH=7.4 (PBS), para uma concentração final de uso de 10 µg/µL. Os animais foram divididos em três grupos com seis animais cada e inoculados de acordo com a tabela abaixo:

Grupos	Inóculo						Nº doses	Via
	PBS	Ag	Volume μL	Concentração	Adjuvante	TOTAL		
C	100	-	-	-	100	200	4	SC
SP	98	AcSP1	2	10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	100	200	4	SC
SPK	90	AcSP1KLH	10	10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	100	200	4	SC

Todos os animais foram submetidos a quatro inoculações por via subcutânea (SC). Foi utilizado adjuvante completo de Freund na primeira dose e incompleto nas três subsequentes. As três primeiras doses foram aplicadas com 10 dias de intervalo entre cada uma (dias 0, 10 e 20). Uma quarta dose de reforço foi aplicada no 45º dia após a primeira inoculação (dia 0).

Durante todo o período de inoculações, e por até 95 dias da primeira dose, aproximadamente 100 μL de sangue foi colhido de cada camundongo, via plexo retro-orbital, com auxílio de pipetas Pasteur de vidro. O sangue foi centrifugado a 2.700xG por 6 minutos. Assim, o soro foi separado do coágulo e congelado a -18°C , até o uso nos imunoenaios.

Imunoensaios - ELISA e *Dot blot*

Durante e ao final do experimento, os soros de todos os animais foram testados para produção de anticorpos policlonais anti-AcSP1 e anti-AcSP1KLH, por meio de ensaio de imunoadsorção enzimática (ELISA) e *Dot blot*.

O *Dot blot* foi realizado com os soros dos animais colhidos nos dias 0, 35, 56 e 70. Para isso, fragmentos de membranas de nitrocelulose foram adsorvidas com 2 μg de AcSP1KLH em um sítio e 20 μg de AcSP1 em outro. O bloqueio foi realizado com leite em pó desnatado (Mollico, Nestlé) a 5%. A fase de incubação com anticorpos

primários foi realizada com *pool* de soros de camundongos, por grupo, na diluição de 1:50 em PBS-T (com *Tween* 20 a 0,5%), por 1 hora e 30 minutos. Após, as membranas foram incubadas com anticorpo secundário anti-*mouse* IgG (Sigma), na diluição de 1:1000, por 1 hora e 20 minutos. A revelação da reação foi procedida com solução reveladora contendo diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e deixadas secar.

O ELISA foi realizado de acordo com Maritz-Olivier et al. (2012). Brevemente, as placas de 96 poços (Nunc) foram sensibilizadas com 1 µg por poço do antígeno SerpinP1, diluídos em 100 µL de tampão carbonato-bicarbonato, pH=9.6, e depois conservadas a -18°C até o uso. Soros de camundongos, de todos os dias de coleta, foram processados individualmente, em duplicata, por data de coleta, na concentração de 1:200, diluídos em PBS com *Tween* 20 (PBS-T), pH=7.4. Após foi procedida a incubação com anticorpo secundário anti-*mouse* IgG (Sigma), na diluição de 1:2000, em PBS-T. A revelação da reação foi realizada com ortofenilenodiamina (OPD). A leitura foi realizada por leitor de ELISA com comprimento de onda a 490 nm.

RESULTADOS

O alinhamento das 19 sequências das serpinas publicadas por Garcia et al. (2014) mostrou que pelo menos 10 destas formam quatro grupos majoritários com sequência aminoacídica similar dentro de cada grupo (dados não mostrados). Dessa forma, foi escolhido um grupo de quatro serpinas para que seja selecionado um epítopo compartilhado entre elas (figura 1).

```

Ac-23315 -----MATNPLGESLLNFSIDLY
Ac-103003 ESAVTCRPTFAALNFTGSDWALLVRDNFCRRFRNDCRETARMAANPLGDSVLGFSVDLY
Ac-115795 -----QHFTTTMAANPLGESVLGFSIGLY
Ac-16381 -----MAEDLSSATLAFSLNLH
:: *..: * **:..:

Ac-23315 KQLISKSGHSG-NVFYSPFSAALSMAAGARNTTAKQLTDVLHVNSDN-IHKHFSGLF
Ac-103003 KQLVSENSQHG-NIFCSPFSAALSMAAGARSNTAKELSEILQVSDA-IHTQFSGFF
Ac-115795 KQLVSQDGHKG-NVFYSPFSAALSMAAGARANTATELSTVLRADAAK-IHSQYSDF
Ac-16381 RQLLAATSGSGKNVVFSPFSIATALSMTLAGARGRTAEIIAAVLHTGKLKDVHTNFSEFL
::*: . * *:.. *****:****:*.*** ** :: :*:.. :*.:* *:

Ac-23315 SKLSGFDPDVKLHVANRMYAEQTFPVLDTYLSLLRDSYGATIESVDFQNNYEKVRGEVNA
Ac-103003 SKLPGYAEDVKLHVANRMYCEQTPVLESYLSLLKDSYEATIESVDFRNNSESVREQVNA
Ac-115795 SKLASADHVKLHVANRMYSEKTFPVLESYLSLLRERYGATIESVDFRNDCEVNRQINA
Ac-16381 AKISGLAPDVTLEVANRLYCEKTYSILEEYTGALKKFYGSVGEFANFKTEAEQARLAVNA
:*. . .*.*****:*.***:***: * . * : :*.***: *..* :**

Ac-23315 WVEEATQSKIKNLLPPGSVDLSLTLLILVNAIYFKGLWSSQFNPNSTHRSDFHLDSTKKE
Ac-103003 WVEKTTESKIKNLLPSGSVDALTTLLILVNAIYFKGLWKSQFNTRATRSDFHLDSTKKE
Ac-115795 WVEKETESKIKDLLPGGSVDVFTSLILVNAIYFKGSWTSPPFDEYATHRADFHLDSTKKE
Ac-16381 WVEKTTKSKIKDLLPSGTVDYDTALVLVNAVYFKGLWQEPFNPRTSQKHFTSKDKTKN
***: *:***:*** **: * *:***:*** * . *: * .** .....*:

Ac-23315 VDMMYQNNDYKMSR-SDELAVTALEIPYRGGKTSMVVLLPDSIEGLSKLEDSLTAASNVE
Ac-103003 VDTMYQKSSFKMAS-CDDLDTALEIPYQGGKTSMVVLLPNDIEGLAKLEERLTDLKLKN
Ac-115795 VDMMYKKKAYKMT-NDELDAVEIPYQGGKTSMVVLLPNDIEGLSKLEDLLTAPKLAD
Ac-16381 VDMMRREGEYRMCEKCDDLKASAIEIPYKGGKTSMLILLPYDVEGLTDLEAALTPSKVAD
** * :: :*. ** .*:***:*****:*** .***:..** ** :: :

Ac-23315 LLKSLRDSSDVKLYLPKFKLEQAIDLKETLKAMGIKDFFTPAADLTGISDKGNLVASEVI
Ac-103003 LFNMLRSQSDVELYLPKFKLEHAIGLKKTLQAMGIKDFFSKADLSAISEAGNLVATDVV
Ac-115795 LMKNLRSQSDVELYLPKFRLEQITGLKDTLKALGIKDFFSSEADLSAITGKKNLNASDVI
Ac-16381 VLKCLGSTKTVKLSLPRFKVEQAVNLKDTLSSMGVKELFAETADLSGIDGKQELSVSAAI
::: * . *: * *:***:***:..**.*.***:***:***: **:..* :* .: .:

Ac-23315 HKAFVEVNEEGTEAAAAATGIAMMLMCAFPDT---RFVVDPRPFMFLIRSLDPDVLFMGS
Ac-103003 HKAFVEVNEEGTEAAAAATAVVMCMCRCAVMPMMT-HKFVVDHPFMFLIRSHDPEVLFMGS
Ac-115795 HKAFVEVDEKTEAAAAATATMLGCCMSTTVPVITYKFVVDPRPFMFLIRSHDPEVLFMGS
Ac-16381 HKAFVEVNEEGTEAAAAATAMPAANSCEITPKFT----VDHPFMFLIRSHNPDI VLFGLS
*****:*.*****. * . ***:***** :*:***:***

Ac-23315 VRHL
Ac-103003 IREL
Ac-115795 VREL
Ac-16381 VRDI
:~*~

```

Figura 1: Alinhamento do grupo de serpinas selecionado para este estudo pelo Clustal Omega. (*) são aminoácidos conservados em todas as proteínas; (:) similaridade forte; (.)similaridade fraca (-) gaps entre as sequências. Em vermelho está destacado o AcSP1.

Como mencionado, foi escolhido o epítopo da proteína Ac-103003 situado entre os resíduos 358-376 para servir de antígeno para este estudo. Este resíduo apresentou alta afinidade de ligação ao MHC II murino, em dois alelos (H2-IAd e H2-IAb), por meio do algoritmo NetMHCIIpan. No gráfico, isso representa um vale ao invés de um pico, pois o resultado desta análise apresenta valores de IC50, onde quanto menor o valor, maior a afinidade por ligação (menor quantidade de peptídeo é necessária para desfazer a ligação do MHC a um antígeno padrão).

Os gráficos dos resultados dos algoritmos *Bepipred Linear Epitope Prediction Results* e *Emini Surface Accessibility Results* mostraram picos na região abordada. Isso indica que existe alta probabilidade de ser uma região de epítopo linear de células B e ser encontrada na superfície da estrutura terciária da proteína, sendo facilmente reconhecida por anticorpos circulantes.

O gráfico gerado pelo algoritmo IUPred não mostra picos acima do limiar traçado na região, e nem no restante da proteína, com exceção à região amino-terminal. Isto indica que a proteína escolhida possui uma estrutura terciária estável, o que torna o epítopo constantemente exposto à ação de anticorpos.

O resultado do blastp mostrou que este peptídeo possui ainda 100% de identidade com a mesma região de serpinas de *R. microplus*, *R. Appendiculatus*, *Ixodes scapularis* e *I. ricinus*. Além destas espécies, também mostrou alta identidade com serpinas de *R. haemaphysaloides*, *A. americanum*, *A. variegatum* e *Haemaphysalis longicornis* (dados não mostrados).

Os resultados da modelagem estrutural e análises de imunoinformática estão dispostos nas figuras 2 e 3, respectivamente.

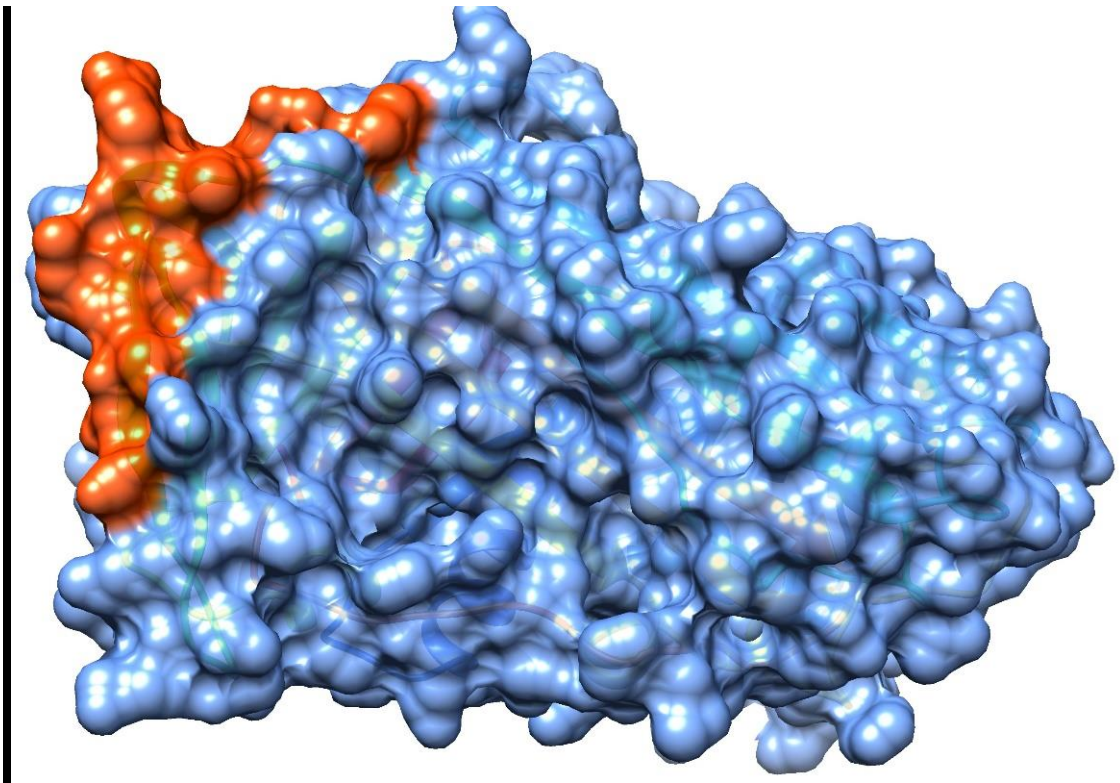


Figura 2: Resultado da modelagem do *software* MODELLER v9.10. Em laranja a localização espacial do peptídeo HKAFVEVNEEGTEAAAATA.

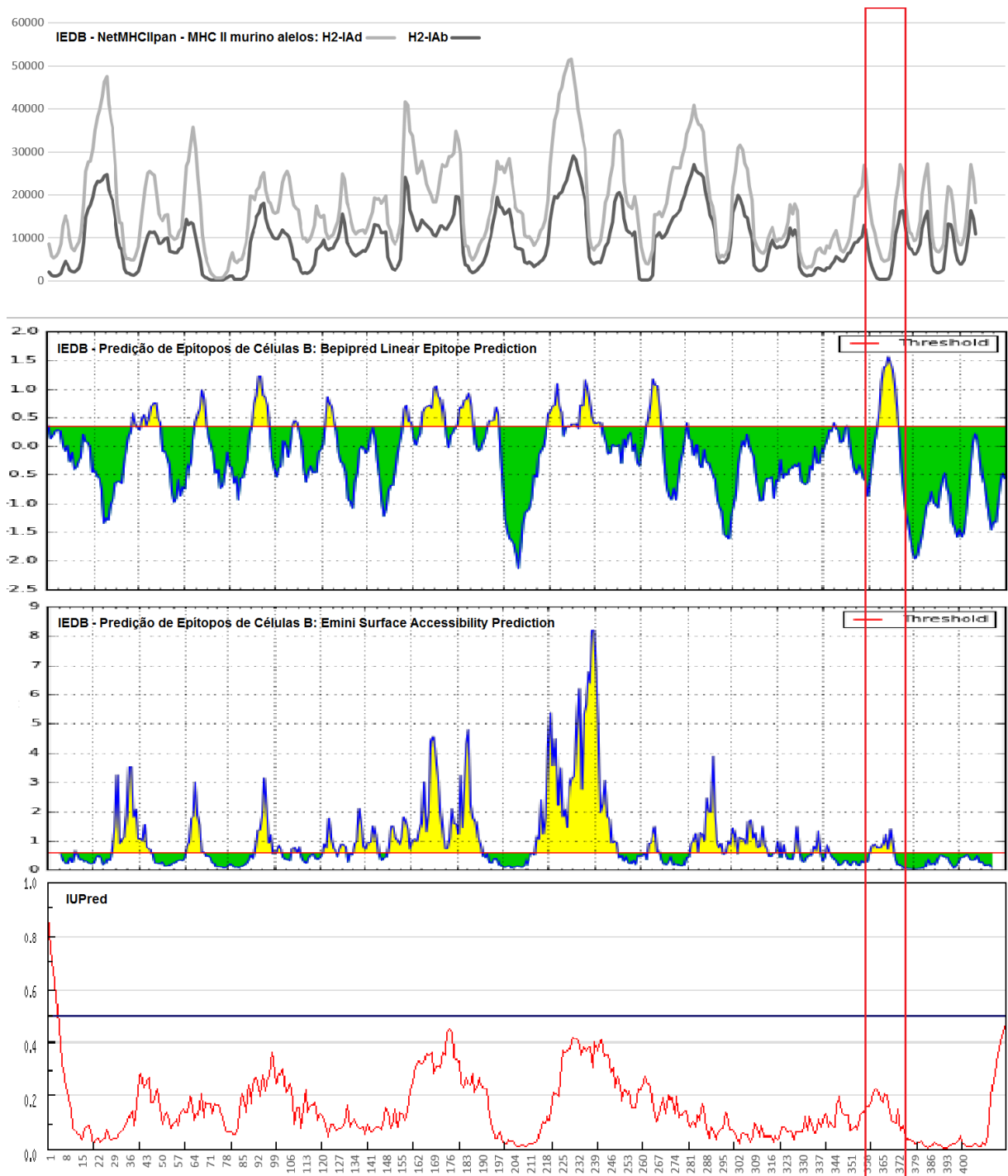


Figura 3: Análise integrada de imunoinformática da serpina Ac-103003, selecionada como molde para a definição da sequência final do peptídeo N-HKAFVEVNEEGTEAAAATA-C (aa 358-376) (destaque em retângulo vertical vermelho). De cima para baixo estão os resultados gráficos dos seguintes algoritmos:

IEDB (1º ao 3º gráfico) - NetMHCIIpan, *Bepipred Linear Epitope Prediction Results*, *Emini Surface Accessibility Results*, respectivamente; IUPred - Prediction of Intrinsically Unstructured Proteins. Com exceção ao 1º gráfico, todos exibem características desejáveis quando acima do limiar traçado.

As dosagens proteicas mostraram uma concentração de 0,6 mg/mL para AcSP1 e 0,2 mg/mL de AcSP1KLH. Os resultados de SDS-PAGE confirmaram a presença tanto de AcSP1 e AcSP1KLH. O tamanho exato do complexo AcSP1KLH não pôde ser determinado, pois as bandas contendo as proteínas foram visualizadas na parte superior do gel, acima dos 250 kDa, maior peso do marcador molecular utilizado (dados não mostrados). Bandas de tamanho pouco acima de 5 kDa foram visualizadas em gel contendo AcSP1 (figura 4).

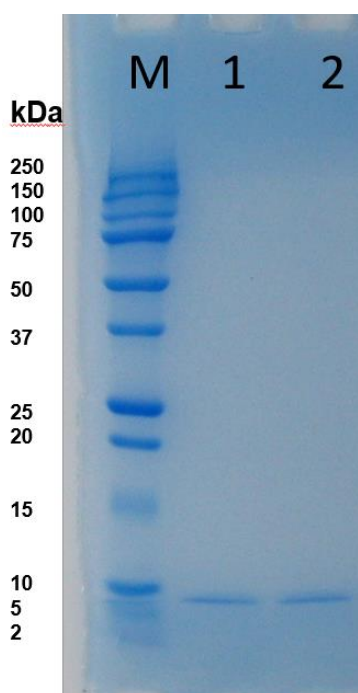


Figura 4: SDS-PAGE do peptídeo em gel a 15%. A coluna M corresponde aos marcadores de peso molecular (2-250 kDa); colunas 1 e 2 correspondem a 15 µg de AcSP1 em duplicata.

Os resultados da avaliação da produção de anticorpos por ELISA se encontram abaixo (figura 5):

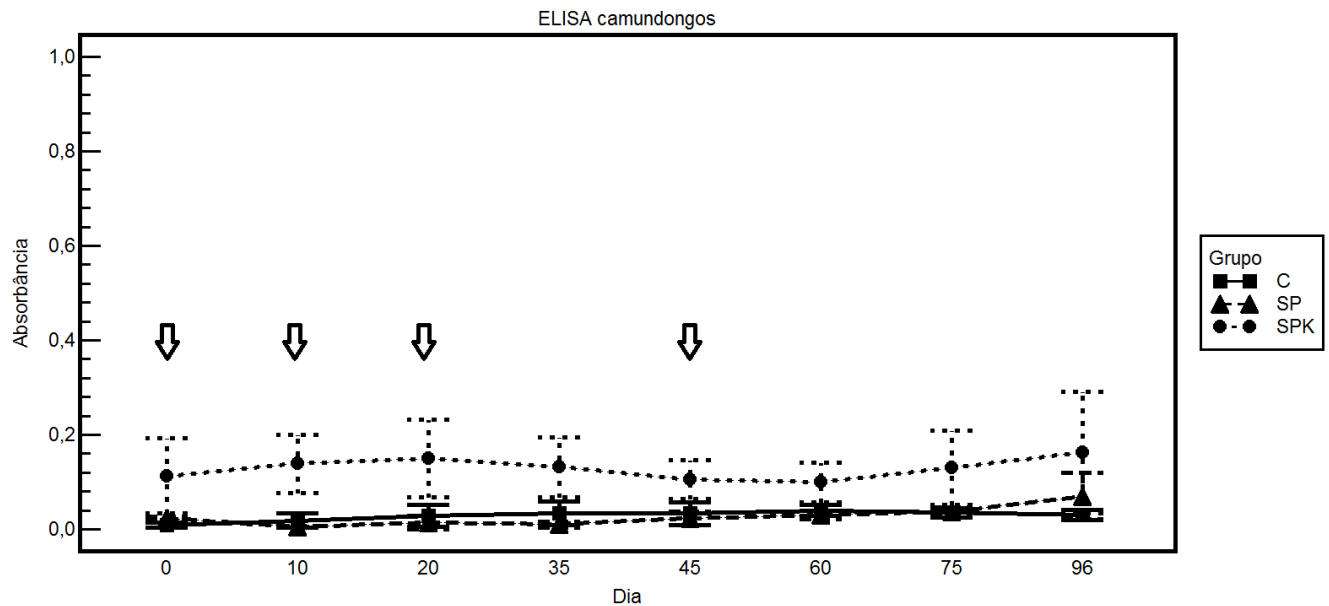


Figura 5: Perfil de resposta imune humoral anti-AcSP1 de camundongos inoculados. As leituras de absorvância do ELISA correspondem à média das leituras das amostras de soros de cada grupo (seis animais cada), em cada dia de coleta, inoculados nos dias 0, 10, 20 e 45 (setas). O título de anticorpos dos animais foram mensurados em densidade óptica de 490 nm, em soros diluídos 1:200. As barras de erro demonstram um desvio padrão dentro de cada grupo em cada dia de coleta.

Os resultados de *Dot blot* foram gerados em membranas de nitrocelulose. Para isso, foi realizado um esquema e apresentado abaixo (figura 6):

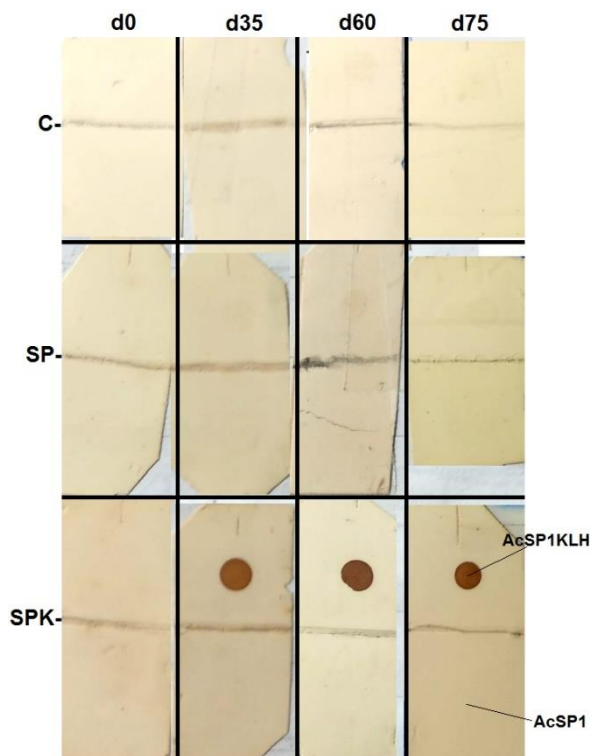


Figura 6: *Dot blot* comparando *pool* de soros dos animais de cada grupo, nos dias 0, 35, 60 e 75 (colunas). As linhas indicam os resultados de cada grupo (C, SP e SPK) ao longo do tempo. Todas as membranas foram divididas em duas partes, sendo a superior adsorvida com AcSP1KLH e a inferior com AcSP1.

DISCUSSÃO

As serpinas mostram interesse como potencial candidato à vacina contra carrapatos por sua importância para o repasto sanguíneo do parasita, com sua função de manter o sangue fluido tanto no local da picada quanto no intestino e hemolinfa. Essa mesma família de inibidores de proteases também mostrou propriedades moduladoras da resposta imune do hospedeiro (MULENGA et al., 2001). Essa família de proteínas já foi utilizada, por meio da tecnologia de proteína recombinante, em estudos vacinais contra as espécies *H. longicornis*, *I. ricinus*, *R. microplus*, *R. appendiculatus* e *A. americanum* (SUGINO et al., 2003; IMAMURA et al., 2005, 2006,

2008; PREVOT et al., 2007; JITTAPALAPONG et al., 2010; KIM; RADULOVIC; MULENGA, 2016).

É de suma importância que uma vacina contra carrapatos seja delineada visando à mitigação de efeitos sobre a variabilidade genética entre as populações. Sabidamente, diferenças na sequência da proteína alvo da vacina entre as populações de carrapatos podem interferir na dinâmica de reconhecimento do antígeno pelos anticorpos específicos desenvolvidos pela imunização (ANDREOTTI et al., 2008). Serpinas, denominadas AAS, derivadas de *A. americanum*, mostraram que possuem suas alças do centro reativo (*Reactive Center Loop* - RCL) altamente conservadas entre distintas espécies de ixodídeos (PORTER et al., 2015). Ademais, as análises do blastp mostraram que o peptídeo AcSP1 compõe parcialmente o RCL, o que corrobora com a sua conservação entre espécies. Como o RCL é de suma importância para a função das serpinas, é de relevância utilizar este centro como um candidato a alvo vacinal.

Os alinhamentos realizados pelo Clustal Omega nos mostraram que as 19 serpinas descritas por Garcia et al. (2014) mostraram que algumas se agrupam como similares. A sequência do AcSP1, por exemplo, é compartilhada entre quatro das 19 serpinas. Este tipo de agrupamento entre distintas serpinas expressas por uma mesma espécie de ixodídeo também foi reportado por Porter et al. (2015). Assim, dessa forma, uma resposta contra o AcSP1 inibiria ao menos o RCL de quatro serpinas importantes para o *A. cajennense* s.l.

Apesar de as análises *in silico* e imunoinformática aqui empregadas terem demonstrado que além de conservado, o peptídeo AcSP1 ainda possui alta afinidade por ligação ao MHC de classe II de camundongos, os imunoenaios com os animais não foram conclusivos para corroborar tal hipótese. Tanto a presença de AcSP1 quanto o conjugado AcSP1KLH foram confirmados por SDS-PAGE, embora nenhum soro ou *pool* destes, dos grupos SP e SPK, tenham revelado uma produção de anticorpos específicos seja por ELISA ou por *Dot blot*.

Não obstante, os resultados de *Dot blot* mostraram forte produção de anticorpos contra o AcSP1KLH, indicando que ao menos o carreador molecular KLH contendo o peptídeo conjugado foi processado por uma célula apresentadora de antígeno (APC) e apresentada ao sistema imune via linfócitos T, que por sua vez estimularam linfócitos B a se diferenciarem em plasmócitos, gerando uma resposta imune humoral contra o KLH. É possível também que linfócitos B de memória tenham sido estimulados pelo KLH diretamente após as doses de reforço.

Podemos atribuir alguns conceitos sobre o não reconhecimento de anticorpos específicos ao AcSP1 por ELISA e *Dot blot* como: uma possível clivagem do complexo AcSP1KLH por neutrófilos no local da aplicação, uma vez que estes também são recrutados por estímulo do adjuvante; a clivagem do próprio peptídeo no interior das APCs, de forma não haver a sequência final íntegra para a ligação ao MHC de classe II; as banda acima de 5 kDa demonstradas pelo SDS-PAGE sugerem que os peptídeos podem ter formado trímeros, ou tetrâmeros, incapazes de serem reconhecidos por anticorpos específicos anti-AcSP1; as dosagens proteicas acusaram uma concentração muito menor do que o esperado após as diluições dos antígenos, considerando os 70% de pureza garantidos pelo fabricante, assim, os animais podem ter recebido uma carga menor de antígenos e o mesmo deve ter influenciado nos resultados dos imunoenaios.

CONCLUSÃO

Ferramentas de bioinformática e imunoinformática possibilitam o desenvolvimento de novas estratégias na seleção de antígenos candidatos contra espécies de carrapatos de importância em saúde pública e veterinária que ainda não possuem uma vacina ainda na agenda das pesquisas. Novos ensaios devem ser realizados considerando a nova dosagem proteica, realizada ao final dos experimentos. Vale ressaltar que a estratégia empregada aqui é um modelo que pode

ser utilizado e otimizado para outras espécies de carrapatos, em estudos posteriores. Como o carrapato é um ser eucarioto, contendo um genoma extenso, é interessante que novos estudos sejam capazes de explorar a eficiência de proteínas, subunidades ou peptídeos candidatos, oriundos de distintas vias metabólicas do parasita.

AGRADECIMENTOS

À Fundação Rondônia de Amparo ao Desenvolvimento das Ações Científicas e Tecnológicas e à Pesquisa do Estado de Rondônia (FAPERO), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fiocruz Rondônia e Embrapa Gado de Corte.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary**, v. 15, n. 3, p. 97–100, 2006.
- ANDREOTTI, R. et al. COMPARISON OF PREDICTED BINDERS IN *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* INTESTINE PROTEIN VARIANTS BM86 CAMPO GRANDE STRAIN, BM86 AND BM95*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 1, p. 93-98, 2008.
- CLEMENTE, M. A. et al. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 107, n. 4, p. 987–992, 2010.
- CUNHA, A. P. et al. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense* em equinos, Minas Gerais, Brasil - Parte I. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary**, v. 16, n. 4, p. 221–228, 2007.
- DE CAMPOS PACHECO, R. et al. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351–353, 2009.
- DE FREITAS, E. P. S.; ZAPATA, M. T. A. G.; DE FERNANDES, F. F. Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) to synthetic acaricides in Goiás, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 2, p. 189–202, 2011.
- GARCIA, G. et al. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 430, 2014.
- GOUGH, J.M.; KEMP, D.H. Localization of a Low Abundance Membrane Protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. **Journal of Parasitology**, v. 79, n. 6, p. 900-907, 1993.
- IMAMURA, S. et al. A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. **Vaccine**, v. 23, p. 1301-1311, 2005.
- IMAMURA, S. et al. Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. **Vaccine**, v. 24, p. 2230-2237, 2006.

IMAMURA, S. et al. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. **Japanese Journal of Veterinary Research**, v. 56, n. 2, p. 85-98, 2008.

JITTAPALAPONG, S. et al. Immunization of rabbits with recombinant serine protease inhibitor reduces the performance of adult female *Rhipicephalus microplus*. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 57, p. 103-106, 2010.

KAZAR, J.; BREZINA, R. Control of rickettsial diseases. **European Journal of Epidemiology**, v. 7, n. 3, p. 282-286, 1991.

KIM, T. K.; RADULOVIC, Z.; MULENGA, A. Target validation of highly conserved *Amblyomma americanum* tick saliva serine protease inhibitor 19. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 405-414, 2016.

KOPP, N. et al. Identification of a synthetic peptide inducing cross-reactive antibodies binding to *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Rhipicephalus appendiculatus* BM86 homologues. **Vaccine**, v. 28, n. 1, p. 261–269, 2009.

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

MARITZ-OLIVIER, C.; VAN ZYL, W.; STUTZER, C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 3, p. 179–187, 2012.

MULENGA, A. et al. Tick-Encoded Serine Proteinase Inhibitors (Serpins); Potential Target Antigens for Tick Vaccine Development. **Journal of Veterinary Medical Science**, v. 63, n. 10, p. 1063-1069, 2001.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719–756, 2005.

PORTER, L. et al. Bioinformatic analyses of male and female *Amblyomma americanum* tick expressed serine protease inhibitors (serpins). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, p. 16-30.

PREVOT, et al. Protective immunity against *Ixodes ricinus* induced by a salivary serpin. **Vaccine**, v. 25, p. 3284-3292, 2007.

RAND, K. N. et al. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 24, p. 9657–61, 1989.

SUGINO, M. et al. A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. **Vaccine**, v. 21, p. 2844-2851, 2003.

TIRLONI, L. et al. The putative role of *Rhipicephalus microplus* salivary serpins in the tick-host relationship. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 71, p. 12-28, 2016.

4.5 Artigo 5 - Publicado na International Journal for Parasitology (Qualis: A1)



Contents lists available at ScienceDirect

International Journal for Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ijpara

Succinctus

Formula to evaluate efficacy of vaccines and systemic substances against three-host ticks



André de Abreu Rangel Aguirre^{a,d,*}, Marcos Valério Garcia^{b,e}, Matias Pablo Juan Szabó^c,
Jacqueline Cavalcante Barros^b, Renato Andreotti^{b,*}

^a Programa de Pós-graduação em Doenças Infecciosas e Parasitárias, FAMED, UFMS, Campo Grande, MS, Brazil^b Empresa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia nº 830, Zona Rural, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brazil^c Universidade Federal de Uberlândia – UFU, Uberlândia, MG, Brazil^d Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Rondônia, Porto Velho, RO, Brazil^e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 November 2014

Received in revised form 2 February 2015

Accepted 2 February 2015

Available online 9 March 2015

Keywords:

Vaccine

Tick

Three-host

Efficacy

ABSTRACT

The control of ticks with vaccines is of global interest. Experimental vaccines incorporate new technologies as soon as they are available. Historically, the main vaccine studies have focused on the one-host cattle tick *Rhipicephalus microplus*, and efficacy evaluations have been standardised for this tick species. On the other hand, evaluations of vaccine candidates for three-host ticks are being done somewhat arbitrarily and thus comparisons within the current literature on the efficacy of vaccines, as well as other methods of control, are difficult. We herein provide a formula for the evaluation of efficacy of a vaccine designed against three-host ticks that incorporates the whole life cycle of the tick.

© 2015 The Authors. Published by Elsevier Ltd. on behalf of Australian Society for Parasitology Inc. This is an open access article under the CC BY-NC-SA license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

The calculation of tick vaccine efficacy is used to report the percentage of immunoprotection of a product against the parasite. This calculation has been applied around the world overwhelmingly for products designed against the cattle tick, *Rhipicephalus microplus* (and *Rhipicephalus australis*). In the first report of vaccine efficacy against the cattle tick, Wong and Opdebeeck (1989) used a formula containing only three parameters: total number of detached adults, oviposition of adults and egg mass weight. Eight years later, Canales et al. (1997) calculated for the first time the current standard test for vaccine efficacy against ticks. In fact, this formula was used to test the efficacy of the commercial vaccine GavacTM (Heber Biotec S.A., Havana, Cuba), developed to control the *R. microplus* and *Rhipicephalus annulatus* populations (Fragoso et al., 1998). This formula calculates the efficacy (E%) based on three variables: number of detached engorged adults (CRT), egg mass weight (CRO) and fertility of eggs (CRF) as follows (Canales et al., 1997; Andreotti, 2007; Miller et al., 2012):

$$E\% = 100 * [1 - (CRT * CRO * CRF)].$$

* Corresponding authors at: Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz Rondônia, Rua da Beira nº 7671, Bairro Lagoa, CEP 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil. Tel.: +55 69 3219 6001 (A.d.A.R. Aguirre). Tel.: +55 67 3368 2173; fax: +55 67 3368 2150 (R. Andreotti).

E-mail address: andreaguirre@fiocruz.br (A.d.A.R. Aguirre).

At the same time, control of the three-host tick species, such as *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma variegatum* and *Ixodes scapularis*, is also on the research agenda but a standard formula has not yet been established. In the last few years it has been proposed to validate vaccine efficacy by correlating antibody titers in individual animals with some of the tick parameters, which we included in the formula discussed below (Szabó and Bechara, 1997; Almazán et al., 2003, 2005; Trimnell et al., 2005; Pérez-Pérez et al., 2010; Anisuzzaman et al., 2012). Almazán et al. (2005) calculated the efficacy of an antigen against the three-host tick *I. scapularis*, based only on its effect against larvae. Trimnell et al. (2005) tested a cement antigen as a vaccine in guinea pigs against *R. sanguineus* and in hamsters and rabbits against *Ixodes ricinus*, however, in all cases the final efficacy was not calculated and only some life cycle parameters were compared using ANOVA. Pérez-Pérez et al. (2010) inoculated dogs with Bm86 antigen (Hebercani, Heber Biotec) to evaluate its efficacy against *R. sanguineus*; nevertheless they only compared some parameters with means comparison using a Student's t-test. Similar analysis has been done previously when *R. sanguineus* gut extract was tested as a vaccine in guinea pigs against this tick (Szabó and Bechara, 1997). The work of Rodríguez-Mallon et al. (2012) was the only known report on vaccine efficacy against a three-host tick which considered the cumulative effect of the product against larvae, nymphs and adult

stages. These authors, however, summarised the effects on recovery and viability of engorged larvae in only one parameter, disregarded the number of engorged nymphs that molt to adults, and used twice the number of detached engorged females in their formula. Thus, the vaccine efficacy was over-estimated. The final formula reported was:

$$E(\%) = 100 * [1 - (VL * RN * RA * VA * OA * FE)]$$

where

VL is the effect of each immunogen on larval viability.
RN is the effect of each immunogen on nymph yield.
RA is the effect of each immunogen on adult yield.
VA is the effect of each immunogen on adult viability.
OA is the effect of each immunogen on oviposition of females.
FE is the effect of each immunogen on fertility of eggs.

Here we propose an alternative formula of vaccine efficacy for three-host ticks, which cumulatively calculates the values of each instar, avoiding an over-estimated result, and calculates the ability of each tick instar to complete its blood meal as well as to molt to the next stage. The ability of adult females to lay eggs and larvae hatchability were also considered, resulting in a final percentage that includes values of larvae, nymphs and adults/weight of mass of eggs of three-host ticks. Thus, we propose to separate the larvae parameter into two and add one parameter for nymphs in relation to the formula cited above. For larvae, we considered separately the effect on recovery, which counts the total number of engorged larvae from the vaccinated group in relation to the control group. For nymphs, we included their viability, in other words, the total engorged nymphs that are able to molt to adults from the vaccinated group compared with the control group.

The formula cited by Rodríguez-Mallon et al. (2012) includes four parameters for adults, but two of those cause an over-estimation of the final value since they calculate values for the same condition. The VA variable calculates the viability of an engorged female to lay eggs by counting how many females within the recovered total have started oviposition. On the other hand, the OA variable shows the same when the average mass weight of eggs per female recovered is calculated. All eggs came from females that had already started oviposition, so when the total mass of eggs was divided by the total number of recovered females, the same parameter that had previously been calculated is included, which was the number of engorged females that had started oviposition. We propose including only three parameters for adults in the formula, one being the parameter that calculates both the effects of the reduction in females able to lay eggs and the average weight of eggs laid by each engorged female. Each value was determined by the ratio between the average values of the vaccinated group and the control group. All cross-linked parameters are multiplied, providing the final percentage of efficacy. The final value is subtracted from one and multiplied by 100, to obtain the overall reduction, as a percentage, caused by the vaccine in tick yield throughout the whole of the tick life cycle. Thus, we can use the effects on both the host and environment to determine the effect of the vaccine on the parasite burden.

The final formula is:

$$E(\%) = 100 * [1 - (RL * VL * RN * VN * RA * OA * FE)]$$

where

E is the vaccine efficacy percentage.
RL is the effect on recovery of engorged larvae. This variable is calculated by the ratio between engorged larvae recovered from

the vaccinated (rlv) group in relation to the control group (rlc). $RL = (rlv/rlc)$.

VL is the effect on the viability of engorged larvae. This variable is calculated based on the ratio of the total number of engorged larvae recovered that molted to nymphs from the vaccinated (vlv) group compared with the control group (vlc). $VL = (vlv/vlc)$.

RN is the effect on recovery of engorged nymphs. This variable is calculated as the ratio between engorged nymphs recovered from the vaccinated (rnv) group in relation to the control group (mc). $RN = (rnv/rnc)$.

VN is the effect on the viability of engorged nymphs. This variable is calculated based on the ratio of the total number of engorged nymphs recovered that molted to adults from the vaccinated (vnv) group compared with the control group (vnc). $VN = (vnv/vnc)$.

RA is the effect on recovery of engorged adults. This variable is calculated as the ratio between engorged adults recovered from the vaccinated (rav) group compared with the control group (rac). $RA = (rav/rac)$.

OA is the effect on oviposition of adult females. This variable is calculated based on the average weight of egg mass laid by engorged adult females recovered from the vaccinated (oav) group compared with the control group (oac). $OA = (oav/oac)$.

FE is the effect on egg fertility. This variable is calculated based on the ratio between the hatchability, as a percentage, of larvae from eggs laid by engorged adults recovered from the vaccinated group (fev) compared with the control group (fec). $FE = (fev/fec)$.

Including all proposed parameters in the new formula, and not only those that are statistically significantly different between treated and control groups, may dilute antagonistic effects of a vaccine or a drug on specific parameters of ticks. However, for those who will use a vaccine against ticks, the described efficacy should include the overall effect on the parasite. Also, additive effects on various parameters throughout the tick life cycle should be considered. In this regard, it is possible to suppose that the sum of small, non-significant negative effects of several of the parameters will result in a final, significant negative effect on the efficacy for tick control. Last but not least, apart from the proposed formula, it is always important to evaluate the effect of a vaccine on specific parameters. Such an approach will be important to better understand the mode of action of the product.

Although it was developed to calculate efficacy under laboratory conditions, it is also possible to use this formula in the field, however, the data for all tick stages would likely be more time-consuming to collect than under laboratory conditions because some developmental stages might not feed on hosts at the same time. Using *Amblyomma cajennense* as an example where the life cycle usually takes 1 year to complete (Guglielmone et al., 1990), the treatment of hosts should be planned to provide protection for at least 1 year and tick collection should aimed to recover all tick stages at the end of the trial, providing the researcher with all of the data that the formula requires. Another scenario that could improve the accuracy of the formula is to use the same ticks from larvae until oviposition of eggs, under laboratory conditions. This way, the real cumulative effects will be preserved, because each tick stage would load the vaccine/substance effect from the previous stage.

In conclusion, it is possible to use this formula under any conditions as the required parameters can be collected and measured. Therefore, we suggest this formula as useful for vaccine evaluation or substance efficacy in three-host ticks.

Acknowledgements

We are grateful to Embrapa Beef Cattle, Brazil, for having supplied the structure, to the Post-Graduate Program in Infectious and Parasitic Diseases of Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil, for making possible the assays that resulted in the formula, to National Council for Cientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Brazil, for financial support.

References

- Almazán, C., Kocan, K.M., Blouin, E.F., De La Fuente, J., 2005. Vaccination with recombinant tick antigens for the control of *Ixodes scapularis* adult infestations. *Vaccine* 23, 5294–5298.
- Almazán, C., Kocan, K.M., Bergman, D.K., Garcia-Garcia, J.C., Blouin, E.F., De La Fuente, J., 2003. Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21, 1492–1501.
- Andreotti, R., 2007. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Exp. Parasitol.* 116, 66–70.
- Anisuzzaman, Islam, M.K., Alim, M.A., Miyoshi, T., Hatta, T., Yamaji, K., Matsumoto, Y., Fujisaki, K., Tsuji, N., 2012. Longistatin in an unconventional serine protease and induces protective immunity against tick infestation. *Mol. Biochem. Parasit.* 182, 45–53.
- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M., de la Fuente, J., 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac against cattle tick. *Vaccine* 15 (4), 414–422.
- Fragoso, H., Rad, P.H., Ortiz, M., Rodríguez, M., Redondo, M., Herrera, L., de la Fuente, J., 1998. Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine* 16, 1990–1992.
- Guglielmone, A.A., Mangold, A.J., Aguirre, D.H., Gaido, A.B., 1990. Ecological aspects of four species of ticks found on cattle in Salta, Northwest Argentina. *Vet. Parasitol.* 35, 93–101.
- Miller, R., Estrada-Peña, A., Almazán, C., Allen, A., Jory, L., Yeater, K., Messenger, M., Ellis, D., Pérez de León, A.A., 2012. Exploring the use of an anti-tick vaccine as a tool for the integrated eradication of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. *Vaccine* 30, 5682–5687.
- Pérez-Pérez, D., Bechara, G.H., Machado, R.Z., Andrade, G.M., Del Vecchio, R.E.M., Pedrosa, M.S., Hernández, M.V., Farnós, O., 2010. Efficacy of the Bm86 antigen against immature instars and adults of the dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 167, 321–326.
- Rodríguez-Mallon, A., Fernández, E., Encinosa, P., Bello, Y., Méndez-Pérez, L., Ruiz, L.C., Pérez, D., González, M., Garay, H., Reyes, O., Méndez, L., Estrada, M.P., 2012. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Vaccine* 30, 1782–1789.
- Szabó, M.P.J., Bechara, G.H., 1997. Immunisation of dogs and guinea pigs against *Rhipicephalus sanguineus* ticks using gut extract. *Vet. Parasitol.* 68, 283–294.
- Trimnell, A.R., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttal, P.A., 2005. A cross-reactive cement antigen is a candidate broad-spectrum tick vaccine. *Vaccine* 23, 4329–4341.
- Wong, J.Y., Opdebeeck, J.P., 1989. Protective efficacy of antigens solubilized from gut membranes of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Immunology* 66, 149–155.

5 DISCUSSÃO

Embora exista no Brasil uma ixodofauna composta por mais de 70 espécies de carrapatos, somente o gênero *Amblyomma* tem implicações relevantes na saúde pública (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; KRAWCZAK et al., 2016; LABRUNA et al., 2016; WOLF et al., 2016; MUÑOZ-LEAL et al., 2017). Diante das conclusões apresentadas neste trabalho, muitos destes podem não estar recebendo uma devida atenção quanto à sua capacidade vetorial. Dessa forma, podemos destacar algumas espécies que picam ou até mesmo parasitam, mesmo que acidentalmente seres humanos, e que não recebem devida importância em saúde pública: *A. coelebs* e *A. oblongoguttatum*. Ambas possuem relatos de infecção por *Rickettsia* do GFM (LABRUNA et al., 2004b). Ademais, como mencionado, também possuem capacidade de picar ou até mesmo completar o repasto sanguíneo em seres humanos com facilidade, dependendo do ínstar. Isto cria uma situação favorável à transmissão dessas bactérias (LABRUNA et al., 2000; GUGLIELMONE et al., 2006).

Para a afirmação de que uma espécie de carrapato seja comprovadamente vetor competente, deve-se proceder com estudos de infecção em hospedeiros experimentais, a fim de elucidar se esses ixodídeos são hospedeiros competentes para manter formas infectantes da bactéria em seu ciclo biológico, seja de forma transovariana, ou transtadial, e ser capaz de transmiti-la ao hospedeiro (SOARES et al., 2012; UENO et al., 2016).

Não menos importante, estudos sobre a biologia dos vetores são fundamentais, uma vez que estratégias de controle tanto do carrapato e consequentemente, do agente transmitido, dependem de medidas que interferem em algum momento do ciclo de cada um, ou de ambos. Obter ciência sobre a especificidade de hospedeiros dos parasitas é útil para auxiliar a elencar medidas profiláticas envolvendo os animais reservatórios. O estudo sobre condições ideais de manutenção de determinada espécie pode auxiliar em programas de controle direcionados a ambientes favoráveis à dispersão dos parasitas, e na época adequada.

Amblyomma coelebs é um carrapato que possui predileção a parasitar antas (*Tapirus terrestris*), mas podendo parasitar outros mamíferos silvestres e domésticos, e inclusive seres humanos (SOARES et al., 2015; LOPES et al., 2016; WITTER et al., 2016). Sabe-se também da ampla distribuição geográfica desta espécie, contudo pouco se sabe sobre seu papel como vetor e dispersor de *Rickettsia* spp. do GFM no Brasil, contudo já foi descrito a infecção deste com *R. amblyommatis*, cuja patogenicidade é ainda debatida (LABRUNA et al., 2004b). Aqui mostramos que todos os instares desta espécie são capazes de realizar repasto em um lagomorfo (coelho), embora ainda não seja possível concluir se estes animais são capazes por si só de manterem populações deste ixodídeo em condições naturais. Aqui sugerimos que o *A. coelebs* seja um carrapato de baixa especificidade a hospedeiros, sobretudo em instares imaturos, tornando-o um vetor em potencial. Mais estudos necessitam ser conduzidos a fim de elucidar aspectos como: relação do ciclo de vida com a sazonalidade, hospedeiros competentes em realizar sua dispersão e multiplicação; capacidade de manter e transmitir cepas de *Rickettsia* spp. do GFM em fases de vida livre e parasitária.

Bem como o *A. coelebs*, o *A. oblongoguttatum* não é ainda comprovado como vetor competente de riquetsioses. Este trabalho demonstrou que esta espécie se inclui no rol de ixodídeos com relato de infecção por uma dessas bactérias, quando foi confirmada a presença de *R. amblyommatis* em um exemplar macho no município de Pimenta Bueno. É uma espécie que possui um amplo espectro de especificidade a hospedeiros (silvestres e domésticos), tanto em instares imaturos quanto em adultos, e é capaz de picar seres humanos (GUGLIELMONE et al., 2006).

Sabe-se que uma ampla gama de hospedeiros, principalmente roedores, são adequados ao repasto completo de instares imaturos, e que cães são capazes de permitir o repasto e reprodução da fase adulta (MARTINS et al., 2017). Coelhos em condições laboratoriais convencionais também são capazes de sustentar uma colônia desta espécie por algumas gerações (dados não publicados). Mais estudos são necessários para avaliar sua capacidade de manter uma cepa de *Rickettsia* spp. do

GFM em seu organismo, transmissão entre seus descendentes (transovariana e transestadial) e outros hospedeiros.

A ixodofauna associada à *Rickettsia* spp. do GFM é bem caracterizada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, bem como a capacidade de algumas espécies de transmitirem-nas a seres humanos (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013). Na região da Amazônia, apenas se sabe da presença e dispersão de algumas espécies de carrapatos, bem como hospedeiros soropositivos para *Rickettsia* spp. do GFM e carrapatos infectados com espécies com potencial patogênico ainda não totalmente esclarecido (LABRUNA et al., 2007; MARTINS et al., 2014). Entretanto, alguns casos de RMSF/FMB (ou outras riquetsioses) têm sido reportados na região (OLIVEIRA et al., 2016).

Apenas as espécies *A. cajennense* s.l. e *A. coelebs* foram encontrados infectados por *Rickettsia* do GFM na Amazônia do estado de Rondônia (LABRUNA et al., 2004b). Este estudo aqui reporta infecção em *A. cajennense* s.s. e confirma pela primeira vez infectando a espécie *A. oblongoguttatum*. Vale ressaltar que nessa região são encontradas duas espécies do complexo *A. cajennense*, tendo o *A. sculptum* como a outra espécie - esta a mais conhecida como vetor de *R. rickettsii* no Brasil (GUEDES et al., 2005; MARTINS et al., 2016). Mais estudos precisam ser conduzidos para confirmar a presença de agentes patogênicos em outras espécies de carrapatos conhecidas como vetores em outras regiões do país, como o *A. ovale* (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013), entre outros que sabidamente picam seres humanos e que são abundantes na região, como *A. naponense* e *A. sculpturatum* (dados não publicados). Investigações em animais reservatórios naturais também são de suma importância.

Como inexitem vacinas contra riquetsioses, o método mais efetivo e largamente empregado no controle destas doenças é a proteção contra a picada do vetor e o controle do mesmo em hospedeiros domésticos e silvestres (MINNIEAR; BUCKINGHAM, 2009). O método para controle de carrapatos mais amplamente empregado ao redor do mundo é baseado na aplicação de acaricidas químicos. Isto

gera uma discussão ao redor do assunto poluição ambiental, e de importância em saúde pública, pois gera resíduos em produtos de origem animal. Embora tenha sido o método mais eficaz, carrapatos vem apresentando resistência a alguns princípios largamente utilizados (CLEMENTE et al., 2010; CUNHA et al., 2007; FREITAS; ZAPATA; FERNANDES, 2011). Para driblar este gargalo, novas moléculas são constantemente desenvolvidas. Os usos de medicamentos fitoterápicos ainda necessitam de uma melhor abordagem com relação à sua empregabilidade e custo-benefício (GARCIA et al., 2012).

Tratando-se de carrapatos de importância em saúde pública, o desafio de controle é ainda maior, pois estes se encontram amplamente distribuídos em todos os biomas brasileiros, e são mantidos pela rica fauna de hospedeiros existente neles (SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; MARTINS et al., 2016). Como é impraticável o controle químico de carrapatos em hospedeiros silvestres e no ambiente, e uma vacina contra riquetsioses em seres humanos ou contra carrapatos em animais domésticos e silvestres ainda não são disponíveis para a rotina, aqui foi proposto um modelo alternativo para ser empregado na agenda de controle dos vetores ixodídeos de importância em saúde pública.

A estratégia de controle imunológico de carrapatos já foi empregada visando o controle do carrapato-do-boi, o *R. microplus*. Pesquisas nessa área são dedicadas quase exclusivamente a este carrapato (GARCIA-GARCIA et al., 2000; GUERRERO et al., 2014; MARUYAMA et al., 2017). Um gargalo encontrado neste método envolve a variabilidade genética em cepas da mesma espécie ao redor do mundo, o que dificulta a escolha de um antígeno estável que garantisse a proteção de qualquer bovino a qualquer cepa deste ixodídeo (ANDREOTTI et al., 2008). Ferramentas de bioinformática vêm surgindo com o passar dos anos, e estão auxiliando no processo de seleção de antígenos candidatos a vacinas contra carrapatos (MARITZ-OLIVIER et al., 2012; PORTER et al., 2015; MARUYAMA et al., 2017). Antígenos de carrapatos desenvolvidos por meio da bioinformática mostraram resultados promissores contra o *R. microplus* e *R. sanguineus* (RODRIGUES-MALLON et al., 2012; AGUIRRE et al., 2016).

Neste presente estudo, foi empregado pela primeira vez uma estratégia de seleção de antígenos por meio de imunoinformática, visando o controle imunológico do *A. cajennense* s.l. em hospedeiros - silvestres (capivaras, gambás) e domésticos (cães, cavalos). Entretanto, a investigação não pôde ser concluída com o que se diz respeito ao peptídeo utilizado (AcSP1), com o carreador e antígenos escolhidos para os imunoenaios. Assim, mais investimentos e estudos devem ser conduzidos nesta área, com a finalidade de seleção de uma maior quantidade antígenos conservados entre espécies de carrapatos, carreadores moleculares, adjuvantes, com intuito de desenvolvimento de uma vacina eficaz e de bom custo-benefício para ser empregado em ambas cadeias de produtos de origem animal e saúde pública.

Para experimentos de ensaios com antígenos vacinas e substâncias sistêmicas contra carrapatos de importância em saúde pública, que são heteroxenos em sua maioria (SANCHES et al., 2008; MARTINS et al., 2012, 2014, 2016, 2017), é necessária uma metodologia criteriosa e padronizada para avaliar a eficácia do que se está testando. Calcular a eficácia vacinal é uma atividade intrínseca em experimentos que testam antígenos contra carrapatos (CUNHA et al., 2013). Esta é uma das maneiras, provavelmente a principal, de se mensurar o efeito de uma determinada substância de efeito sistêmico nas fases de vida de uma espécie de carrapato.

Historicamente, fórmulas foram aplicadas direcionadas ao carrapato-do-boi, *R. microplus*, até então o único de interesse em estudos com vacinas (CUNHA et al., 2013). Esse carrapato, entre outras poucas espécies, são monoxenos, o que significa que estes sobem e parasitam o hospedeiro na fase de larvas e se desprendem somente na fase adulta, realizando as ecdises no hospedeiro. Este fato dificulta a avaliação de vacinas e agentes sistêmicos em todas suas fases de vida.

Durante as revisões bibliográficas para os estudos aqui realizados, foi notado que a literatura carece de informações precisas sobre a avaliação de eficácia vacinal em carrapatos heteroxenos. Diante disso, foi proposta e publicada uma fórmula para padronizar um cálculo de influência de vacinas e substâncias sistêmicas nos

parâmetros biológicos de ixodídeos heteroxenos (AGUIRRE et al., 2015). Anteriormente, este cálculo foi realizado de forma empírica, baseando-se na fórmula aplicada ao *R. microplus*, e de forma não padronizada, o que provavelmente superestimou ou mascarou o efeito vacinal em determinados casos (RODRIGUES-MALLON et al., 2012).

Com esta fórmula padronizada, é possível avaliar efeitos sistêmicos não somente de vacinas, mas também de substâncias sistêmicas (aquelas que o carrapato necessita ingerir durante o repasto sanguíneo para serem eficazes), no ciclo de vida desses parasitas. Além do emprego dessa fórmula em testes sob condições controladas, é possível aplicá-la a campo, desde que todos os parâmetros biológicos do carrapato estudado tenham condições de ser mensurados.

É sugerido, portanto, o emprego deste cálculo em qualquer estudo sob qualquer condição, que seja possível avaliar a efetividade de alguma vacina, ou substância sistêmica, contra carrapatos de três hospedeiros. Para tal, também é recomendado que sejam incluídos todos os ínstares de um carrapato heteroxeno nestes estudos, a fim de elucidar o valor real do impacto negativo (ou até positivo) no ciclo de vida completo do parasita.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi elucidado pela primeira vez os parâmetros biológicos do *Amblyomma coelebs*, sob condições naturais e laboratoriais, e a capacidade de seu estágio ninfal em completar o repasto em seres humanos.

O *Amblyomma oblongoguttatum* deve ser incluído no rol de potenciais vetores de riquetsioses na Amazônia, por este trabalho reportar pela primeira vez um espécime infectado com *Rickettsia amblyommatis*, pertencente ao GFM. Ademais, são mostrados primeiros relatos de *Rickettsia* do GFM em municípios do estado de Rondônia situados em área de ecótono Amazônia-Cerrado.

Foi proposto aqui, pela primeira vez, um modelo de controle por vacina do principal vetor da FMB, o *Amblyomma cajennense* s.l., utilizando a imunoinformática para seleção de peptídeos candidatos.

Por fim, foi concluída a padronização de um cálculo de eficácia vacinal e de substâncias sistêmicas para carrapatos de três hospedeiro, fornecendo uma ferramenta para estudos posteriores.

7 REFERÊNCIAS

- ACOSTA J, et al. Brote de rickettsiosis en Necoclí, Antioquia, febrero marzo de 2006. **Informe quincenal Epidemiológico Nacional**, v. 11, n. 12, p. 177–186, 2006.
- AGUIRRE, A. A. R. et al. Design of the ATAQ peptide and its evaluation as an immunogen to develop a *Rhipicephalus* vaccine. **Veterinary Parasitology**, v. 221, p. 30-38, 2016.
- AGUIRRE, A. A. R. et al. Formula to evaluate efficacy of vaccines and systemic substances against three-host ticks. **International Journal for Parasitology**, v. 45, p. 357-359, 2015.
- ALMEIDA, R. F. C. et al. Ixodid fauna and zoonotic agents in ticks from dogs: First report of *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 60, n. 1, p. 63–72, 2013.
- ALVES, A.; MELO, A. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in Equids and Molecular Detection of 'Candidatus *Rickettsia amblyommii*' in *Amblyomma cajennense* Sensu Lato Ticks from the. **Journal of Medical Entomology**, n. Labruna 2009, p. 1242–1247, 2014.
- ANDREOTTI, R. et al. COMPARISON OF PREDICTED BINDERS IN *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* INTESTINE PROTEIN VARIANTS BM86 CAMPO GRANDE STRAIN, BM86 AND BM95*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 17, n. 1, p. 93-98, 2008.
- BACCI, M. R.; NAMURA, J. J. Association between sepsis and Rocky Mountain spotted fever. **BMJ case reports**, v. 2012, 2012.
- BARBIERI, J. M. et al. Altitudinal Assessment of *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), Vectors of Spotted Fever Group Rickettsiosis in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 5, p. 1170–1174, 2015.
- BARRETT, A.; LITTLE, S. E.; SHAW, E. “*Rickettsia amblyommii*” and *R. montanensis* Infection in Dogs Following Natural Exposure to Ticks. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 1, p. 20–25, 2014.
- BATISTA, F. G. et al. Serological survey of *Rickettsia* sp. in horses and dogs in a non-endemic area in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 19, n. 4, p. 205–209, 2010.

BAYLISS, D. B. et al. Prevalence of *Rickettsia* species antibodies and *Rickettsia* species DNA in the blood of cats with and without fever. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 11, n. 4, p. 266–270, 2009.

BEELER, E. et al. A focus of dogs and *Rickettsia massiliae*-infected *Rhipicephalus sanguineus* in California. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 244–249, 2011.

BELL, E. J.; PICKENS, E. G. A toxic substance associated with the *Rickettsias* of the Spotted Fever Group. **Journal of Immunology**, v. 70, n. 5, p. 461-472.

BERMÚDEZ, S. E. et al. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in Eastern Panama. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 4, p. 856–861, 2009.

BERMÚDEZ, S. E. et al. Distribution of Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Hard Ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments. **EcoHealth**, v. 13, n. 2, p. 274–284, 2016.

BLANTON, L. S. et al. “*Rickettsia amblyommii*” induces cross protection against lethal Rocky Mountain spotted fever in a guinea pig model. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 14, n. 8, p. 557–62, 2014.

BOTELHO-NEVERS, E.; RAOULT, D. Host, pathogen and treatment-related prognostic factors in rickettsioses. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 30, n. 10, p. 1139–1150, 2011.

BRITES-NETO, J. et al. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in an area endemic for Brazilian spotted fever. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary**, v. 22, n. 3, p. 367–372, 2013.

BRITES-NETO, J. et al. Evaluation of an association of alpha-cypermethrin and flufenoxuron for tick control in an area at risk of Brazilian spotted fever. **Veterinary Parasitology**, v. 238, p. 1–4, 2017.

BURGDORFER, W. et al. A new spotted fever group rickettsia from the lone star tick *Amblyomma americanum*. **Rickettsiae and Rickettsial Diseases**, Academic Press, New York, p. 595-602, 1981.

BURGDORFER, W.; FRIEDHOFF, K. T.; LANCASTER JR, J. L. Natural history of tick-borne spotted fever in USA. **Bull Org mond Santé Wld Hlth**, v. 35, p. 149-153, 1966.

CARVALHO-COSTA, T. M. et al. Immunosuppressive effects of *Amblyomma cajennense* tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 22, 2015.

CLARK, T. R. et al. Comparative genome sequencing of *Rickettsia rickettsii* strains that differ in virulence. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 4, p. 1568–1576, 2015.

CLEMENTE, M. A. et al. Acaricidal activity of the essential oils from *Eucalyptus citriodora* and *Cymbopogon nardus* on larvae of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) and *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 107, n. 4, p. 987–992, 2010.

COELHO, M. G. et al. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 3, p. 275–282, 2016.

COSTA, L. S. et al. Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille 1806) (Acari: Ixodidae). **Parasites & Vectors**, v. 4, n. 1, p. 222, 2011.

COUTO, D. V. et al. Brazilian spotted fever: The importance of dermatological signs for early diagnosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 2, p. 248–250, 2015.

CUNHA, A. P. et al. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense* em equinos, Minas Gerais, Brasil - Parte I. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 16, n. 4, p. 221–228, 2007.

CUNHA, R. C. et al. Calculation of the efficacy of vaccines against tick infestations on cattle†. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária = Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 571–578, 2013.

D'AURIA, S. R. N. et al. Serologic survey for rickettsiosis in bats from Sao Paulo City, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases VO - 10**, v. 9, n. 5, p. 459, 2010.

DELISLE, J. et al. Human Infections by Multiple Spotted Fever Group *Rickettsiae* in Tennessee. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 94, n. 6, p. 1212–1217, 2016.

DEMMA, L. J. et al. Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 587–594, 2005.

DREXLER, N. et al. Community-based control of the brown dog tick in a region with high rates of rocky mountain spotted fever, 2012–2013. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. 1–18, 2014.

DUPONT, H. L. et al. Rocky mountain spotted fever: A comparative study of the active immunity induced by inactivated and viable pathogenic *rickettsia rickettsii*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 128, n. 3, p. 340–344, 1973.

ELLISON, D. W. et al. Limited transcriptional responses of rickettsia rickettsii exposed to environmental stimuli. **PLoS ONE**, v. 4, n. 5, 2009.

EREMEEVA, M. E. et al. Rickettsia rickettsii in Rhipicephalus Ticks, Mexicali, Mexico. **Journal of Medical Entomology**, v. 48, n. 2, p. 418–421, 2011.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A. et al. **Rickettsia rickettsii in Amblyomma patinoi ticks, Colombia** *Emerging infectious diseases*, 2015.

FIELD-CORTAZARES, J. et al. Seroprevalence and risk factors associated with rickettsiosis (Rickettsia rickettsii) in humans from Ensenada, Baja California, Mexico. *Seroprevalencia y factores de riesgo asociados a rickettsiosis (Rickettsia rickettsii) en humanos de Ensenada, Baja Cali*. **Gaceta Medica de Mexico**, v. 151, n. 1, p. 42–46, 2015.

FORTES, F. S. et al. Seroprevalence of Rickettsia bellii and Rickettsia felis in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 19, n. 4, p. 222–227, 2010.

FOURNIER, P.-E. et al. Analysis of the Rickettsia africae genome reveals that virulence acquisition in Rickettsia species may be explained by genome reduction. **BMC Genomics**, v. 10, n. 1, p. 166, 2009.

FREITAS, E. P. S.; ZAPATA, M. T. A. G.; DE FERNANDES, F. F. Monitoring of resistance or susceptibility of adults and larvae of Amblyomma cajennense (Acari: Ixodidae) to synthetic acaricides in Goiás, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 53, n. 2, p. 189–202, 2011.

FREITAS, M. C. D. DE O. et al. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 19, n. 2, p. 130–131, 2010.

GALLETTI, M. F. B. M. et al. Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of Rickettsia rickettsii Infecting Its Tick Vector. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–12, 2013.

GALLETTI, M. F. B. M. et al. Virulence genes of Rickettsia rickettsii are differentially modulated by either temperature upshift or blood-feeding in tick midgut and salivary glands. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 331, 2016.

GARCIA, M. V. et al. Chemical identification of Tagetes minuta Linnaeus (Asteraceae) essential oil and its acaricidal effect on ticks. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 21, n. 4, p. 405–411, 2012.

GARCIA, M. V. et al. Successful feeding of *Amblyomma coelebs* (Acari: Ixodidae) nymphs on humans in Brazil: Skin reactions to parasitism. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 2, p. 117–119, 2015.

GARCIA-GARCIA, J. C. et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, p. 2275-2287, 2000.

GERWIN, B.; READ, R. W.; TAYLOR, W. Rickettsial retinitis: acute unilateral vision loss with cystoid macular edema and stellate maculopathy. **Retinal cases & brief reports**, v. 5, n. 3, p. 219–222, 2011.

GONG, B. et al. Rickettsiae induce microvascular hyperpermeability via phosphorylation of ve-cadherins: Evidence from atomic force microscopy and biochemical studies. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, 2012.

GONG, W. et al. Enhanced protection against *Rickettsia rickettsii* infection in C3H/HeN mice by immunization with a combination of a recombinant adhesin rAdr2 and a protein fragment rOmpB-4 derived from outer membrane protein B. **Vaccine**, v. 33, n. 8, p. 985–992, 2015a.

GONG, W. et al. *Rickettsia rickettsii* outer membrane protein YbgF induces protective immunity in C3H/HeN mice. **Human Vaccines and Immunotherapeutics**, v. 11, n. 3, p. 642–649, 2015b.

GONG, W. et al. Surface protein Adr2 of *Rickettsia rickettsii* induced protective immunity against Rocky Mountain spotted fever in C3H/HeN mice. **Vaccine**, v. 32, n. 18, p. 2027–2033, 2014.

GUEDES, E. et al. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841–845, 2005.

GUEDES, E. et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária = Brazilian journal of veterinary parasitology**, v. 20, n. 4, p. 308–11, 2011.

GUERRERO, F. D. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasites and Vectors**, v. 7, p. 475, 2014.

GUDEX, N.; PEITSCH, M. C. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. **Electrophoresis**, v. 18, n. 15, p. 2714–2723, 1997.

GUGLIELMONE, A. A. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83–100, 2006.

GUGLIELMONE, A.A.; ROBBINS, R.G.; APANASKEVICH, D.A.; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G.; SHAO, RENFU, S.; BARKER, S. The argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1-28, 2010.

HIDALGO, M. et al. Outbreak of Rocky Mountain spotted fever in Cordoba, Colombia. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 1, p. 117–118, 2011.

HIDALGO, M. et al. Short report: A survey of antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Ehrlichia chafeensis* in domestic animals from a rural area of Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 80, n. 6, p. 1029–1030, 2009.

HORTA, M. C. et al. Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 109–118, 2009.

HUN, L.; CORTÉS, X.; TAYLOR, L. Molecular characterization of *Rickettsia rickettsii* isolated from human clinical samples and from the rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* collected at different geographic zones in Costa Rica. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 6, p. 899–902, 2008.

IZZARD, L. et al. Serological prevalence study of exposure of cats and dogs in Launceston, Tasmania, Australia to spotted fever group rickettsiae. **Australian Veterinary Journal**, v. 88, n. 1–2, p. 29–31, 2010.

KATO, C. Y. et al. Assessment of real-time PCR assay for detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in banked clinical samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 1, p. 314–417, 2013.

KOWALCZEWSKA, M. et al. Protein candidates for the serodiagnosis of rickettsioses. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 64, n. 1, p. 130–133, 2012.

KRAWCZAK, F. S. et al. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of wild mammals in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 52, n. 1, p. 28–37, 2015.

KRAWCZAK, F. S. et al. Case report: *Rickettsia* sp. strain atlantic rainforest infection in a patient from a spotted fever-endemic area in southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551–553, 2016a.

KRAWCZAK, F. S. et al. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 70, n. 2, p. 219–229, 2016b.

KRAWCZAK, F. S. et al. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 7, 2014.

KUO, C.-C. et al. High Prevalence of *Rickettsia* spp. Infections in Small Mammals in Taiwan. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 1, p. 13–20, 2015.

KUSHAWAHA, A. et al. Hitch-hiker taken for a ride: an unusual cause of myocarditis, septic shock and adult respiratory distress syndrome. **BMJ Case Reports**, v. 2013, 2013.

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

LABRUNA, M. B. et al. A case of gynandromorphism in *Amblyomma oblongoguttatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 37, n. 5, p. 777–779, 2000.

LABRUNA, M. B. et al. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 511, 2016.

LABRUNA, M. B. et al. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of medical entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156–1159, 2008.

LABRUNA, M. B. et al. Controle estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 195–200, 2004a.

LABRUNA, M. B. et al. Genetic identification of Rickettsial isolates from fatal cases of Brazilian spotted fever and comparison with *Rickettsia rickettsii* isolates from the American continents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3788–3791, 2014.

LABRUNA, M. B. et al. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249–255, 2007.

LABRUNA, M. B. et al. *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, 2004b.

LAMAS, C. et al. Characterization of rickettsia rickettsii in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **The Brazilian journal of infectious diseases: an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 149–151, 2008.

LEMOS, E. R. S. et al. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: Serological survey of dogs and horses in an endemic area in the state of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 1996.

LEVIN, M. L.; SCHUMACHER, L. B. M. Manual for maintenance of multi-host ixodid ticks in the laboratory. **Experimental and Applied Acarology**, v. 70, n. 3, p. 343–367, 2016.

LOPES, M. G. et al. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 62, 2016.

LUZ, H. R. et al. Infection of *Amblyomma ovale* with *Rickettsia* species Atlantic rainforest in Serra do Mar, São Paulo State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1265–1267, 2016.

MARTINS, L. A. et al. The Distinct Transcriptional Response of the Midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* Ticks to *Rickettsia rickettsii* Correlates to Their Differences in Susceptibility to Infection. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 7, n. April, 2017.

MARTINS, T. F. et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). **Parasites and Vectors**, v. 9, p. 186, 2016.

MARTINS, T. F. et al. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 62, n. 1, p. 121–128, 2014.

MARTINS, T. F.; LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. Life-cycle of *Amblyomma oblongoguttatum* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 71, n. 4, p. 415-424, 2017.

MARTINS, T. F.; MOURA, M. M.; LABRUNA, M. B. Life-cycle and host preference of *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 56, p. 151-158, 2012.

MARUYAMA, S. R. et al. Mining a differential sialotranscriptome of *Rhipicephalus microplus* guides antigen discovery to formulate a vaccine that reduces tick infestations. **Parasites and Vectors**, v. 10, p. 206, 2017.

MASTROPAOLO, M. et al. High prevalence of “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” in *Amblyomma* ticks from a Spotted Fever Endemic Region in North Argentina. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 46, p. 73–76, 2016.

MCQUISTON, J. H. et al. Evidence of Exposure to Spotted Fever Group Rickettsiae among Arizona Dogs Outside a Previously Documented Outbreak Area. **Zoonoses and Public Health**, v. 58, n. 2, p. 85–92, 2011.

MELO, A. L. T. et al. Seroprevalence and risk factors to Ehrlichia spp. and Rickettsia spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 213–218, 2011.

MENTZ, M. B. et al. Rhipicephalus sanguineus (ACARI: IXODIDAE) BITING A HUMAN BEING IN PORTOALEGRE CITY, RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 35, 2016.

Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, outubro 2017.

MINNIEAR, T. D.; BUCKINGHAM, S. C. Managing Rocky Mountain spotted fever. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 7, n. 9, p. 1131–1137, 2009.

MONCAYO, A. C. et al. Absence of Rickettsia rickettsii and occurrence of other spotted fever group rickettsiae in ticks from Tennessee. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 3, p. 653–657, 2010.

MONJE, L. D. et al. Molecular Detection of the Human Pathogenic Rickettsia sp. Strain Atlantic Rainforest in Amblyomma dubitatum Ticks from Argentina. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 15, n. 2, p. 167–9, 2015.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F.; PRADO, A. Pesquisas epidemiológicas sobre o Typho Extantemático de São Paulo. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 6, p. 139-173, 1931.

MONTENEGRO, D. C. et al. Spotted fever: Epidemiology and vector-rickettsia-host relationship in Rio de Janeiro state. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAR, p. 1–10, 2017.

MOREIRA-SOTO, A. et al. Exposure of dogs to spotted fever group rickettsiae in urban sites associated with human rickettsioses in Costa Rica. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 748–753, 2016.

MUÑOZ-LEAL, S. et al. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: Ornithodoros) associated with stream-breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: Cycloramphus) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 5, p. 682–692, 2017.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) with the description of three new species, Amblyomma tonelliae n.

sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 252–276, 2014.

NESBIT, R. M.; HORTON, J. M.; LITTMANN, L. **Myocarditis, pericarditis, and cardiac tamponade associated with Rocky Mountain spotted fever** *Journal of the American College of Cardiology*, 2011.

NICKERSON, A.; MARIK, P. E. Life-threatening ANCA-positive vasculitis associated with rickettsial infection. **BMJ case reports**, v. 2012, p. 39–41, 2012.

OGRZEWALSKA, M. et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1283–1300, 2012.

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

OLIVEIRA, K. A. et al. *Amblyomma imitator* ticks as vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1282–1284, 2010.

OLIVEIRA, S. V. et al. Predictive Factors for Fatal Tick-Borne Spotted Fever in Brazil. **Zoonoses and Public Health**, v. 64, n. 7, p. e44–e50, 2017.

OTEO, J. A. et al. [Latinamerican guidelines of RIICER for diagnosis of tick-borne rickettsioses]. **Revista chilena de infectología: órgano oficial de la Sociedad Chilena de Infectología**, v. 31, n. 1, p. 54–65, 2014.

PACHECO, R. C. et al. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, n. 2, p. 148–155, 2011.

PADDOCK, C. D. et al. Phylogeography of *rickettsia rickettsii* genotypes associated with fatal rocky mountain spotted fever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, n. 3, p. 589–597, 2014.

PAROLA, P. et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 657–702, 2013.

PAROLA, P. et al. Warmer weather linked to tick attack and emergence of severe Rickettsioses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 11, p. 1–8, 2008.

PAROLA, P.; LABRUNA, M. B.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses in America: Unanswered questions and emerging diseases. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 1, p. 40–50, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: Emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719–756, 2005.

PHILLIP, R. N. et al. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 1961-1968, 1978.

PINHEIRO, V. R. E. Avaliação do efeito carrapaticida de alguns piretróides sintéticos sobre o carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (ACARINA: IXODIDAE). Tese apresentada ao curso de pós-graduação em medicina veterinária – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 1987.

PIRANDA, E. M. et al. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 696–701, 2008.

PIRANDA, E. M. et al. Experimental Infection of *Rhipicephalus sanguineus* Ticks with the Bacterium *Rickettsia rickettsii*, Using Experimentally Infected Dogs. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 1, p. 29–36, 2011.

PIZA, J.T.; MEYER, J.R.; GOMES, L.S. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o tifo exanthematico de São Paulo. **São Paulo: Soc Impres Paulista**, 1932.

POLO, G. et al. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 6, p. 1–12, 2017.

PRADO, I. C. et al. Development of an electrochemical immunosensor for the diagnostic testing of spotted fever using synthetic peptides. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 100, p. 115–121, 2018.

RAVISH, M. E. et al. A 6-year-old girl with fever, rash, and increased intracranial pressure. **Journal of Emergency Medicine**, v. 45, n. 2, p. 186–189, 2013.

REN, V.; HSU, S. **Why sulfonamides are contraindicated in Rocky Mountain spotted fever** *Dermatology Online Journal*, 2014.

RICHARDS, A. L. Rickettsial vaccines: the old and the new. **Expert Review of Vaccines**, v. 3, n. 5, p. 541–555, 2004.

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Mountain spotted fever as shown by recent investigations. **Medical Records**, v. 16, p. 843-855, 1909.

RICKETTS, H. T. The transmission of Rocky Mountain Spotted Fever by the bite of the wood-tick (*Dermacentor occidentalis*). **Journal of American Medical Association**, v. xlvii, p. 358, 1906.

RILEY, S. P. et al. Failure of a heterologous recombinant Sca5/OmpB protein-based vaccine to elicit effective protective immunity against *Rickettsia rickettsii* infections in C3H/HeN mice. **Pathogens and disease**, v. 73, n. 9, p. ftv101, 2015.

RIVAS, J. J. et al. Pathogenic potential of a Costa Rican strain of “*Candidatus Rickettsia amblyommii*” in guinea pigs (*Cavia porcellus*) and protective immunity against *Rickettsia rickettsii*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 6, p. 805–811, 2015.

RODRIGUES, D. S. et al. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on Some Laboratory Hosts in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 853-856, 2002.

RODRÍGUEZ-MALLON, A. et al. A novel tick antigen shows high vaccine efficacy against the dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Vaccine**, v. 30, p. 1782-1789, 2012.

ROZENTAL, T. et al. A cluster of *Rickettsia rickettsii* infection at an animal shelter in an urban area of Brazil. **Epidemiology and Infection**, v. 143, n. 11, p. 2446–2450, 2015.

RYDKINA, E. et al. Infection of human endothelial cells with spotted fever group rickettsiae stimulates cyclooxygenase 2 expression and release of vasoactive prostaglandins. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 9, p. 5067–5074, 2006.

RYDKINA, E. et al. *Rickettsia rickettsii* Infection of Cultured Human Endothelial Cells Induces Heme Oxygenase 1 Expression. **Society**, v. 70, n. 8, p. 4045–4052, 2002.

RYDKINA, E. et al. *Rickettsia rickettsii* infection of human pulmonary microvascular endothelial cells: Modulation of cyclooxygenase-2 expression. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, n. SUPPL. 2, p. 300–302, 2009.

RYDKINA, E.; SILVERMAN, D. J.; SAHNI, S. K. Activation of p38 stress-activated protein kinase during *Rickettsia rickettsii* infection of human endothelial cells: Role in the induction of chemokine response. **Cellular Microbiology**, v. 7, n. 10, p. 1519–1530, 2005.

SAITO, T. B. et al. Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102–108, 2008.

SAKAI, R. K. et al. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 6, p. 917–923, 2014.

SANCHES, G. S. et al. Biological aspects of *Amblyomma Brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 44, p. 43-48, 2008.

SARAIVA, D. G. et al. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1504–1510, 2014.

SARAIVA, D. G. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 2, p. 159–166, 2012.

SAYLER, K. A. et al. Cultivation of *Rickettsia amblyommii* in tick cells, prevalence in Florida lone star ticks (*Amblyomma americanum*). **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 270, 2014.

SCINACHI, C. A. et al. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**, v. 166, p. 225–233, 2017.

SILVA, A. B. et al. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latreille 1806), in high altitude atlantic forest fragments, Ceara State, Brazil. **Acta Tropica**, v. 173, p. 30–33, 2017.

SOARES, H. S. et al. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. **Experimental and Applied Acarology**, v. 65, n. 1, p. 125–140, 2015.

SOARES, J. F. et al. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139–151, 2012.

SOUZA, C. E. et al. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 1–2, p. 116–121, 2009.

SOUZA, C. E. et al. High seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in equines suggests risk of human infection in silent areas for the Brazilian spotted fever. **PLoS ONE**, v. 11, n. 4, p. 11–19, 2016.

SPENCER, R. R.; PARKER, R. R. Rocky Mountain Spotted Fever: Vaccination of Monkeys and Man. **Association of Schools of Public Health**, v. 40, n. 41, p. 2159-2167, 1925.

SPORN, L. A. et al. Rickettsia rickettsii infection of cultured human endothelial cells induces NF- κ B activation. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 7, p. 2786–2791, 1997.

STROMDAHL, E. Y. et al. Infrequency of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor variabilis* Removed from Humans, with Comments on the Role of Other Human-Biting Ticks Associated with Spotted Fever Group Rickettsiae in the United States. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 969–977, 2011.

TAMEKUNI, K. et al. Serosurvey of antibodies against spotted fever group Rickettsia spp. in horse farms in Northern Parana, Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary**, v. 19, n. 4, p. 259–261, 2010.

TOMASSONE, L. et al. Rickettsia infection in dogs and Rickettsia parkeri in Amblyomma tigrinum ticks, Cochabamba Department, Bolivia. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 10, n. 10, p. 953–958, 2010.

TZIANABOS, T.; ANDERSON, B. E.; MCDADE, J. E. **Detection of Rickettsia rickettsii DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology** *Journal of Clinical Microbiology*, 1989.

UCHIYAMA, T.; KAWANO, H.; KUSUHARA, Y. The major outer membrane protein rOmpB of spotted fever group rickettsiae functions in the rickettsial adherence to and invasion of Vero cells. **Microbes and Infection**, v. 8, n. 3, p. 801–809, 2006.

UENO, T. E. H. et al. Experimental infection of horses with Rickettsia rickettsii. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 499, 2016.

VIANNA, M. C. B. et al. Rickettsial spotted fever in Capoeira village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 5, p. 297–301, 2008.

VIEIRA, A. M. L. et al. SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS – SUCEN SÃO PAULO. **Manual de vigilância acarológica** – Estado de São Paulo, Brasil, 2002.

WALKER, D. H. The realities of biodefense vaccines against Rickettsia. **Vaccine**, v. 27, n. SUPPL. 4, p. 52–55, 2009.

WALKER, D. H.; VALBUENA, G. A; OLANO, J. P. Pathogenic mechanisms of diseases caused by Rickettsia. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 1–11, 2003.

WECK, B. et al. Spotted fever group Rickettsia in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 2014–2016, 2016.

WILSON, L. B.; CHOWNING, WM. M. The So-Called "Spotted Fever" of the Rocky Mountains. **Wilderness and Environmental Medicine**, v. 12, p. 121-128, 2001.

WITTER, R. et al. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 415–423, 2016.

WOLF, R. W. et al. Novel Babesia and Hepatozoon agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick Ornithodoros guaporensis in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 449–456, 2016.