



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DOUTORADO EM COMPORTAMENTO E BIOLOGIA ANIMAL

RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS (CANESTRINI, 1888)
E DERMACENTOR (ANOCENTOR) NITENS NEUMANN, 1897:
DIVERSIDADE GENÉTICA E POTENCIAL DE TRANSMISSÃO
DE PATÓGENOS EM DIFERENTES BIOMAS DO BRASIL

TAYRA PEREIRA SATO

JUIZ DE FORA

2020

TAYRA PEREIRA SATO

***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888)
e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897:
Diversidade Genética e Potencial de Transmissão de
Patógenos em Diferentes Biomas do Brasil**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia): Comportamento e Biologia Animal, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia): Comportamento e Biologia Animal.

Orientador: Dr. Gilberto Salles Gazêta

Coorientadora: Dra. Nicole Oliveira de Moura Martiniano

Juiz de Fora

2020

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Sato, Tayra Pereira.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897: Diversidade Genética e Potencial de Transmissão de Patógenos em Diferentes Biomas do Brasil / Tayra Pereira Sato. -- 2020.

187 f.

Orientador: Gilberto Salles Gazêta

Coorientadora: Nicole Oliveira Moura Martiniano

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2020.

1. Genética de População. 2. Patógenos Transmitidos por Carrapatos. 3. Vigilância Epidemiológica. 4. Carrapato-do-Boi. 5. Carrapato-da-Orelha-do-Cavalo. I. Gazêta, Gilberto Salles , orient. II. Moura Martiniano, Nicole Oliveira , coorient. III. Título.

TAYRA PEREIRA SATO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1888) e Dermacentor (Anocentor) nitens
Neumann, 1897: Diversidade Genética e Potencial de Transmissão de Patógenos em
Diferentes Biomas do Brasil

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia): Comportamento e Biologia Animal, Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Zoologia): Comportamento e Biologia Animal.

Orientador: Dr. Gilberto Salles Gazêta

Coorientadora: Dra. Nicole Oliveira de Moura Martiniano

Aprovada em 30/ 04/ 2020, por:

Dr. Gilberto Salles Gazêta / Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Nicole Oliveira de Moura Martiniano / Fundação Oswaldo Cruz

Dr. Douglas McIntosh / Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Dr. Stefan Vilges de Oliveira / Universidade Federal de Uberlândia

Dra. Aline Cristina Sant'Anna / Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Ralph Maturano Pinheiro / Universidade Federal de Juiz de Fora

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (ZOOLOGIA) - COMPORTAMENTO E
BIOLOGIA ANIMAL

ATA DE DEFESA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO
DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*

Nº PROPP: 309.30042020.7-D

Nº PPG: D05

Ata da sessão pública referente à defesa da tese intitulada *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897: Diversidade Genética e Potencial de Transmissão de Patógenos em Diferentes Biomas do Brasil., para fins de obtenção do título de doutora em Ciências Biológicas (Zoologia), área de concentração Comportamento e Biologia Animal, pelo(a) discente TAYRA PEREIRA SATO (matrícula: 103180010 - início do curso em 1/3/16), sob orientação do(a) Prof.ª Dr.ª Gilberto Salles Gazêta e coorientação do(a) Dr.ª Nicole Oliveira de Moura Martiniano.

Aos 30 dias do mês de abril do ano de 2020, às 10:00 horas, no(a) por webconferência, conforme Resolução nº 001/2020-CSPP da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), reuniu-se a Banca Examinadora da Tese em epígrafe, aprovada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação conforme a seguinte composição:

Prof.(a) Dr.(a) Gilberto Salles Gazêta - Orientador(a) e Presidente da Banca

Dr.(a) Nicole Oliveira de Moura Martiniano - Coorientador(a)

Prof.(a) Dr.(a) Douglas McIntosh - Membro titular externo (com participação remota, conforme Resolução n. 04/2016-CSPP)

Prof.(a) Dr.(a) Stefan Vilges de Oliveira - Membro titular externo (com participação remota, conforme Resolução n. 04/2016-CSPP)

Prof.(a) Dr.(a) Ralph Maturano Pinheiro - Membro titular interno

Prof.(a) Dr.(a) Aline Cristina Sant'Anna - Membro titular interno

Dr.(a) Alessandro Ponce de Leão Giupponi - Suplente externo

Dr.(a) Vinicius Figueiredo Vizzoni - Suplente externo

Prof.(a) Dr.(a) Danielle Maria de Oliveira Aragão - Suplente interno

Prof.(a) Dr.(a) Marcus Vinicius Xavier Senra - Suplente interno

Tendo o(a) senhor(a) Presidente declarado aberta a sessão, mediante o prévio exame do referido trabalho por parte de cada membro da Banca, o(a) discente procedeu a apresentação de seu Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-graduação *stricto sensu* e foi submetido(a) à arguição pela Banca Examinadora que, em seguida, deliberou sobre o seguinte resultado:

- APROVADO (Conceito A).**
- APROVADO CONDICIONALMENTE (Conceito B)**, mediante o atendimento das alterações sugeridas pela Banca Examinadora, constantes do campo Observações desta Ata e/ou do parecer em anexo.
- REPROVADO (Conceito C)**, conforme parecer circunstanciado, registrado no campo Observações desta Ata e/ou em documento anexo, elaborado pela Banca Examinadora.

Observações da Banca Examinadora (caso inexistentem, anular o campo):

- TODOS OS MEMBROS DA BANCA E A DISCENTE PARTICIPARAM
REMOTAMENTE DO SESSÃO DE DEFESA E ACOMPANHARAM NA SUA
INTEGRALIDADE (RESOLUÇÃO Nº 01/2020);
- A DISCENTE E OS MEMBROS DA BANCA DEMONSTRAM A ANUÊNCIA PARA QUE
O PRESIDENTE DA BANCA ASSINASSE POR ELES (RESOLUÇÃO Nº 01/2020).

Nada mais havendo a tratar, o(a) senhor(a) Presidente declarou encerrada a sessão de Defesa, sendo a presente Ata lavrada e assinada pelos(as) senhores(as) membros da Banca Examinadora e pelo(a) discente, atestando ciência do que nela consta.

INFORMAÇÕES:

- Para fazer jus ao título de mestre(a)/doutor(a), a versão final da dissertação/tese, considerada Aprovada, devidamente conferida pela Secretária do Programa de Pós-Graduação, deverá ser tramitada para a PROPP, em Processo de Homologação de Dissertação/Tese, dentro do prazo regulamentar de 90 dias a partir da data da defesa. Após a entrega dos dois exemplares definitivos, o processo deverá receber homologação, então, ser encaminhado à CDARA.
- Esta Ata de Defesa é um documento padronizado pela Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa. Observações excepcionais feitas pela Banca Examinadora poderão ser registradas no campo disponível acima ou em documento anexo, desde que assinadas pelo(a) Presidente.
- Esta Ata de Defesa somente poderá ser utilizada como comprovante de titulação se apresentada junto à Certidão da Coordenadoria de Assuntos e Registros Acadêmicos da UFJF (CDARA) atestando que o processo de confecção e registro do diploma está em andamento.

Prof.(a) Dr.(a) Gilberto Salles Gazêta

Dr.(a) Nicole Oliveira de Moura
Martiniano

Prof.(a) Dr.(a) Douglas McIntosh

Prof.(a) Dr.(a) Stefan Vilges de Oliveira

Prof.(a) Dr.(a) Ralph Maturano Pinheiro

Prof.(a) Dr.(a) Aline Cristina Sant'Anna

Dr.(a) Alessandro Ponce de Leão
Giupponi

Dr.(a) Vinicius Figueiredo Vizzoni

Prof.(a) Dr.(a) Danielle Maria de
Oliveira Aragão

Prof.(a) Dr.(a) Marcus Vinicius Xavier
Senra

Tayra Pereira Sato
Discente

*Dedico aos meus pais,
meu irmão e a meu marido Rafael,
pelo carinho e compreensão durante essa jornada!*

AGRADECIMENTOS

À Deus e a Nossa Senhora do Perpétuo Socorro pelas graças concedidas.

Ao meu orientador Gilberto S. Gazêta, por abrir as portas do laboratório, pela paciência, compreensão em situações adversas, incentivos e ensinamentos na elaboração e escrita da tese, apresentações, artigos. Muito obrigada pelo carinho, professor!

À minha coorientadora Nicole O. Moura Martiniano, por todo auxílio, disposição e paciência, na correção da escrita da tese, formatação e demais ensinamentos, além da nossa grande amizade que foi construída durante esses anos de convivência, por todo seu carinho durante as tribulações que aconteceram neste período.

À minha família, em especial aos meus pais, Tina e Shinpei e ao meu irmão Shin pelo carinho, compreensão e dedicação. Ao meu pai por sempre me incentivar nos estudos. À minha mãe por toda sua dedicação com a família (pois a minha distância traz muita preocupação com todos), ao meu irmão por cuidar de nossos pais. E mais uma vez a minha mãe por todos os cuidados quando descobri a doença trofoblástica gestacional e no período em que estive em recuperação.

Ao querido e amado marido Rafael que tem me acompanhado desde a graduação, me incentivando na vida acadêmica (que não é fácil), acreditando em mim até nos momentos em que eu mesma duvidei. Em momentos de alegria (como nosso casamento) e em tristes (como a doença do meu pai e agora uma gravidez que não era normal), passei por todas as situações com a sua imensa ajuda, carinho e muito amor!

Meus filhinhos de quatro patas: Bandidinha que me acompanhou no mestrado (“A Bandida tem mestrado!” no sonho do Rafael) e agora concluindo o doutorado ao meu lado também. Ryu, meu companheiro de campo durante o mestrado, mas que infelizmente partiu no início do segundo ano do doutorado. E tem o cachorro da Bandida, também conhecido como Lucky.

Aos pais do Rafael (Dona Solange e Seu Alcino), por todo auxílio sempre, me emprestando o carro para que eu pudesse ir a Fiocruz, tomando conta da bandidinha, e momentos difíceis como a cirurgia de emergência que fiz no fim no ano passado.

Aos meus amados amigos de Campo Grande/MS: Anderson, Ana Eduarda, Fábio Feitosa, Inara Maria, Lê Bavutti, Naoki, Jak Moreira, Silvia Cieslak e minhas queridas bandis (Marília, Keyla e Verónica) pelo imenso carinho em todos os momentos!

Aos amigos Ana Olímpia, Arannadia, Fernanda, João Felipe, Karen, Leonardo, Nicole e Vinícius, pelos momentos de descontração.

Ao Prof. Dr. Renato Andreotti pelo apoio e incentivo quando contei que iria fazer o doutorado e ao amigo Dr. Rodrigo Casquero Cunha pelos ensinamentos sobre carrapatos e biologia molecular.

Aos professores Gazêta, Marinete e Serra-Freire (*in memoriam*) do LIRN agradeço a todos vocês, pelo acolhimento e pela grande contribuição na minha vida profissional, através dos ensinamentos sobre carrapatos, riquetsias e sobre a vida, bem como toda equipe do LIRN, aos presentes e aos que seguiram outros caminhos.

À Dra Karla Bitencourth por todos ensinamentos sobre genética de população, seu empenho e paciência respondendo todas minhas dúvidas sobre o assunto, e todo seu auxílio na confecção da tese.

Aos doutores Arannadia, Nicole e Vinicius, pela disposição em sempre me ajudar tanto em bancada como em todas as dúvidas sobre biologia molecular, patógenos e carrapatos.

Agradeço de todo meu coração a Lili (a mineira mais gente fina de Juiz de Fora) e a sua dindinha, Dona Ivone, pela hospitalidade em sua residência, seu cafezinho, e comidinhas feita por ela e pela Mariléia, assim como aquele bolo de cenoura (maravilho), por todas as vezes que estive em Juiz de Fora para cumprir os deveres com a Pós-Graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Zoologia): Comportamento e Biologia Animal, Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora. E tenho muito a agradecer a três pessoas que sempre foram muito solícitas comigo, Marlú, Dayane e o coordenador Dr. Roberto Júnio.

Ao programa de Bolsas de Pós-graduação da UFJF que financiou a minha bolsa de estudos, o que foi de extrema necessidade para que eu pudesse realizar bancada, cumprimento de créditos e demais obrigações da tese.

Aos professores, colegas de disciplinas e funcionários da UFJF, e as amizades que fiz em Juiz de Fora que merecem um lugar especial no coração.

Agradeço a todos aqueles que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização desse trabalho.

“A sabedoria não vem do acerto, mas do aprendizado com os erros”

Monja Coen

“Lembre-se: você é do tamanho dos seus sonhos”

Roberto Shinyashiki

RESUMO

SATO, T. P. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897: Diversidade Genética e Potencial de Transmissão de Patógenos em Diferentes Biomas do Brasil. 2020. 187 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Zoologia: Comportamento e Biologia Animal) – Faculdade de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brasil, 2020.

Os carrapatos são artrópodes hematófagos de importância médico-veterinária, pois apresentam capacidade de transmitir grande diversidade de agentes patogênicos para animais vertebrados, incluindo o homem. Cada membro do sistema hospedeiro-vetor-patógeno é afetado pelos outros, este efeito combinado pode influenciar a variação genética em carrapatos e estas diferenças genéticas entre as populações de carrapatos podem ter implicações importantes no que diz respeito à capacidade de transmitir patógenos aos hospedeiros. Como os principais ectoparasitas que acometem a produção bovina e equina no Brasil são, respectivamente, *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*, e também como pouco se sabe sobre a participação destes carrapatos nos ciclos enzoótico e epidêmico dos bioagentes por eles veiculados, estas espécies são o foco principal desta tese. Foram analisadas a diversidade genética em populações destas espécies de carrapatos e a infecção por patógenos, em espécimes coletados entre 2011 a 2019, em hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, de áreas de investigação de focos, vigilância ambiental e em focos silenciosos da Febre Maculosa (FM), de diferentes biomas do Brasil. Foi observada baixa diversidade genética e ausência de estruturação populacional definida para *R. microplus* e *D. nitens*. Espécimes do carrapato-da-orelha-do-cavalo foram obtidos naturalmente infectados com *Candidatus Rickettsia andeanae*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia felis* e *Babesia caballi*. Já os espécimes do carrapato-do-boi foram obtidos naturalmente infectados com *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *R. felis*, *Rickettsia tamurae*, *R. rhipicephali*, *Rickettsia bellii*, *Ehrlichia minasensis*, *Ehrlichia canis* e *Theileria equi*, indicando sua potencial atuação na transmissão de erliquia e theileria para animais no país e sugerindo *R. microplus* como marcador da presença ou circulação de riquetsias. Os resultados obtidos e a diversidade de espécies de riquetsias em carrapatos de animais próximos ao homem contribuem para o entendimento do ciclo enzoótico em áreas de foco de FM no Brasil.

Palavras-chave: Genética de População; Patógenos Transmitidos por Carrapatos; Vigilância Epidemiológica; Carrapato-do-Boi; Carrapato-da-Orelha-do-Cavalo; Biomas Brasileiros.

ABSTRACT

SATO, T. P. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) and *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897: Genetic Diversity and Transmission Potential of Pathogens from Different Biomes of Brazil. 2020. 187 pp. PhD Thesis (Philosophy Doctor in Biological Sciences – Zoology: Behavior and Animal Biology) - Institute of Biological Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil, 2020.

Ticks are hematophagous arthropods with medical-veterinary importance, since they have capacity to transmit a great pathogens diversity to vertebrate animals, including humans. Each member of the host-vector-pathogen system is affected by the others, this combined effect can influence ticks genetic variation and these genetic differences among tick populations may have important implications regarding the ability of pathogens transmission to hosts. As the main ectoparasites that affect bovine and equine production in Brazil are, respectively, *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens*, and also as little is known about the participation of these ticks in the enzootic and epidemic cycles of the bioagents they transmit, these species are the focus of this thesis. Genetic diversity in populations of these tick species and their infection by pathogens were analyzed, in specimens collected between 2011 and 2019, in vertebrate hosts and free in the environment, in areas of investigation focus, environmental surveillance and silent outbreaks of Spotted Fever (SF), from different biomes in Brazil. Low genetic diversity and no defined population structure for *R. microplus* and *D. nitens* were observed. Horse-ear-tick specimens were obtained naturally infected with *Candidatus Rickettsia andeanae*, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia felis* and *Babesia caballi*. On the other hand, the cattle-tick specimens were obtained naturally infected with *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *R. felis*, *Rickettsia tamurae*, *R. rhipicephali*, *Rickettsia bellii*, *Ehrlichia minasensis*, *Ehrlichia canis* and *Theileria equi*, indicating their potential performance in the transmission of *Ehrlichia* and *Theileria* to animals in the country and suggesting *R. microplus* as a marker of Rickettsiae presence or circulation. The obtained results and the diversity of Rickettsiae species in ticks of animals close to humans contribute to the understanding of the enzootic cycle in SF focus areas in Brazil.

Key words: Population Genetics; Tick-Borne Pathogens; Epidemiological Surveillance; Cattle-Tick; Horse-Ear-Tick; Brazilian Biomes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Ciclo biológico de carrapatos ixodídeos monoxenos.....03
- Figura 2.** Distribuição geográfica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 coletados parasitando hospedeiros vertebrados e/ou livres no ambiente, por unidade federativa e bioma, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....27
- Figura 3.** Rede de haplótipos do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA) de populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), de diferentes biomas e Estados do Brasil, gerada pelo método de median-joining com pós-processamento pelo método de máxima parcimônia.....42
- Figura 4.** Rede de haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) de populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), de diferentes biomas e Estados do Brasil, gerada pelo método de median-joining com pós-processamento pelo método de máxima parcimônia.....43
- Figura 5.** Rede de haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) de populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 de diferentes biomas e estados gerada pelo método de median-joining com pós-processamento pelo método de máxima parcimônia.....54
- Figura 6.** Filogenia, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92+G, para sequências parciais (359 pb) do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA), representando as relações entre os três haplótipos (hI a hIII) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) identificados no Brasil e as sequências do *GenBank*.....60
- Figura 7.** Filogenia, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92+G, para sequências parciais (639 pb) do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I), representando as relações entre os sete haplótipos (h1 a h7) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) identificados no Brasil e as sequências do *GenBank*.....63

Figura 8. Filogenia, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92+G, para sequências parciais (357 pb) do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA) de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 identificados no Brasil e as sequências do *GenBank*.....65

Figura 9. Filogenia, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo GTR+G+I, para sequências parciais (640 pb) do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I), representando as relações entre os três haplótipos (h1 a h3) de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 identificados no Brasil e as sequências do *GenBank*.....68

Figura 10. Inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais concatenadas dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA*, *ompB* e *sca4* (de 401, 549, 532, 862 e 744 pb, respectivamente) de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), pelo método de máxima verossimilhança de 1.000 árvores replicadas.....72

Figura 11. Inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais concatenadas dos genes *ompB*, *ompA* e *gltA* (de 862, 532 e 401 pb, respectivamente) de carrapatos *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897, pelo método de máxima verossimilhança de 1.000 árvores replicadas.....76

Figura 12. Inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais do gene *dsb - disulfide bond* (de 409 pb) de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), pelo método de máxima verossimilhança de 1.000 árvores replicadas.....80

Figura 13. Inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal 18S (18S rRNA) (de 395 a 410 pb) de carrapatos *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), pelo método de máxima verossimilhança de 1.000 árvores replicadas.....84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de sequências parciais de genes mitocondriais de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Demarcentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897, coletados no período de 2011 a 2019 em diferentes biomas do Brasil.....29
- Tabela 2.** Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de sequências parciais de genes de *Riquetsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Babesia* e *Theileria*, em amostras de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 coletados no período de 2011 a 2019 em diferentes biomas do Brasil.....31
- Tabela 3.** Distribuição e frequência dos haplótipos do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA) identificados nas populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil..... 37
- Tabela 4.** Síntese da distribuição, variabilidade, diversidade genética e história demográfica dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) e 12S ribossomal DNA (12SrDNA) das populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil.....38
- Tabela 5.** Distribuição e frequência dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) identificados nas populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil.....40
- Tabela 6.** Estimativas de diferenciação genética, representadas pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, entre as populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas do Brasil.....45
- Tabela 7.** Estimativas de diferenciação genética, representadas pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, entre os grupos delimitados e populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas do Brasil.....47

Tabela 8. Teste de Mantel que avalia a associação entre as distâncias genéticas e geográficas nas populações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888) analisadas do Brasil.....	48
Tabela 9. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as sequências genéticas analisadas do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) e 12S ribossomal DNA (12SrDNA) de grupos e populações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888) analisadas no Brasil.....	48
Tabela 10. Distribuição e frequência dos haplótipos da região <i>D-loop</i> identificados nas populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil.....	50
Tabela 11. Síntese da distribuição, variabilidade, diversidade genética e história demográfica dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COX-I) das populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil.....	51
Tabela 12. Distribuição e frequência dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I identificados nas populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil.....	53
Tabela 13. Estimativas de diferenciação genética, representadas pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, entre as populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 analisadas do Brasil.....	56
Tabela 14. Estimativas de diferenciação genética, representadas pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, entre os grupos delimitados e populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 analisadas do Brasil.....	57
Tabela 15. Teste de Mantel que avalia a associação entre as distâncias genéticas e geográficas nas populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 analisadas do Brasil.....	57
Tabela 16. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as sequências genéticas analisadas do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) e da região <i>D-loop</i> de grupos e populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 analisadas no Brasil.....	58

Tabela 17. Espécies de *Rickettsia* detectadas por análises de *gltA*, *ompA*, *ompB*, *htrA* e *sca4* em amostras de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) coletados parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....70

Tabela 18. Espécies de *Rickettsia* detectadas por análises de *ompB*, *ompA* e *gltA* em amostras de carrapatos *Dermacentor (Anocentor) nitens* coletados parasitando hospedeiros vertebrados, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....74

Tabela 19. Espécies de *Ehrlichia* detectadas por análise de sequências nucleotídicas parciais do gene gênero-específico da proteína de formação de ligação dissulfeto *dsb* de amostras de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), coletados parasitando hospedeiros vertebrados, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....78

Tabela 20. Espécies de *Babesia* e *Theileria* detectadas por análise de sequências nucleotídicas parciais do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal 18S (18S rRNA) de amostras de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897, coletados parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....82

Tabela 21. Relação das amostras de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) que amplificaram fragmentos de genes de bioagentes transmitidos por carrapatos e os haplótipos identificados.....86

Tabela 22. Relação das amostras de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 que amplificaram fragmentos de genes de bioagentes transmitidos por carrapatos e os haplótipos identificados.....88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C – Graus Celsius

µl – Microlitro

BA – Bahia

CE – Ceará

COX-I – Citocromo Oxidase subunidade 1

DL – Doença de Lyme

DNA – *Desoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucléico)

DNAg – DNA genômico

dNTP – *Deoxynucleotides triphosphates* (Desoxirribonucleotídeos trifosfatados)

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilendiamino tetra-acético)

ES – Espírito Santo

EUA – Estados Unidos da América

FAO – *Food and Agriculture Organization*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FM – Febre Maculosa

FMB – Febre Maculosa Brasileira

g – Aceleração de gravidade

GA – Grupo Ancestral

GFM – Grupo Febre Maculosa

GO – Goiás

GT – Grupo Tipo

h – Hora

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Kb – kilobase

LIRN – Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses

MA – Maranhão

MG – Minas Gerais

min – Minutos

mM –Milimolar

MT – Mato Grosso

NCBI – Nacional Center for Biotechnology Information

NaCl – Cloreto de Sódio

N₂ – Nitrogênio

ng – Nanograma

P. A. – Para Análise

pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PDTIS-FIOCRUZ – Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

PE – Pernambuco

pH – Potencial hidrogeniônico

PNSE - Programa Nacional de Sanidade em Equideos

PR – Paraná

RJ – Rio de Janeiro

RN – Rio Grande do Norte

RS – Rio Grande do Sul

RO – Rondônia

RR – Roraima

SC – Santa Catarina

SDS – *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)

S. l. – *Sensu lato*

SP – São Paulo

S. s. – *Sensu stricto*

TO – Tocantins

Tris HCl – Tris Hidrocloro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Carrapatos e sua importância na transmissão de agentes infecciosos.....	01
<i>1.1.1 <u>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</u>.....</i>	<i>02</i>
<i>1.1.2 <u>Dermacentor (Anocentor) nitens</u>.....</i>	<i>07</i>
1.2 Utilização de marcadores moleculares em estudos filogenéticos e de estrutura de populações de carrapatos.....	09
<i>1.2.1 DNA mitocondrial (mtDNA).....</i>	<i>12</i>
<i>1.2.1.1 Citocromo Oxidase Subunidade 1 (COX-I).....</i>	<i>13</i>
<i>1.2.1.2 Região controle (D-loop).....</i>	<i>14</i>
<i>1.2.1.3 12S ribossomal DNA.....</i>	<i>14</i>
1.3 Principais bioagentes transmitidos pelos carrapatos.....	15
<i>1.3.1 <u>Rickettsia</u> sp.....</i>	<i>15</i>
<i>1.3.2 <u>Anaplasma</u> sp.....</i>	<i>18</i>
<i>1.3.3 <u>Ehrlichia</u> sp.....</i>	<i>19</i>
<i>1.3.4 <u>Borrelia</u> sp.....</i>	<i>20</i>
<i>1.3.5 <u>Babesia</u> sp. e <u>Theileria</u> sp.....</i>	<i>22</i>
1.4 Justificativa.....	23
2 OBJETIVOS.....	25
2.1 Objetivo Geral.....	25
<i>2.1.1 Objetivos Específicos.....</i>	<i>25</i>
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	26

3.1 Área de estudo e coleta de artrópodes.....	26
3.2 Identificação taxonômica dos carrapatos.....	28
3.3 Extração de DNA genômico (DNAg).....	28
3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	29
3.5 Eletroforese, purificação e sequenciamento parcial de nucleotídeos.....	32
3.6 Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas.....	32
3.7. Análise de dados de genética de populações e análise filogeográfica de <i>Rhipicephalus microplus</i> e <i>Dermacentor nitens</i>	33
3.8 Análises filogenéticas.....	34
4 RESULTADOS.....	35
4.1 Confirmação molecular da identificação dos carrapatos.....	35
4.1.1 <u><i>Rhipicephalus microplus</i></u>	35
4.1.2 <u><i>Dermacentor nitens</i></u>	35
4.2 Genética de populações dos carrapatos.....	36
4.2.1 Análises intrapopulacionais em <u><i>Rhipicephalus microplus</i></u>	36
4.2.1.1 Diversidade genética de <i>Rhipicephalus microplus</i> no Brasil.....	36
4.2.1.2 História evolutiva de <i>Rhipicephalus microplus</i> com base na rede de haplótipos.....	41
4.2.1.3 Dinâmica demográfica e diferenciação genética nas populações de <i>Rhipicephalus microplus</i> do Brasil.....	43
4.2.2 Análises intrapopulacionais em <u><i>Dermacentor nitens</i></u>	49
4.2.2.1 Diversidade genética de <i>Dermacentor nitens</i> no Brasil.....	49
4.2.2.2 História evolutiva de <i>Dermacentor nitens</i> com base na rede de haplótipos.....	53
4.2.2.3 Dinâmica demográfica e diferenciação genética nas populações de <i>Dermacentor nitens</i> do Brasil.....	54

4.3 Análises filogenéticas dos carrapatos.....	58
4.3.1 <u>Rhipicephalus microplus</u>	58
4.3.2 <u>Dermacentor nitens</u>	64
4.4 Pesquisa molecular de patógenos transmitidos por carrapatos.....	69
4.4.1 Riquétsias detectadas em <u>Rhipicephalus microplus</u>	69
4.4.2 Riquétsias detectadas em <u>Dermacentor nitens</u>	73
4.4.3 Erliquias detectadas em <u>Rhipicephalus microplus</u> e <u>Dermacentor nitens</u>	77
4.4.4 Babesias e Theilerias detectadas em <u>Rhipicephalus microplus</u> e <u>Dermacentor nitens</u>	81
4.4.5 Pesquisa de Anaplasma e Borrelia em <u>Rhipicephalus microplus</u> e <u>Dermacentor nitens</u>	85
4.5 Relação entre patógenos e haplótipos.....	85
5 DISCUSSÃO.....	89
5.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	89
5.2 <i>Dermacentor nitens</i>	93
5.3 Pesquisa de bioagentes nos carrapatos.....	96
5.4 Relação entre patógenos e haplótipos.....	104
6 CONCLUSÕES.....	105
REFERÊNCIAS.....	106
APÊNDICES.....	141
APÊNDICE A. Espécimes de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888) coletados parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....	141
APÊNDICE B. Espécimes de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann coletados parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....	143

APÊNDICE C. Distribuição dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) identificados nas populações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888) coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....	143
APÊNDICE D. Distribuição dos haplótipos do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA) identificados nas populações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888) coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....	148
APÊNDICE E. Distribuição do haplótipo da região <i>D-loop</i> identificados nas populações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> (Canestrini, 1888) coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019	150
APÊNDICE F. Distribuição dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) identificados nas populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....	151
APÊNDICE G. Distribuição dos haplótipos da região <i>D-loop</i> identificados nas populações de <i>Dermacentor (Anocentor) nitens</i> Neumann, 1897 coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019.....	153
ANEXO.....	156
ANEXO A. ARTIGO PUBLICADO.....	156

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carrapatos e sua importância na transmissão de agentes infecciosos

Os carrapatos (Arachnida: Acari: Parasitiformes) são artrópodes hematófagos que parasitam grande variedade de animais vertebrados. Durante a hematofagia, a picada do carrapato pode causar injúrias diretas, desconforto e lesões, bem como grandes infestações podem causar paralisia e anemia no hospedeiro (Sonenshine, 1993).

Além disso, os carrapatos apresentam grande importância médico-veterinária, pois são o grupo dos artrópodes hematófagos que transmite maior diversidade de microrganismos patogênicos como protozoários, vírus e bactérias para uma grande variedade de hospedeiros vertebrados, incluindo animais domésticos e selvagens, e são o segundo grupo de artrópodes com maior importância para saúde pública por atuarem como vetores de patógenos que causam doenças em seres humanos (Jongejan e Uilenberg, 2004; Labuda e Nuttall, 2004; Guglielmone et al., 2006; De La Fuente et al., 2008; Serra-Freire et al., 2011). Sua capacidade de transmissão de agentes patogênicos está diretamente vinculada ao longo período de alimentação/ parasitismo e à modulação da resposta imune do hospedeiro afim de garantir o sucesso do repasto sanguíneo e, conseqüentemente, o seu desenvolvimento (Piesman et al., 1987; Scholl et al., 2016).

Taxonomicamente, os carrapatos estão subdivididos em três famílias: Nuttalliellidae, Argasidae e Ixodidae (Horak et al., 2002), compreendendo aproximadamente 900 espécies em todo o mundo (Camicas et al., 1998; Horak et al., 2002; Nava et al., 2009). No Brasil, foram catalogadas mais de 70 espécies (Aragão 1936; Martins et al., 2014; Labruna et al., 2016, Dantas-Torres et al., 2019) distribuídas em duas famílias: Argasidae, com 26 espécies de “carrapatos moles” por não possuírem escudo dorsal quitinoso; e Ixodidae, com 47 espécies

de “carrapatos duros” por possuírem escudo dorsal quitinoso (Flechtmann, 1973; Sonenshine, 1993). Este grupo dos ixodídeos que ocorrem no país é representado por cinco gêneros *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (Aragão, 1936; Martins et al., 2014; Labruna et al., 2016; Dantas-Torres et al., 2019).

1.1.1 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Após estudos filogenéticos recentes, as espécies integrantes do gênero *Boophilus* foram reclassificadas como pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* (Murrel e Barker, 2003). Dessa forma, o carrapato-do-boi, originalmente conhecido como *Boophilus microplus*, denomina-se *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888). Segundo a classificação do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI – ID: 6941), *R. microplus* pertence ao Reino Metazoa, Filo Arthropoda, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodoidea, Família Ixodidae, Subfamília Rhipicephalinae, Gênero *Rhipicephalus*, Subgênero *Boophilus*, Espécie *R. microplus*.

Este carrapato é conhecido como carrapato-do-boi pela sua predileção por hospedeiros bovinos (Flechtmann, 1975), entretanto é capaz de parasitar outros hospedeiros vertebrados, incluindo humanos, quando oportuno (Soares et al., 2007). É um parasita monoxeno (Figura 1), necessitando de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo de vida (sobre o qual realiza todas as mudas). A fase não parasitária inicia quando a fêmea ingurgitada se desprende do hospedeiro e realiza a postura dos ovos no ambiente, em local protegido de predadores naturais e da incidência intensa de luz solar (Hitchcock, 1955).

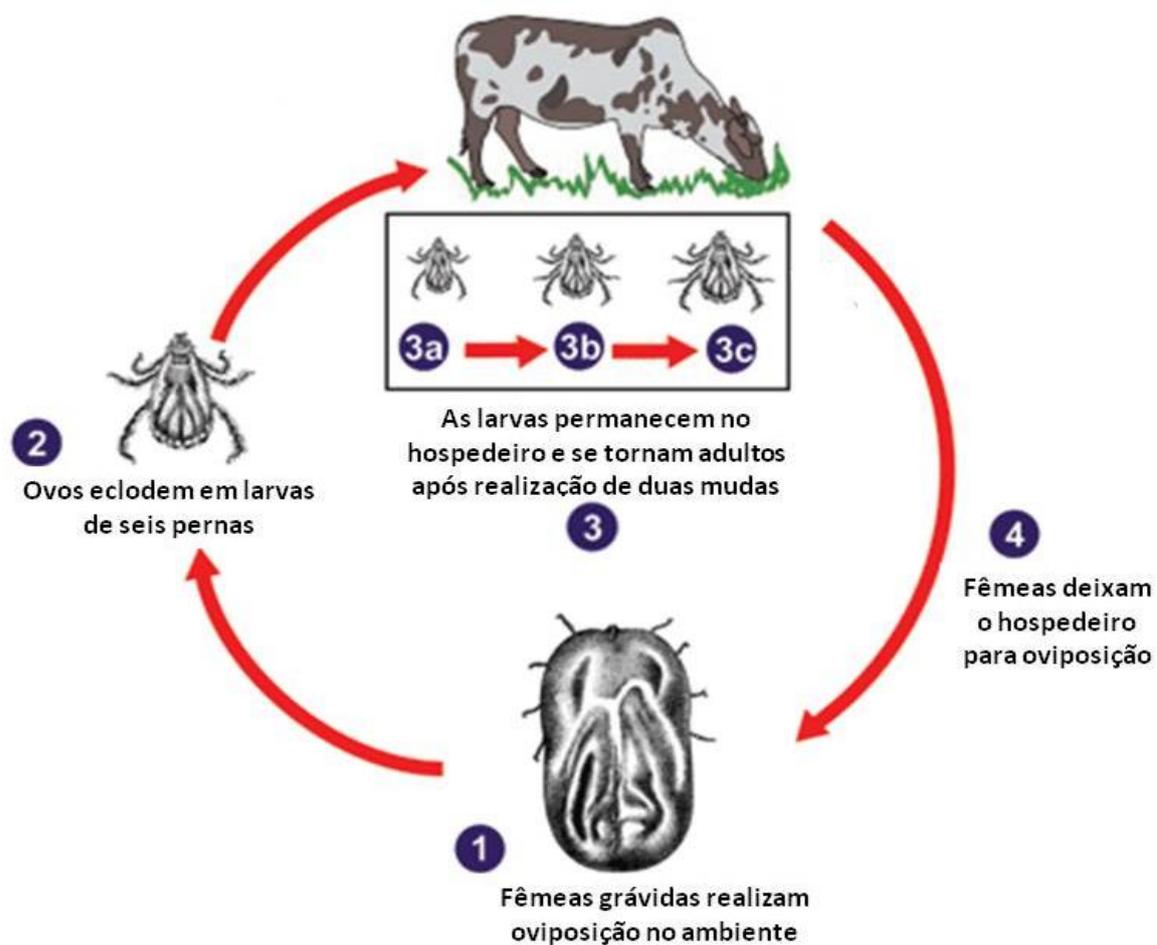


Figura 1. Ciclo biológico de carrapatos ixodídeos monóxenos (Fonte: Adaptado de CDC, <https://www.cdc.gov/dpdx/ticks>).

Por um período de 3 a 5 dias após o desprendimento da teleógina, ocorre o período de pré-postura que é necessário para maturação dos ovários, produção e maturação dos ovos (Legg, 1930; Campos Pereira et al., 2008). Posteriormente, a fêmea realiza a oviposição (Andreotti et al., 2019) e morre, finalizando o ciclo de vida e deixando os ovos para incubação – este período de incubação pode variar de acordo com as condições climáticas (Andreotti et al., 2019). Cada teleógina possui potencial de reverter em torno de 50% de seu peso corporal em massa de ovos, apresentando capacidade de realizar ovipostura de

aproximadamente 3.000 ovos. Decorrido o tempo necessário de incubação eclodem as larvas, que apresentam três pares de pernas.

Após a eclosão dos ovos, as larvas ficam quiescentes e, posteriormente, tornam-se ativas, formando uma aglomeração na ponta ou haste de alguma vegetação, o que facilita o encontro com o hospedeiro. Estudo realizado por Gauss e Furlong (2002) demonstrou que as larvas podem permanecer à espera de um hospedeiro na pastagem por mais de oitenta dias. As larvas de *R. microplus* são atraídas por gases expirados e secreções da pele dos bovinos (Soneshine et al., 1993). A fase não parasitária termina quando as larvas conseguem fixar-se no hospedeiro ou quando elas morrem sem encontrar nenhum hospedeiro em potencial (Andreotti et al., 2019).

No intervalo de 4 a 7 dias após a fixação da larva ocorre a mudança do estágio larval, passando para ninfa que após um período de 9 a 16 dias novamente sofre a ecdise transformando-se em adultos. Por sua vez, os adultos realizam cópula e as fêmeas vão se desprender do hospedeiro entre 18 e 35 dias após a fixação das larvas (Gonzales, 1974). Após o acasalamento, as fêmeas continuam a hematofagia até tornarem-se completamente ingurgitadas (Pereira et al., 2008; Soneshine et al., 1993). O processo de hematofagia pode provocar vários danos ao hospedeiro, principalmente se ele estiver com alto grau de infestação (Soneshine et al., 1993).

A fase parasitária deste carrapato, desde a fixação da larva até o desprendimento da teleógina, tem duração média de 21 dias e, nesta fase as condições climáticas não influencia a fixação no hospedeiro, visto que este mantém a temperatura corporal constante, diferentemente da fase de vida livre, em que o carrapato está exposto a temperatura e condições do ambiente (Campos Pereira et al., 2008, Andreotti et al., 2019).

De origem na Ásia, especialmente da Índia e da Ilha de Java, a distribuição geográfica de *R. microplus* se expandiu devido às expedições exploratórias com intensa movimentação de animais e mercadorias registradas pela História, facilitando seu ingresso nas regiões

tropicais e subtropicais: Austrália, México, América Central, América do Sul e África, posicionado dentro das áreas demarcadas pelos paralelos 32° Norte e 32° Sul (Nuñez et al., 1982; Estrada-Peña et al., 2006), sendo hoje uma das espécies de ixodídeos com maior distribuição mundial.

Já a introdução desta espécie de carrapato no Brasil provavelmente ocorreu por conta das expedições, no início do século XVIII, que transportavam animais domésticos parasitados. Existe a hipótese de que ele seria oriundo de bovinos comprados no Chile, que teria entrado no país através do Rio Grande do Sul (Kessler e Schenk, 1998) e depois amplamente expandido por todo o território brasileiro. Assim, a incidência varia de acordo com as condições climáticas de cada local, bem como influenciada pelas raças de bovinos predominantemente criadas (Gonzales, 1995).

Esta espécie de carrapato se destaca por estar associado a prejuízos econômicos consideráveis para a pecuária, especialmente na bovinocultura, sendo atribuído um prejuízo econômico de três bilhões de dólares por ano no país, pelos danos causados pelo parasita (Grisi et al., 2014). Em nível mundial, estes valores chegam a sete bilhões de dólares anualmente (FAO, 2004). Como um bovino pode ser parasitado por milhares de carrapatos, o comportamento e a saúde do hospedeiro são afetados direta ou indiretamente, diminuindo a produtividade do animal, pela elevada perda de sangue que pode causar anemia; pela inoculação de substâncias tóxicas que causam paralisia; pela redução da força de tração, ganho de peso, produção de leite e carne; pelos danos no couro causados pela picada que podem causar infecções secundárias, como as miíases cutâneas e diminuem o valor de mercado do couro. Além disso, *R. microplus* é o vetor dos agentes patogênicos causadores da Tristeza Parasitária Bovina, os protozoários *Babesia bovis* (Babés, 1888, Starcovici, 1893) e *Babesia bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) e a bactéria *Anaplasma marginale* (Theiler, 1910), responsáveis por altos índices de mortalidade do rebanho bovino (Sattler et al., 1986; Gonzales e Serra-Freire, 1992; Gonzales, 1995; Labruna e Verissimo, 2001; Grisi et al., 2002;

Peter et al., 2005; Jonsson, 2006; De la Fuente et al., 2008; Rodrigues e Leite, 2013; Grisi et al., 2014).

É importante ressaltar que em torno de 95% dos carrapatos em um sistema de produção de bovinos encontram-se na pastagem e estão nos estágios de ovos, larvas e/ou teleóginas, e somente 5% da população de carrapatos encontram-se parasitando os bovinos (Campos Pereira et al., 2008). Isso se torna um grande problema com relação ao controle deste ectoparasito, haja visto que as ações de combate a este carrapato são realizadas quase que exclusivamente por carrapaticidas químicos (Kunz e Kemp, 1994; Klafke et al., 2017) e destinadas apenas aos carrapatos fixos (fase parasitária) que representam a minoria da população.

Em relação ao impacto destes ectoparasitas em aspectos econômicos, a pecuária brasileira ocupa lugar de destaque no cenário internacional, além de ter um grande potencial de crescimento (IBGE, 2018). O país possui o segundo maior rebanho comercial de bovinos do mundo, com população estimada em pouco mais de 213 milhões de animais (IBGE, 2018). Além disso, também figura como o sexto maior produtor mundial de leite (Anualpec, 2016). A equideocultura também se faz importante, pois o Brasil possui o terceiro maior rebanho de equídeos do mundo (Lima et al., 2006), com um plantel de aproximadamente 4,2 milhões de equinos (IBGE, 2017).

O impacto dos carrapatos como vetores se agrava ainda pelo fato de grande parte dos agentes transmitidos por estes artrópodes serem causadores não somente de doenças em animais, mas também de zoonoses relevantes; pelo constante aumento na prevalência em diversos países de infecções originadas por carrapatos nos últimos anos; e pelo surgimento constante de novos patógenos transmitidos por eles (Baneth, 2014).

Por ocorrer em toda a extensão do território brasileiro, *R. microplus* é encontrado em regiões onde a Febre Maculosa (FM) é endêmica. Contudo, e mesmo considerando os relatos de sua infecção por diferentes espécies de riquétsias pertencentes ao Grupo Febre Maculosa

(Bermúdez et al., 2009; Moura-Martinião et al., 2014; Pesquera et al., 2015), seu envolvimento na transmissão de essas bactérias ainda não está esclarecido (Cordeiro et al., 2018a).

1.1.2 *Dermacentor (Anocentor) nitens*

Dermacentor é um dos cinco gêneros de carrapatos da família Ixodidae que ocorrem na Região Neotropical, sendo que este gênero no Brasil é representado apenas pela espécie *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 (Barros-Battesti et al., 2006; Guzmán-Cornejo et al., 2016).

Esta espécie de carrapato apresenta distribuição pelas regiões tropicais e subtropicais, do sul dos Estados Unidos ao norte da Argentina, sendo amplamente distribuído no território brasileiro (Serra-Freire, 1982; Gazeta e Serra-Freire, 1996, Amorim et al., 1997). Trata-se de um carrapato de comportamento monoxeno, que realiza diferentes gerações por ano na Região Sudeste do Brasil (Souza e Serra-Freire, 1992; Borges et al., 1999; Labruna et al., 2001). Popularmente conhecido como “carrapato-da-orelha-do-cavalo” devido a sua predileção a hospedeiros equinos, comumente encontrado na região das orelhas e responsável por lesões no pavilhão auricular, depreciando os animais em termos zootécnicos e econômicos (Flechtmann, 1975; Malheiro, 1952; Borges e Leite, 1998).

Embora muitas espécies deste gênero necessitem de três hospedeiros para completarem o ciclo de vida, *D. nitens* e *Dermacentor albipictus* (Packard, 1869) necessitam de um único hospedeiro (Guzmán-Cornejo et al., 2016). A fase parasitária se inicia com a fixação da larva em um animal e termina com desprendimento da teleógina, com duração média de 25 dias e, cada um dos estádios de desenvolvimento do carrapato tem um período médio de alimentação, sendo que as larvas, ninfas e fêmeas levam em média oito, nove e oito

dias, respectivamente, para completarem seu repasto sanguíneo (Rodrigues et al., 2017). Por fim, quando a teleógina completa sua alimentação ela se desprende do animal caindo no solo e dando início a fase não parasitária.

Bem como os demais Ixodídeos, ao se desprender do hospedeiro, a teleógina busca um local adequado sob a vegetação para iniciar o processo de ovipostura. Esse processo pode levar alguns dias e, após encerrar a oviposição, a fêmea morre. Os ovos que ali permanecem são naturalmente incubados. Após esse período de incubação eclodem as larvas que, ao estarem aptas para buscarem por hospedeiros, sobem até as pontas das folhas das gramíneas e ali permanecem à espreita de um animal, reiniciando o ciclo de vida (Andreotti et al., 2019).

Devemos, contudo, sempre levar em conta que a fase não parasitária sofre influência direta dos fatores abióticos, tais como temperatura e umidade, e ainda os fatores bióticos, pois estão susceptíveis a inimigos naturais, como formigas, aves, entre outros (Bastos et al., 1996; Guimarães da Silva et al., 1997; Andreotti et al., 2019).

Portanto, após uma teleógina se desprender do animal, vários fatores podem influenciar a sua sobrevivência, bem como a sobrevivência de seus descendentes. Tais fatores podem eventualmente resultar na morte da fêmea antes da ovipostura, na produção de ovos inférteis, ou ainda, na morte das larvas que não entrarem em contato com um hospedeiro (Pereira et al., 2008).

Com relação à dinâmica populacional, na região Sudeste do Brasil, essa espécie de carrapato apresenta de três a quatro gerações anuais e os maiores picos de infestação ocorrem no primeiro semestre do ano (Borges et al., 2000; Labruna et al., 2002).

Apesar de ser encontrado principalmente sobre equídeos, é considerado sem especificidade parasitária (Gazêta e Serra-Freire, 1995) e eventualmente parasita outros animais domésticos e silvestres, desde bovinos, cervídeos, ovinos, alguns carnívoros como *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) e onças [*Panthera onca* (Linnaeus, 1758) e *Puma concolor* (Linnaeus, 1771)]. Além disso, esta espécie já foi relatada parasitando humanos quando

oportuna e em baixas infestações (Guglielmone et al., 2006; Miziara et al., 2007; Martins et al., 2015; Gusmán-Cornejo et al. 2016; Nava et al., 2017; Andreotti et al., 2019).

Infestações elevadas por *D. nitens* podem causar lesões nas orelhas, resultando em danos permanentes na cartilagem, além de criar condições para miíase e acarretar outras enfermidades nos equídeos (Labruna e Amaku, 2006). Entre os danos indiretos, destaca-se a transmissão *Theileria equi* (Laveran, 1901) Mehlhorn e Schein, 1998 e *Babesia caballi* (Nuttall e Strickland, 1910), hemoprotozoários causadores da Piroplasmose Equina, podendo resultar na morte de animais ou reduzir seu desempenho (Roby e Anthony, 1963).

Devido a sua ampla distribuição no Brasil, o carrapato da orelha do cavalo é encontrado em regiões onde a FM é endêmica, porém há somente um relato de infecção de *Rickettsia rickettsii* em *D. nitens* no país (Gehrke, 2010) e um relato no Panamá (Bermúdez et al., 2009), contudo o conhecimento da participação deste carrapato no ciclo do patógeno permanece incipiente.

1.2 Utilização de marcadores moleculares em estudos filogenéticos e de estrutura de populações de carrapatos

A variabilidade genética em carrapatos pode estar associada à sua capacidade de transmitir patógenos (Qiu et al., 2002; McCoy, 2008; Araya-Anchetta et al., 2015; Bitencourth et al., 2016). Uma vez que carrapatos, patógenos e seus hospedeiros estão ligados, a compreensão sobre a diversidade e distribuição da fauna de carrapatos torna-se muito importante (Petney et al., 2011; Guillemi et al., 2015) e para que isso seja possível, estudos de genética de populações utilizando marcadores moleculares para analisar se há diferenças dentro ou entre populações da mesma espécie são necessários (Song et al., 2011).

Inicialmente, poucos estudos foram realizados focando especificamente na genética da população de carrapatos (Wallis e Miller, 1983; Bull et al., 1984; Hilburn e Sattler, 1986), mas já era perceptível que a dispersão e a especificidade do patógeno para subpopulações de carrapatos podem ter significativas considerações para os esforços de controle de doenças (Sattler et al., 1986; Kubasu, 1992). Adicionalmente, com o passar dos anos, diferentes marcadores moleculares têm sido utilizados em estudos filogenéticos e populacionais de carrapatos (Norris et al., 1996; Mixson et al., 2006; Nava et al., 2009; Burger et al., 2012).

Dessa forma, marcadores moleculares podem fornecer novos conhecimentos sobre a estrutura populacional (Kanduma et al., 2012), o que permitiria, por exemplo, uma compreensão mais profunda das populações de *R. microplus* (Burger et al., 2014). Nesse sentido, apesar de estudos anteriores mostrarem que populações de *R. microplus* apresentavam ausência de divergência entre as populações das Américas (Labruna et al., 2009), o avanço do conhecimento e do aprimoramento das ferramentas de análise populacional, caracterizaram a formação de clado constituído por populações de *R. microplus* do Brasil, China e Camboja (Burger et al., 2014), demonstrando uma nova compreensão sobre a diversidade populacional desta espécie.

Para o gênero *Dermacentor*, poucos estudos foram realizados objetivando a análise da diversidade genética. De acordo com estudo molecular de Crosbie et al. (1998), *Dermacentor hunteri* Bishopp, 1912, apresenta pouca variação genética e se trata de um grupo monofilético, entretanto o oposto foi observado em *Dermacentor albipictus*. Já os estudos conduzidos com *Dermacentor andersoni* Stiles, 1908 em áreas com características divergentes, Lysyc e Scoles (2008) observaram que em uma delas o nível de diversidade genética foi maior que em outra. É possível que essa divergência possa ter relação com isolamento geográfico (Lysyc e Scoles, 2008, Patterson et al., 2009).

Para investigar a variação genotípica de *D. albipictus*, considerada até então taxonomicamente confusa, estudo com abordagens integrativas, utilizando dados moleculares e morfológicos, concluíram que se tratava de uma única espécie (Leo et al., 2010).

Recentemente, um estudo molecular foi conduzido, indicando que o gênero *Dermacentor* é composto de pelo menos duas linhagens: Eurásia (Clado I), constituída por *Dermacentor everestianus* Hirst, 1926, *Dermacentor silvarum* Olenov, 1931, *Dermacentor nuttalli* Olenov, 1928 e *Dermacentor marginatus* Sulzer, 1776; e Neártico (Clado II), composta por *D. variabilis*, *D. nitens* e *D. albipictus* (Chen et al., 2014).

Além disso, sobre a espécie *D. nitens*, mesmo não tendo sido possível detectar diferenças morfológicas significativas em amostras provenientes da Colômbia, inferências filogenéticas moleculares indicaram que a espécie apresentou polimorfismo, o que resultou em um clado que separou as sequências da localidade Letícia das demais sequências Colombianas (Rivera-Páes et al., 2018).

No Brasil, um estudo morfológico constatou a variação sazonal do número aerópilos em placas espiraculares em *D. nitens*, considerando como uma indicação do estado adaptativo (Gazêta et al., 2001). Outros dois estudos foram conduzidos no país e relataram a ocorrência de diversidade haplotípica com divergência entre as diversas populações de *R. microplus* e *D. nitens* (Csordas et al., 2016, 2017), permitindo supor que tal divergência pode, de alguma forma, influenciar na competência vetorial desses ixodídeos. Entretanto, o conhecimento sobre a diversidade genética e seus impactos na competência vetorial da espécie do gênero *Dermacentor* com maior importância para o Brasil permanece incipiente.

Por outro lado, estudos relacionados à diversidade genética de espécies do gênero *Amblyomma* são inúmeros no Brasil, devido a sua relevância para saúde pública, e têm demonstrado variedade haplotípica relativamente grande, em relação a outros gêneros de carrapatos (Csordas et al., 2016, 2017; Caetano et al., 2017). E, em algumas espécies de *Amblyomma*, há indícios de estruturação populacional associada às distâncias genéticas e

geográficas ou até mesmo a aspectos ecológicos (Martins et al., 2016; Ogrewalska et al., 2016; Bitencourth et al., 2017, 2019; Founier et al., 2019).

Nesse sentido, a partir do cenário apresentado para *R. microplus* e *D. nitens*, o estudo sobre as relações filogenéticas e filogeográficas verificadas no país, bem como sobre seus possíveis patógenos torna-se importante, sabendo que tanto a diversidade do vetor quanto sua rápida mudança genética podem influenciar fortemente na dinâmica de interação hospedeiro – vetor – patógeno (Fussmann et al., 2007; Patterson et al., 2009). Além disso, a variação filogeográfica dentro de uma espécie pode influenciar a capacidade de adquirir, manter e transmitir agentes patogênicos (McLain et al., 1995), e assim, modificar o cenário epidemiológico de transmissão de bioagentes.

1.2.1 DNA mitocondrial (mtDNA)

As mitocôndrias das células eucarióticas possuem um genoma próprio e independente do genoma nuclear e a análise do DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido amplamente utilizada em estudos de genética de populações de carrapatos (Burkman, 2009; Krakowetz et al., 2011; Beati et al., 2012). O mtDNA é particularmente, adequado para esses estudos porque seus genes evoluem, em média, mais rapidamente do que os nucleares (Li, 1997). Essa taxa de evolução acelerada do mtDNA é, predominantemente, devida ao seu tamanho reduzido (aproximadamente quatro vezes menor que o genoma nuclear), a transmissão genética horizontal exclusivamente materna, assim como à ausência recombinação meiótica (Simon et al., 1994). E, devido ao seu tamanho reduzido e abundância de mitocôndrias nas células, é mais fácil de sequenciar do que o genoma nuclear (Shao e Barker, 2007).

O mtDNA dos carrapatos é pequeno e compacto, com comprimento de 14 a 15 Kb e formado por uma sequência de 37 genes, dispostos ao longo de uma dupla cadeia de

nucleotídeos em forma circular, sendo estes: dois genes que codificam os RNA ribossômicos, 22 genes que codificam os RNA de transferência e 13 genes que codificam os RNA mensageiros correspondentes às subunidades das enzimas mitocondriais (Campbell e Barker, 1999).

De forma geral, a maioria das permutações genéticas do mtDNA são simples substituições de bases, algumas são pequenas adições ou supressões de um ou poucos nucleotídeos (Hillis et al., 1996) e, talvez a característica mais importante do mtDNA dos animais, é que são herança materna (exceto raras exceções). Dessa forma, o mtDNA agrupa muitas características desejáveis a um marcador evolutivo, e tem sido amplamente utilizado para analisar as relações entre espécies e a dinâmica das trocas que se produzem em níveis micro e macro-evolutivos.

Os genes mitocondriais se dividem em duas categorias: genes de codificação de proteínas e genes ribossômicos (12S rDNA e 16S rDNA), que não são separados por espaçadores internos transcritos (Cruickshank, 2002).

1.2.1.1 Citocromo Oxidase Subunidade 1 (COX-I)

A subunidade 1 da Citocromo Oxidase (COX-I) do mtDNA faz parte deste complexo gênico codificante de proteínas transmembranas, esta subunidade está envolvida no transporte elétrico e catálise da cadeia respiratória de organismos eucariotos. Este gene vem sendo alvo de estudos populacionais de variabilidade genética pela sua universalidade e importância evolutiva (Hebert et al., 2013).

A análise deste gene auxilia na resolução de divergências sobre a diversidade animal, devido a sua taxa de mutação ser frequentemente rápida para distinguir espécies estreitamente relacionadas e, como sua sequência tende a ser conservada entre os membros da mesma

espécie, este gene funciona como uma importante ferramenta para análise do sistema taxonômico (Caporale et al., 1995; Xu et al., 2003).

1.2.1.2 Região controle (*D-loop*)

Estudos demonstraram que as sequências de mtDNA são úteis para distinguir espécies de carrapatos estreitamente relacionadas, e devem ser, portanto, adequadas para identificar populações distintas dentro de uma espécie (Caporale et al., 1995; Xu et al., 2003). Este é, particularmente, o caso da região controle ou região *D-loop* (*displacement loop*), cuja função ainda não é clara, mas pesquisas recentes sugerem que ela participa da organização do nucleóide mitocondrial (Leslie, 2007). Sabe-se que o *D-loop* evolui muito rapidamente (Li, 1997) e essa variabilidade o tornou um dos genes mais utilizados para os estudos de relação abaixo do nível de espécie (Taylor et al., 1993; Simon et al., 1994).

1.2.1.3 12S ribossomal DNA

Para estudos de filogenia de carrapatos que sofreram eventos de especiação recente a análise do 12S rDNA tem sido amplamente realizada (Murrell et al., 1999; Norris et al., 1999; Beati e Keirans, 2001), assim este marcador apresenta características que o tornam eficiente no estudo das relações filogenéticas e de estrutura de populações de carrapatos, por apresentar regiões conservadas alternadas com regiões altamente variáveis (Norris et al., 1996; Norris et al., 1999; Beati e Keirans, 2001; Barker e Murrell, 2004; Mixson et al., 2006; Casati et al., 2008; Burkman, 2009; Krakowetz et al., 2011; Beati et al., 2012; Kovalev e Mukhacheva, 2012).

1.3 Principais bioagentes transmitidos pelos carrapatos

Em virtude do prolongado período de alimentação/ repasto sanguíneo, os membros da família Ixodidae são vetores de uma grande diversidade de agentes patogênicos, incluindo vírus, causadores de encefalites e febres hemorrágicas (Piesman e Eisen, 2008; Kilpatrick e Randolph, 2012); protozoários, causadores de babesioses (Suarez e Noh, 2011); e bactérias, causadoras de tularemia, erliquiose, doença de lyme, febre recorrente, além das febres maculosas (Parola e Raoult, 2006).

1.3.1 *Rickettsia* sp.

Dentre as doenças veiculadas por estes artrópodes, as riquetsioses são consideradas as mais antigas dentre as doenças zoonóticas transmitidas por vetores (Parola et al., 2013) e têm recebido atenção por se tratar de uma ameaça emergente global (Lim et al., 2012). São doenças causadas por bactérias Gram-negativas agrupadas na família *Rickettsiaceae*, especificamente pelo gênero *Rickettsia* (Galvão et al., 2005; Jacinto et al., 2005).

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias intracelulares obrigatórias pertencentes à ordem Rickettsiales e a família Rickettsiaceae, descritos como formas cocobacilares, pequenos bastonetes ou bacilos gram-negativos (0,3 a 0,5 µm por 0,8 a 2,0 µm). Estas bactérias podem se localizar no citoplasma e/ou núcleo da célula hospedeira (Eremeeva e Dasch, 2000; Eremeeva et al., 2000). Em infecções naturais, o principal alvo em animais vertebrados são as células endoteliais, nas quais o bioagente se multiplica, causando vasculites com a ativação de plaquetas e do sistema de coagulação (Greene e Breitschwerdt, 2006). Nos artrópodes vetores, a bactéria permanece em células intestinais, túbulos de

Malpighi, hemolinfa, glândulas salivares e ovários (Burgdorfer, 1970; Billings et al., 1998; Yu e Walker, 2003).

As riquetsias apresentam crescente interesse na saúde pública e diferentes espécies têm sido identificadas em diversos países nos últimos anos, utilizando métodos de biologia molecular (WHO, 1988; La Scola e Raoult, 1997; Azad e Beard, 1998; Paddock et al., 2004) com constantes revisões taxonômicas e filogenéticas, indicando diferentes proposições para família Rickettsiaceae (Gillespie et al., 2007; Fournier et al., 2008; Gillespie et al., 2008, Weinert et al., 2009a; Weinert et al., 2009b). Entretanto, classicamente, com base em critério antigênico e molecular, as espécies do gênero *Rickettsia* estão subdivididas em Grupo Ancestral (GA), Grupo Tifo (GT) e Grupo Febre Maculosa (GFM) (Stothard et al., 1994; Roux et al., 1997; Roux e Raoult, 2000; Yu e Walker, 2003).

No GFM são reconhecidas cerca de 30 espécies, destas, até o início do presente século, apenas nove eram consideradas patogênicas para o homem. Hoje são reconhecidas pelo menos 15 espécies patogênicas deste grupo: *Rickettsia aeschlimannii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia akari*, *Rickettsia australis*, *Rickettsia conorii*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia helvetica*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia mongolotimonae*, *Rickettsia parkeri*, *R. rickettsii*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia slovacica*. Com exceção de *R. akari* e *R. felis* transmitidas, respectivamente, por ácaros e pulgas, todas as demais são veiculadas por carrapatos (Raoult e Roux, 1997; Graves e Stenos, 2003; Brouqui et al., 2004, Parola et al., 2013).

Algumas riquetsias do GFM apresentam patogenicidade comprovada e potencial para induzir, em humanos, a Febre Maculosa, doença com característica clínica e evolução variáveis, segundo a espécie do bioagente envolvido (Stothard et al., 1994; Roux et al., 1997; Roux e Raoult, 2000; Paddock et al., 2004). Dentro desse grupo, *R. rickettsii* foi considerada, durante todo século XX, a única espécie transmitida por carrapatos associada com doença humana nas Américas (Parola et al., 2009).

No Brasil, a Febre Maculosa Brasileira (FMB) causada pela *R. rickettsii* é caracterizada por febre alta, manifestações hemorrágicas graves e altas taxas de letalidade, sendo registrada principalmente nas regiões sudeste e na parte norte da região sul, em áreas antropizadas de biomas de Cerrado e Mata Atlântica. Os carrapatos *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma aureolatum* são os vetores conhecidos e as capivaras, os cavalos e os cães são os hospedeiros vertebrados envolvidos no ciclo (Oliveira et al., 2016a).

Uma outra riquetsiose que acomete humanos e que ocorre no país é a FM causada pela *R. parkeri* (Nieri-Bastos et al., 2018, Faccini-Martínez et al., 2018), caracterizada por febre, erupção cutânea, escara de inoculação, linfadenopatia, dor de cabeça, mialgia, artralgia e ausência de óbitos (Faccini-Martínez et al., 2018). Esta forma branda da FM foi recentemente registrada nas regiões sul, sudeste e nordeste do Brasil, em áreas preservadas ou pouco antropizadas do bioma Mata Atlântica (Spolidorio et al., 2010; Silva et al., 2011; Krawczak et al., 2016, Faccini-Martínez et al., 2018). O carrapato *Amblyomma ovale* é o vetor comprovado e os cães são os hospedeiros associados ao ciclo (Moerbeck et al., 2016; Faccini-Martínez et al., 2018; Nieri-Bastos et al., 2018).

Entretanto, casos de FM registrados em novos focos do Brasil apontam perfis clínicos diferentes àqueles já estabelecidos, com ausência de vetores já reconhecidos em esses focos ou ausência da detecção da infecção por riquetsia nesses vetores, não sendo possível, dessa forma, caracterizar o mecanismo de circulação do bioagente naqueles focos (Oliveira et al. 2016a-b; 2017; 2018). Além disso, durante as últimas décadas, outras espécies patogênicas ou potencialmente patogênicas de riquetsias, bem como de novas espécies de carrapatos com potencial vetor, foram relatados para o Brasil (Labruna et al., 2011; Parola et al., 2013; Nieri-Bastos et al., 2014; Nunes et al., 2015; Moerbeck et al., 2016; Weck et al., 2016; Silva et al. 2017a, 2018).

Devido a ocorrência em toda a extensão do território brasileiro, as duas espécies de carrapatos *R. microplus* e *D. nitens*, têm sido também encontradas em regiões onde a FM é

endêmica. Contudo, mesmo considerando os relatos de infecção em *R. microplus* por diferentes espécies de riquétsias pertencentes ao GFM (Bermúdez et al., 2009; Moura-Martiniano et al., 2014; Pesquera et al., 2015), seu envolvimento na transmissão dessas bactérias ainda não está esclarecido (Cordeiro et al., 2018a). Nesse contexto, o carrapato *D. nitens* também teria o mesmo potencial que *R. microplus*, e já fora detectado com riquétsia causadora da FM (Bermúdez et al., 2009; Gehrke, 2010).

1.3.2 Anaplasma sp.

Dentre as espécies do gênero *Anaplasma*, *Anaplasma phagocytophilum* (anteriormente denominada *Ehrlichia phagocytophila*) se destaca por ser o agente causador da Anaplasmoze Granulocítica Humana (anteriormente conhecida como Erliquiose Granulocítica Humana). Esta bactéria mantém seu ciclo de vida em carrapatos da família Ixodidae e parasita mamíferos como hospedeiros intermediários (Dumler, 2005; Dahlgren et al., 2011; Biggs et al., 2016). Ao infectar animais domésticos como bovinos e cavalos, que servem como reservatórios e aumentam o risco de contágio para seres humanos, esses parasitas causam prejuízos econômicos elevados (Oliveira et al., 2010), conforme citado anteriormente sobre a infecção de bovinos com *A. marginale* (ver seção 1.1.1 da Introdução).

No Brasil, embora *A. phagocytophilum* tenha sido encontrada apenas infectando cães e carrapatos (Santos et al., 2013), outras espécies como *A. marginale* e *Anaplasma platys* foram encontrados infectando animais domésticos em todo o país (Pohl et al., 2013; Souza et al., 2013).

A espécie *A. platys* é a bactéria que infecta plaquetas de cães, causando a doença conhecida como Anaplasmoze Trombocítica Canina (Harvey, 2006). Carrapatos ingurgitados foram examinados no Japão e o DNA de *A. platys* foi amplificado (Inokuma et al., 2000). No

Brasil, o agravo já foi descrito em várias regiões, com baixa prevalência na região sul (Lasta et al., 2013) e alta no centro-oeste (Witter et al., 2013) e com evidências de que *A. platys* é transmitida através da picada de ixodídeos.

Por fim, responsável pela Anaplasmosse Bovina, *A. marginale* é uma bactéria transmitida por carrapatos que causa perdas econômicas significativas na pecuária e é encontrada em regiões onde os carrapatos vetores são endêmicos. Sabe-se que ao menos 20 espécies de carrapatos ixodídeos participam na transmissão de *A. marginale*, incluindo *Dermacentor* spp. e *Rhipicephalus* spp. (Kocan et al., 2010). Nas regiões tropicais e subtropicais, *R. microplus* é o vetor da Anaplasmosse Bovina, pois apesar da alta especificidade de hospedeiro de *R. microplus* para o gado, esta espécie de carrapato também pode ser encontrada parasitando pequenos ruminantes (Brito et al., 2005).

1.3.3 Erlichia sp.

Bactérias do gênero *Ehrlichia* integram a ordem Rickettsiales, pertencendo à família Anaplasmataceae (Dumler et al., 2001) e antes da disponibilidade de técnicas moleculares, as espécies pertencentes ao gênero *Ehrlichia* eram agrupadas de acordo com seu tropismo celular. Embora tenha sido descrita primeiramente em cães na Argélia em 1935, poucos foram os estudos realizados na época e dados epidemiológicos destas infecções não foram averiguados durante muitos anos. Porém, o reconhecimento desta erliquiose como uma doença potencialmente fatal para humanos em 1980, levou a intensificação de estudos sobre estes organismos com a utilização de técnicas moleculares, resultando na reclassificação taxonômica do gênero (Cohn, 2003).

A erliquiose é uma doença infecciosa que afeta animais e humanos, é causada por diferentes espécies do gênero *Ehrlichia* e transmitida por carrapatos. O carrapato

Rhipicephalus sanguineus Latreille, 1806 sensu lato é considerado o vetor de *Ehrlichia canis* para cães (Groves et al., 1975), já a espécie *Amblyomma americanum* Linnaeus, 1758 atua como um vetor de *Ehrlichia chaffeensis* e *Ehrlichia ewingii* para veados, caninos e humanos (Cohn, 2003), enquanto *Amblyomma hebraeum* (Koch, 1844) e *Amblyomma variegatum* Fabricius, 1794 estão associados à transmissão de *Ehrlichia ruminantium* a ruminantes (Allsopp, 2010). Além disso, um novo genótipo de *Ehrlichia* filogeneticamente próximo a *E. canis* (*Ehrlichia* sp. UFMG-EV) foi identificado em carrapatos *R. microplus* no Brasil (Cabezas Cruz et al., 2012).

1.3.4 Borrelia sp.

Borrelias são responsáveis pela doença de Lyme (DL) ou Borreliose de Lyme, pertencem ao complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) e incluem, atualmente, 20 genoespécies conhecidas, sendo que existem outras espécies que ainda necessitam de caracterização filogenética. Atualmente, oito destas genoespécies são clinicamente relevantes: *B. burgdorferi* sensu stricto (s.s.), *Borrelia garinii*, *Borrelia afzelii*, *Borrelia lusitaniae*, *Borrelia valasiana*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia bissettii* e *Borrelia spielmanii*. As genoespécies *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii* têm sido as mais diretamente relacionadas às manifestações clínicas (Socolovschi et al., 2009a; Stanek e Reiter, 2011; Franke et al., 2013; Ruzic-Sabljić et al., 2016; Cutler et al., 2017).

No Brasil foi ponderado o fato de haver diferenças significativas em aspectos epidemiológicos e clínico-laboratoriais entre a doença presente e a DL. E dessa forma, Gauditano e colaboradores sugeriram a mudança de nomenclatura da enfermidade para Síndrome de Baggio-Yoshinari, no intuito de desvincular a doença brasileira da DL e incentivar as pesquisas desta enfermidade emergente no país (Gauditano et al., 2005; Santos

et al., 2010).

Diferentes artrópodes podem se infectar com *B. burgdorferi* s.l., mas somente carrapatos parecem ter importância como vetores no seu ciclo epidêmico, variando em espécie, segundo o continente, sendo carrapatos do gênero *Ixodes* considerados os principais transmissores (Biesiada et al., 2012; Steere et al., 2005; Socolovschi et al., 2009a; Burgdorfer et al., 1982; Gayle e Ringdahl, 2001; Barbieri et al., 2013; Sebastian et al., 2016; López-Pérez et al., 2019).

A borreliose bovina é uma dessas doenças que acometem animais de produção, causada pela espiroqueta *Borrelia theileri* e transmitida pela picada de espécies de carrapatos infectados do gênero *Rhipicephalus* e subgênero *Boophilus*. Várias espécies do gênero são capazes de transmitir o agente e são encontrados em vários continentes (McCoy et al., 2014).

Naturalmente a espiroqueta está associada aos bovinos e com elevada taxa de infecção em *R. microplus* (Smith et al., 1985). Curiosamente, *B. theileri* foi observada a partir de *R. microplus* coletado no cavalo (Ypaguirre et al., 2007). Posteriormente em *R. microplus* de bovino (Cordeiro et al., 2018b).

Assim como o reservatório de *B. theileri* detectada no Brasil, não é conhecido se *R. microplus* representa de fato um vetor competente para sua transmissão e propagação entre espécies hospedeiras distintas também é uma incógnita (Ypaguirre et al., 2007).

Os relatos clínicos que se assemelham à DL no Brasil podem estar associados a borrelia mencionada, entretanto a determinação de sua ecologia, bem como o potencial patogênico são necessários para saber se estão relacionados (Ypaguirre et al., 2007). O DNA de *B. burgdorferi* s.s. foi detectado em carrapatos da espécie *D. nitens* coletados em equinos no Brasil, esse relato aponta para a importância da comunidade hospedeira na ecologia da DL, bem como informação para esclarecer a prevalência de genoespécies do complexo *Borrelia burgdorferi* e a capacidade vetorial dos carrapatos (Gonçalves et al., 2013).

1.3.5 *Babesia* sp. e *Theileria* sp.

A babesiose é uma patologia que também tem como vetores os carrapatos, causada por uma infecção de eritrócitos por protozoários membros do filo Apicomplexa, ordem Piroplasmida e gênero *Babesia* (Gray et al. 2019).

Organismos do gênero *Babesia* são, em sua maioria, parasitas de mamíferos e as espécies mais conhecidas causam doenças em animais de companhia e de produção. Entretanto, já foram encontradas babesias em hospedeiros selvagens e algumas espécies são de características zoonóticas (Schnittger et al., 2012).

O impacto econômico da doença causada pelo gênero é considerável, principalmente em bovinos e equinos, mas pequenos ruminantes e animais de companhia são também afetados. Além disso, há crescente interesse em estudos com *Babesia* spp. como agentes zoonóticos. A doença ocorre quando a taxa de infecção e perda de eritrócitos excede a taxa de substituição, dando origem a anemia com demais problemas de saúde (Bock et al., 2004; Tamzali, 2013).

A espécie *B. caballi* e *T. equi* (Ueti et al., 2008) são os agentes causadores da Piroplasmose Equina, agravo considerado endêmico em regiões tropicais, subtropicais e algumas zonas temperadas do mundo (Shkap et al. 1998; Steinman et al. 2012) e infecções mistas pelos dois bioagentes são comuns em áreas endêmicas (Scoles e Ueti 2015). Esta espécie, antes conhecida como *Babesia equi* e atualmente denominada *T. equi*, apresenta características em seu ciclo de vida que resultaram em sua transferência para o gênero *Theileria* (Uilenberg, 2006).

Esses dois parasitas têm diferenças biológicas, mas causam patologia semelhante e apresentam ciclos de vida e relações vetoriais semelhantes (Rothschild, 2013). Os carrapatos são considerados hospedeiros definitivos para *T. equi* e *B. caballi*, pois o parasita deve passar

pelo desenvolvimento do estágio sexual do carrapato para completar seu ciclo de vida (Zapf e Schein, 1994). Uma vez infectado, o animal permanece portador por longos períodos e age como fonte de infecção para os carrapatos (Laus et al., 2015).

Atualmente, são conhecidas mais de 15 espécies de carrapatos dos gêneros *Dermacentor*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* que podem transmitir tais bioagentes. Enquanto *R. microplus*, mesmo com afinidade por gado, também pode transmitir *T. equi* aos cavalos (Friedhoff et al., 1990; Stiller et al., 2002, Nogueira et al., 2017), o carrapato *D. nitens* também é um ectoparasita importante que afeta a saúde animal, transmitindo *B. caballii* entre equídeos (Roby e Anthony, 1963).

1.4 Justificativa

Em áreas onde a carga parasitária de carrapatos em cavalos e gado costuma ser alta (Oliveira et al., 2003; Teglas et al., 2005), o risco de infecção por bioagentes em trabalhadores ao ar livre, agricultores ou turistas que estão em contato com equídeos é elevada (Ghane et al., 2016; Donohoe et al., 2018). Como os principais ectoparasitas que acometem a produção bovina e equina no Brasil são, respectivamente, *R. microplus* e *D. nitens*, e também como pouco se sabe sobre a participação destes carrapatos nos ciclos enzoótico e epidêmico dos bioagentes por eles veiculados, estas espécies são o foco principal desta tese, onde foi analisado se existe a relação entre a diversidade genética em populações destes carrapatos, coletados em áreas de investigação de focos, vigilância e focos silenciosos da FM no país.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar a diversidade genética nas populações de *R. microplus* e *D. nitens* e a infecção por patógenos transmitidos por carrapatos em diferentes biomas do Brasil.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Realizar análises filogenéticas, filogeográficas e de estrutura populacional de *R. microplus* e *D. nitens* a partir de dados moleculares;
- Investigar a presença e caracterizar molecularmente os patógenos transmitidos por carrapatos (*Rickettsia* sp., *Anaplasma* sp., *Ehrlichia* sp., *Borrelia* sp., *Babesia* sp. e *Theileria* sp.) em espécimes de *R. microplus* e *D. nitens*;
- Observar se há relação entre a diversidade genética de *R. microplus* e *D. nitens*, com as espécies dos patógenos identificados nesses.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de estudo e coleta de artrópodes

No período de 2011 a 2019, durante Investigação de Focos ou Vigilância de Ambiente para FM, realizadas pela Rede Nacional de Vigilância Ambiental para Doenças Transmitidas por Carrapatos, as equipes das Secretarias Estaduais e Municipais de Saúde (Ministério da Saúde do Brasil), em parceria com o Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN, Fundação Oswaldo Cruz) realizaram coletas de ectoparasitas ápteros em hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, de áreas rurais e urbanas das cinco regiões do Brasil, compreendendo áreas com características fisiogeográficas distintas de diferentes biomas.

Foram coletados 7.678 espécimes de *R. microplus* (Apêndice A) e 807 espécimes de *D. nitens* (Apêndice B), de 17 Estados do país: Tocantins (TO), Roraima (RR) e Rondônia (RO) – região Norte; Bahia (BA), Ceará (CE), Maranhão (MA), Pernambuco (PE) e Rio Grande do Norte (RN) – região Nordeste; Goiás (GO) e Mato Grosso (MT) – região Centro-Oeste; Espírito Santo (ES), Minas Gerais (MG), Rio de Janeiro (RJ) e São Paulo (SP) – região Sudeste; Paraná (PR), Rio Grande do Sul (RS) e Santa Catarina (SC) – região Sul (Figura 2).

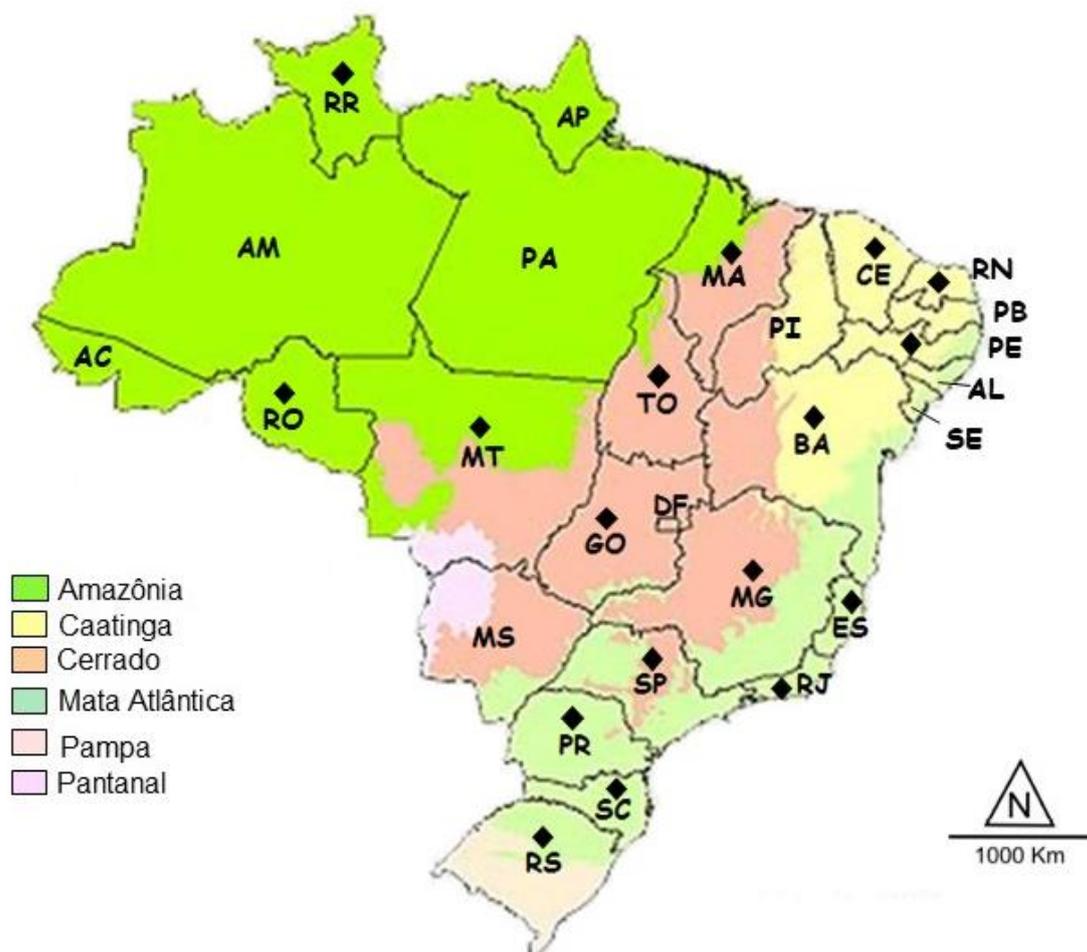


Figura 2. Distribuição geográfica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 coletados parasitando hospedeiros vertebrados e/ou livres no ambiente, por unidade federativa e bioma, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019. Os estados marcados com losango preto representam os estados de coleta de carrapatos (Fonte: Modificado de IBGE, 2007).

Os ectoparasitos foram coletados sobre animais domésticos como cães, bois, cavalos, asnos, cabras e ovelhas, além de animais silvestres como cervo-do-pantanal, tamanduá-bandeira e anta, presentes na localidade, bem como no ambiente (Apêndice A e B). A técnica de obtenção de carrapatos nos hospedeiros foi por torção em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma e no ambiente a coleta foi realizada seguindo a técnica de arrasto de flanela e busca ativa. Os artrópodes coletados foram acondicionados em microtubos estéreis contendo isopropanol P. A. e encaminhados para o LIRN para identificação.

3.2 Identificação taxonômica dos carrapatos

Todos os espécimes foram identificados morfologicamente, utilizando chaves dicotômicas apropriadas (Aragão e Fonseca, 1961; Barros-Battesti et al., 2006) e descrições morfológicas (Marquez et al., 1992; Amorim et al., 1997; Maroun et al., 1999.). Para detecção de patógenos e correlação entre eles e a diversidade genética dos carrapatos estudados, as amostras de carrapatos adultos e ninfas foram definidas por espécime único. Dessa forma, as amostras com larvas foram apenas utilizadas para análise da infecção de patógenos, pois seu DNA foi extraído em grupos de 10 espécimes por amostra. O total de amostras analisadas foi de 797, sendo 620 amostras de *R. microplus* e 177 amostras de *D. nitens*.

3.3 Extração de DNA genômico (DNAg)

Inicialmente, o DNA genômico (DNAg) das amostras foi extraído através da técnica de extração por solução saturada de NaCl (Aljanabi e Martinez, 1997) e armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os artrópodes foram triturados em banho de N_2 , e ressuspensos em um volume máximo de 400 μl de solução 1 (NaCl 0,4 M; EDTA 2 mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM pH 8,0). Em seguida foi adicionado SDS 2% e 0,4 mg/ml Proteinase K (Ambion®, Austin, EUA) e o material incubado em banho – maria a 56 - 60 $^{\circ}\text{C}$ por 1 à 2 h. Após esta incubação, à mistura foi acrescentada de 2,57 mM de NaCl, homogeneizada e centrifugada 10.000 g por 30 min; o sobrenadante foi precipitado em igual volume de isopropanol. O DNAg foi ressuspensado em 30 μl de água ultra pura livre de DNase e RNase. Amostras representativas foram selecionadas aleatoriamente para quantificação em espectrofotômetro *NanoDrop™ 2000* (Thermo Scientific™, Waltham, EUA).

3.4 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para identificação molecular, análise filogenética e estudo sobre diversidade genética de *R. microplus* e *D. nitens*, as amostras foram submetidas à amplificação através da PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores e protocolos de amplificação disponíveis na literatura que objetivaram à amplificação de sequências parciais dos marcadores mitocondriais *D-loop*, COX-I e 12S rDNA (Tabela 1). As reações de PCR, foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems®, Carlsbad, EUA) e *T-Professional Gradient Thermocycler* (Biometra Ltd., Goettingen, Germany).

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de sequências parciais de genes mitocondriais de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Demarcentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897, coletados no período de 2011 a 2019 em diferentes biomas do Brasil

Gene/Região	Oligonucleotídeo	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Fragmento (pb)
12S ribosomal DNA	T1B T2A	AAACTAGGATTAGATACCCCT AAAGAGTGACGGGCGATATGT	360 ^a
Região Controle (<i>D-loop</i>)	<i>D-loop</i> 3-1x <i>D-loop</i> 4-1x	TAACCGCTGCTGCTGGCACAA TAACCCTTTATTCAGGCAT	440 ^b
Citocromo Oxidase I (COX-I)	COX-I.2F COX-I.2R	CTTCAGCCATTTTACCGCGA CTCCGCCTGAAGGGTCAAA	643 ^c

a: Beati e Keirans, 2001; b: Burkman, 2009; c: Csordas et al., 2016.

Para pesquisa de patógenos, as amostras foram submetidas à amplificação através da PCR, utilizando oligonucleotídeos iniciadores e protocolos de amplificação disponíveis na literatura que objetivaram a amplificação de sequências parciais de genes de riquetsia, anaplasma, erliquia, borrelia, babesia e theileria (Tabela 2). O preparo das soluções e as condições dos ensaios de PCR foram adequados para cada tipo de gene pesquisado (Sambrook e Russell, 2001), em cada reação foram utilizados os respectivos controles positivos (300 ng DNAg de: *R. parkeri*, *A. phagocytophillum*, *E. canis*, *B. burgdorferi* e *B. canis*) e como controle negativo água ultra pura livre de DNase e RNase. As reações de PCR, foram realizadas em termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems®, Carlsbad, EUA) e *T-Professional Gradient Thermocycler* (Biometra Ltd., Goettingen, Germany).

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de sequências parciais de genes de *Rickettsia*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Borrelia*, *Babesia* e *Theileria*, em amostras de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 coletados no período de 2011 a 2019 em diferentes biomas do Brasil

Gene	Oligonucleotídeo	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Fragmento (pb)
<i>Rickettsia</i> sp.			
<i>gltA</i> (citrate sintase)	CS2-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401 ^a
	CS2-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	
	CS4-239	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT	834 ^b
	CS4-1069	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	
<i>htrA</i> (antígeno 17-kDa)	17k-3	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	549 ^b
	17k-5	TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC	
<i>sca4</i> (gene D – antígeno de superfície celular PS120)	D1738fF	GTATCTGAATTAAGCAATGCG	744 ^c
	D2482R	CTATAACAGGATTAACAGCG	
<i>Rickettsia</i> Grupo Febre Maculosa + Grupo Tifo			
<i>ompB</i> (proteína externa de membrana rOmpB 120-kDa)	120.M59	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	862 ^d
	120.807	TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC	
<i>Rickettsia</i> Grupo Febre Maculosa			
<i>ompA</i> (proteína externa de membrana rOmpA 190-kDa)	Rr190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532 ^e
	Rr190.602n	AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	
<i>Anaplasma phagocytophilum</i> e <i>Anaplasma marginale</i>			
<i>p44</i> (proteína externa maior de membrana P44)	MSP3F	CCAGCGTTTAGCAAGATAAGAG	334 ^f
	MSP3R	GCCAGTAACAACATCATAAGC	
<i>Ehrlichia</i> sp.			
<i>dsb</i> (proteína de formação de ligação dissulfeto)	Dsb-330	GATGATGTCTGAAGATATGAAACAT	409 ^g
	Dsb-728	CTGCTCGTCTATTTTACTTCTTAAAT	
<i>Borrelia</i> sp.			
<i>16S rRNA</i> (subunidade menor do RNA ribossomal 16S)	16RNAR	CTGGCAGTGCGTCTTAAGCA	1336 ^h
	16RNAL	CATATAGTCTTACTATGCCACTTATG	
<i>Babesia</i> sp. / <i>Theileria</i> sp.			
<i>18S rRNA</i> (subunidade menor do RNA ribossomal 18S)	BT-F1	GTTTATCCTGCCAGTAGT	395-410 ⁱ
	BT-R1	GCCTGCTGCCTTCCTTA	
	BT-R2	TTGCGACCATACTCCCCCA	

a: Labruna et al., 2004b; b: Labruna et al., 2004a; c: Sekeyova et al., 2001; d: Roux e Raoult, 2000; e: Regnery et al., 1991; f: Zeidner et al., 2000; g: Doyle et al., 2005; h: Barbour et al., 1996; i: Criado-Fornelio et al., 2003.

3.5 Eletroforese, purificação e sequenciamento parcial de nucleotídeos

Para visualização dos produtos amplificados, os *amplicons* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e observados em scanner de gel *MiniBis Pro*® (DNR Bio-Imaging Systems Ltd., Jerusalém, Israel) com luz ultravioleta. Imagens digitais de cada gel foram geradas e arquivadas. Todos os produtos da PCR que corresponderam ao tamanho de DNA esperado, para cada marcador molecular, foram selecionados para purificação e sequenciamento.

As amostras de DNA amplificado foram purificadas utilizando o kit *Wizard*® *SV Gel and PCR Clean up System* (Promega©, Madison, EUA), seguindo as recomendações do fabricante

Posteriormente, os produtos da PCR purificados foram encaminhados para o sequenciamento do DNA, cujas reações foram executadas utilizando os mesmos oligonucleotídeos iniciadores empregados na PCR e o *BigDye*™*Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems®, Carlsbad, EUA), de acordo com o manual do fabricante. Em seguida, as amostras foram precipitadas, ressuspendidas em formamida e aplicadas em sequenciador automático *ABI 3730 DNA Analyzer* (Applied Biosystems®, Carlsbad, EUA) na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PDTIS) da Fiocruz/RJ para determinação das sequências em ambas as direções (3'-5' e 5'-3').

3.6 Edição e alinhamento das sequências nucleotídicas

As sequências obtidas foram editadas manualmente e as sequências consenso geradas no programa *ChromasPro 1.5* (Tecbhnelysium Pty Ltd, Queensland, Australia). Inicialmente, essas sequências foram identificadas, por avaliação de similaridade, através de análise

comparativa com as sequências depositadas no *GenBank*, utilizando o algoritmo BLASTN (NCBI, 2018).

As sequências produzidas e sequências disponíveis no banco de dados do *GenBank*, para cada gene analisado, foram automaticamente alinhadas através do algoritmo de alinhamento múltiplo *ClustalW* (Thompson et al., 1994), disponível no programa *MEGA 6.0* (Tamura et al., 2013). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente e, para os genes codificantes de proteína, foi realizada a tradução para sequência de aminoácidos para verificar a existência de pseudogenes e confirmar a existência de homologia, onde nenhum códon de parada foi observado.

3.7 Análise de dados de genética de populações e análise filogeográfica de *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*

Essas análises foram realizadas, separadamente, para as sequências de cada gene das espécies *R. microplus* e *D. nitens*. No programa *Arlequin* versão 3.5.2.2 (Excoffier e Lischer, 2010) foram executadas as análises de: número de haplótipos; número de sítios polimórficos; diversidade haplotípica e nucleotídica; número médio de diferenças nucleotídicas; testes de neutralidade Tajima's D (Tajima, 1989) e Fu's F_s (Fu, 1997) aplicados nas populações de *R. microplus* e *D. nitens* para testar a hipótese de mutação neutra e equilíbrio populacional; valores de estruturação F_{ST} de Wright (1951), estimados par a par para as populações de cada espécie, foram calculados para avaliar a diferenciação molecular entre as populações das espécies avaliadas; teste de Mantel (Mantel, 1967) para determinar se há correlação entre as distâncias geográficas [obtidas a partir do *Google Maps* (Google Maps, 2018)] e genéticas (baseadas nos valores de F_{ST}) nas populações dessas espécies; análise de variância molecular

(AMOVA) (Excoffier et al., 1992), realizada para detectar a diferenciação genética entre as populações de *R. microplus* e *D. nitens* avaliadas.

Para a análise filogeográfica, as relações entre os haplótipos de cada gene em cada espécie de ixodídeo estudada foram investigadas pela construção de redes de haplótipos, utilizando o algoritmo *Median-Joining* no programa *Network* versão 10.0.0.0 (Bandelt et al., 1999).

3.8 Análises filogenéticas

As reconstruções filogenéticas dos marcadores de DNA mitocondrial das espécies de ixodídeos estudadas, foram realizadas pelo método de Máxima Verossimilhança no programa *PhyML 3.0* (Guindon et al., 2010), com modelos evolutivos específicos para cada grupo de dados, estimados através do BIC (*Bayesian Information Criterion*) e indicados pelo programa *MEGA 6.0* (Tamura et al., 2013), e os valores de apoio estatístico dos ramos internos foram estimados com o teste aLRT (*approximate likelihood ratio test*) com 1000 réplicas (Anisimova e Gascuel, 2006).

Já as inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais de marcadores de DNA dos patógenos identificados, foram realizadas de forma individual para cada grupo de patógenos, com exceção dos genes riquetsiais, cujas análises filogenéticas foram realizadas de sequências concatenadas dos fragmentos obtidos (*gltA*, *htrA*, *ompA*, *ompB* e *sca4*). Os filodendogramas foram constuídos pelo método de Máxima Verossimilhança, com modelos evolutivos específicos para cada grupo de dados, estimados através do BIC e indicados pelo programa *MEGA 7.0* (Kumar et al., 2016), e os valores de suporte dos ramos internos foram calculados, utilizando bootstrap de 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

4 RESULTADOS

4.1 Confirmação molecular da identificação dos carrapatos

4.1.1 Rhipicephalus microplus

Foram geradas 82 sequências para o gene 12S rDNA (359pb), 163 sequências para o gene COX-I (639pb) e 52 sequências para a região *D-loop* (438pb) a partir dos espécimes de *R. microplus* submetidos aos estudos moleculares. A similaridade indicada pelo algoritmo BLASTN foi de 99.72 -100% com sequencias de *R. microplus* depositadas no *GenBank* (KC503261, KP143546, KP226159, KP226169 e MK234703).

4.1.2 Dermacentor nitens

Os espécimes de *D. nitens* empregados no estudo produziram cinco sequências para o gene 12S rDNA (380 pb), 74 sequencias para o COX-I (640 pb) e 72 sequencias para a região *D-loop* (460 pb). O algoritmo BLASTN indicou a similaridade de 99.78 -100% com sequencias de *D. nitens* depositadas no *GenBank* (AY008679, KC503258, KY441487 e KY441477).

4.2 Genética de populações dos carrapatos

4.2.1 Análises intrapopulacionais em *Rhipicephalus microplus*

4.2.1.1 Diversidade genética de *Rhipicephalus microplus* no Brasil

Foram identificados com base nas variações das sequências do gene COX-I e 12S rDNA (Apêndice C e D), o total de sete e três haplótipos, respectivamente. As sequências obtidas da região *D – loop* (Apêndice E) detectaram apenas um haplótipo (MT231549) e com isso não foi possível fazer análises intrapopulacionais.

No gene 12S rDNA foi verificado três haplótipos (hI, hII e hIII). O hI (com frequência de 97,56%) foi compartilhado em todas as populações estudadas. O hII (1,22%) e hIII (1,22%) foram exclusivos, onde hII foi de uma população de Mata Atlântica (MG) e h3 da população de Mata Atlântica – Caatinga (RN) (Tabela 3, Apêndice D).

Tabela 3. Distribuição e frequência dos haplótipos do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA) identificados nas populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil

Bioma	População	Ns	Haplótipos 12S rDNA (359 pb)		
			hI	hII	hIII
Amazônia	Rondônia	2	2		
	Roraima	1	1		
Cerrado	Minas Gerais	2	2		
Mata Atlântica	Ceará	20	20		
	Espírito Santo	16	16		
	Minas Gerais	28	27	1	
	Paraná	2	2		
	Rio de Janeiro	2	2		
Mata Atlântica-Caatinga	Rio Grande do Norte	5	4		1
Mata Atlântica-Pampa	Rio Grande do Sul	3	3		
Pampa	Rio Grande do Sul	1	1		
Total		82	80	1	1
Frequência (%)		(100,00)	(97,56%)	(1,22%)	(1,22%)

Ns: número de sequências.

A população de Mata Atlântica (MG) e a população de Mata Atlântica – Caatinga (RN) apresentaram um sítio polimórfico cada uma, dentre os 359 nucleotídeos analisados para o gene 12S rDNA. A diversidade haplótípica (h) foi de 1,000 com varrições no desvio padrão (SD) para todas as populações analisadas. E a nucleotídica (nd) foi de <0,0001 para quase todas as populações, com exceção dessas duas populações que apresentaram um sítio polimórfico, MG (0,0002) e RN (0,0011) (Tabela 4).

Tabela 4. Síntese da distribuição, variabilidade, diversidade genética e história demográfica dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) e 12S ribossomal DNA (12SrDNA) das populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil

Gene/ Região	Bioma	População	Tamanho amostral	<i>n</i>	<i>s</i>	<i>k</i> ± SD	<i>h</i> ± SD	<i>nd</i> ± SD	<i>F_s</i> de Fu (valor do <i>P</i>)	<i>D</i> de Tajima (valor do <i>P</i>)
COXI	Amazônia	Roraima	2	2	1	1,00 ± 1,00	1,000 ± 0,500	0,0016 ± 0,0022	<0,001 (0,24)	<0,001 (1,00)
	Caatinga	Ceará	3	2	1	0,67 ± 0,67	1,000 ± 0,272	0,0010 ± 0,0013	-2,197 (0,00*)	<0,001 (1,00)
	Cerrado	Goias	8	3	2	0,68 ± 0,57	1,000 ± 0,062	0,0011 ± 0,0010	-12,737 (0,00*)	-0,448 (0,35)
			6	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,096	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
			2	2	0	1,00 ± 1,00	1,000 ± 0,500	0,0016 ± 0,0022	<0,001 (0,25)	<0,001 (1,00)
	Cerrado-Mata Atlântica	Minas Gerais	10	2	1	0,20 ± 0,27	1,000 ± 0,045	0,0003 ± 0,0005	-28,456 (0,00*)	-1,112 (0,18)
	Mata Atlântica	Bahia	1	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	N.A.	<0,001 (1,00)
			43	2	1	0,28 ± 0,31	1,000 ± 0,005	0,0004 ± 0,0005	-34,03 (0,00*)	0,290 (0,77)
			6	2	1	0,53 ± 0,51	1,000 ± 0,096	0,0008 ± 0,0009	-8,984 (0,00*)	0,850 (0,85)
			20	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,016	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
			25	6	5	0,55 ± 0,47	1,000 ± 0,011	0,0008 ± 0,0008	-34,03 (0,00*)	-1,682 (0,02*)
			11	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,039	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
	Mata Atlântica-Caatinga	Rio Grande do Norte	13	2	1	0,38 ± 0,39	1,000 ± 0,030	0,0006 ± 0,0007	-34,03 (0,00*)	0,426 (0,79)
	Mata Atlântica-Pampa	Rio Grande do Sul	13	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,030	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
	12S rDNA	Amazônia	Roraima	2	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,500	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)
Roraima			1	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	N.A.	<0,001 (1,00)
Cerrado		Minas Gerais	2	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,500	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
			20	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,016	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
Mata Atlântica		Espírito Santo	16	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,022	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
			28	2	1	0,07 ± 0,15	1,000 ± 0,009	0,0002 ± 0,0004	-34,03 (0,00*)	-1,151 (0,13)
			2	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,500	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
			2	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,500	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
Mata Atlântica-Caatinga		Rio Grande do Norte	5	2	1	0,40 ± 0,44	1,000 ± 0,126	0,0011 ± 0,0014	-7,58 (0,00*)	-0,816 (0,31)
Mata Atlântica-Pampa		Rio Grande do Sul	3	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,272	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
Pampa	Rio Grande do Sul	1	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	N.A.	<0,001 (1,00)	

n: número de haplótipos; *s*: número de sítios polimórficos; *k*: número médio de diferenças nucleotídicas; *h*: diversidade genética/ haplotípica; *nd*: diversidade nucleotídica/ loci; SD: desvio padrão; N.A.: não se aplica; $P < 0,05$, exceto para *F_s* de Fu $P < 0,02$; * significativo; COXI: citocromo oxidase subunidade I.

Para o gene COX-I foram constatados sete haplótipos (h1 – h7), somente o h2 (em maior frequência, 62,57%) foi compartilhado por todas as populações estudadas. O h1 (33,73%) foi compartilhado nos biomas Amazônia (RR), Caatinga (CE), Cerrado (GO, MG e TO), Cerrado – Mata Atlântica (MG), Mata Atlântica (CE, ES e RJ) e Mata Atlântica – Caatinga (RN), com exceção do bioma Mata Atlântica – Pampa (RS), e ainda, no bioma Mata Atlântica também não foi detectado este haplótipo em três populações (BA, MG e PR). Foram observados haplótipos exclusivos em dois biomas distintos (Cerrado e Mata Atlântica), o h3 (0,62%) na população de GO e h4 (1,22%), h5 (0,62%), h6 (0,62%) e h7 (0,62%) na população do RJ (Tabela 5, Apêndice C).

Tabela 5. Distribuição e frequência dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) identificados nas populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil

Bioma	População	Ns	Haplótipos Citocromo oxidase subunidade I (639)						
			h1	h2	h3	h4	h5	h6	h7
Amazônia	Roraima	2	1	1					
Caatinga	Ceará	3	2	1					
Cerrado	Goiás	8	1	6	1				
	Minas Gerais	6		6					
	Tocantins	2	1	1					
Cerrado-Mata Atlântica	Minas Gerais	10	1	9					
Mata Atlântica	Bahia	1		1					
	Ceará	43	36	7					
	Espírito Santo	6	2	4					
	Paraná	20		20					
	Rio de Janeiro	25	1	19		2	1	1	1
	Minas Gerais	11		11					
Mata Atlântica-Caatinga	Rio Grande do Norte	13	10	3					
Mata Atlântica-Pampa	Rio Grande do Sul	13		13					
Total		163	55	102	1	2	1	1	1
Frequência (%)		(100,00)	(33,73)	(62,57)	(0,62)	(1,22)	(0,62)	(0,62)	(0,62)

Ns: número de sequências.

Ao analisar os 639 nucleotídeos do gene COX-I, o maior número de sítios polimórficos foi cinco na população do RJ - bioma Mata Atlântica e dois em GO – Cerrado. Apenas um sítio polimórfico em cada uma das duas populações de CE - Mata Atlântica e Caatinga, ES - Mata Atlântica, RN- Mata Atlântica- Caatinga, MG- Cerrado-Mata Atlântica e RR – Amazônia. A diversidade haplotípica foi de 1,000 com varrições no desvio padrão para todas as populações analisadas. E a nucleotídica variou de <0,0001 a 0,0016. A maior diversidade nucleotídica (0,0016) foi observada nos biomas e suas populações, Amazônia (RR) e Cerrado (TO), seguida por Cerrado (GO - 0,0011), Caatinga (CE - 0,0010), Mata Atlântica (RJ e ES - 0,0008), Mata Atlântica – Caatinga (RN - 0,0006), Mata Atlântica (CE - 0,0004), Cerrado – Mata Atlântica (MG - 0,0003). O menor valor de diversidade nucleotídica (<0,0001) foi nos biomas Cerrado (MG), Mata Atlântica (BA, PR e MG) e Mata Atlântica – Pampa (RS) (Tabela 4).

4.2.1.2 História evolutiva de *Rhipicephalus microplus* com base na rede de haplótipos

Na rede de haplótipos do gene 12S rDNA de *R. microplus*, todos os haplótipos foram geneticamente muito próximos, já que foram separados por uma única mutação. O haplótipo encontrado em maior número e em todas as populações {[RR e RO (Amazônia)], [MG (Cerrado)], [CE, ES, MG, PR e RJ (Mata Atlântica)], [RN (Mata Atlântica – Caatinga)], [RS (Mata Atlântica – Pampa)], [RS (Pampa)]} foi o h1. Os haplótipos exclusivos da população de MG pertencente ao bioma Mata Atlântica (h2) e a população do RN (h3) foram localizados nas extremidades da rede, levantando a hipótese de que são haplótipos recentes que divergem após uma mutação do haplótipo ao qual estão relacionados (Figura 3).

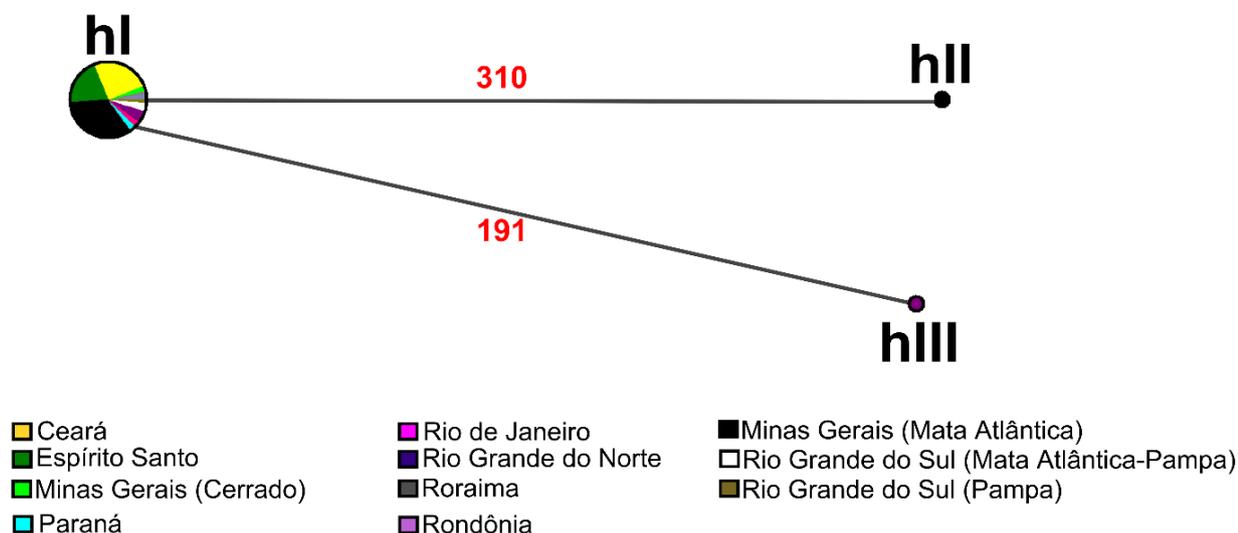


Figura 3. Rede de haplótipos do gene 12S ribossomal DNA (12S rDNA) de populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), de diferentes biomas e Estados do Brasil, gerada pelo método de median-joining com pós-processamento pelo método de máxima parcimônia. O tamanho dos círculos corresponde a frequências de cada haplótipo, números em vermelho indicam passos mutacionais.

A topologia da rede de haplótipos do gene COX-I de *R. microplus* informou que todos os haplótipos foram geneticamente muito próximos, visto que foram separados por uma ou duas mutações. O h2 foi o haplótipo encontrado em maior número e em todas populações do estudo. Assim como para a rede de haplótipos do gene 12S rDNA, a hipótese de que são haplótipos recentes que surgiram por mutação de uma base dos haplótipos compartilhados por diversas populações (h1 e h2) devido a posição dos haplótipos exclusivos, em baixa frequência, da população de GO (h3) e do RJ (h4, h5, h6 e h7) nas extremidades da rede (Figura 4).

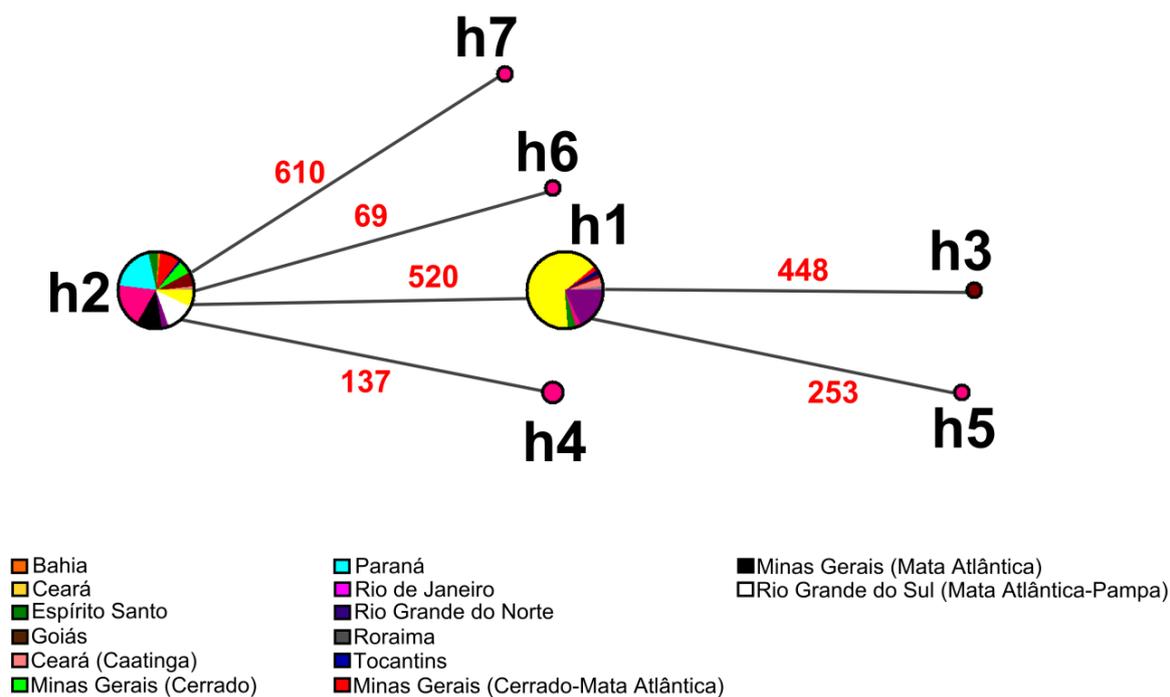


Figura 4. Rede de haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) de populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), de diferentes biomas e Estados do Brasil, gerada pelo método de median-joining com pós-processamento pelo método de máxima parcimônia. O tamanho dos círculos corresponde a frequências de cada haplótipo, números em vermelho indicam passos mutacionais.

4.2.1.3 Dinâmica demográfica e diferenciação genética nas populações de *Rhipicephalus microplus* do Brasil

Nos testes de neutralidade, o F_s de Fu apresentou valores significativos em duas populações de *R. microplus* MG (Mata Atlântica) e RN (Mata Atlântica - Caatinga) para o gene 12S rDNA, assim como em duas populações de *R. microplus* do CE (Mata Atlântica e Caatinga), nas populações de GO (Cerrado), MG (Cerrado – Mata Atlântica), ES e RJ (Mata Atlântica), população a qual também teve valor significativo para o teste D de Tajima para o gene COX-I (Tabela 4).

As estimativas de diferenciação genética entre as populações de *R. microplus* representados pelos valores de F_{ST} na comparação para a par revelou valores significativos para o gene COX-I entre as populações do bioma Mata Atlântica [(CE¹ x ES); (CE¹ x MG¹); (CE¹ x PR); (CE¹ x RJ)], e quando comparada com populações do Cerrado [(CE¹ x MG²) e (CE¹ x GO)], Cerrado – Mata Atlântica (CE¹ x MG³), Mata Atlântica – Pampa (CE¹ x RS), Mata Atlântica – Caatinga [(PR x RN); (RJ x RN); (MG¹ x RN)], Caatinga (PR x CE²). Apresentando assim valores significativos com todos os biomas contemplados no estudo, com exceção do bioma Amazônia. A diferenciação genética ainda foi significativa entre a população da Caatinga com Mata Atlântica (CE² x MG¹) e com Mata Atlântica – Pampa (CE² x RS), bem como entre população do Cerrado com Mata Atlântica – Caatinga [(MG² x RN); (GO x RN)], e por fim Mata Atlântica – Caatinga com Cerrado – Mata Atlântica (RN x MG³) e com Mata Atlântica – Pampa (RN x RS), todavia nenhum valor foi significativo para o gene 12Sr DNA (Tabela 6).

Tabela 6. Estimativas de diferenciação genética, representadas pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, entre as populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas do Brasil

Populações	Gene/ Região	Ceará ¹	Espírito Santo	Minas Gerais ¹	Bahia	Paraná	Rio de Janeiro	Ceará ²	Goiás	Minas Gerais ²	Tocantins	Minas Gerais ³	Rio Grande do Norte	Rondônia	Roraima	Rio Grande do Sul ¹
Ceará ¹	COXI 12S rDNA															
Espírito Santo	COXI 12S rDNA	0,42344*	0,00000													
Minas Gerais ¹	COXI 12S rDNA	0,75331*	0,33188 -0,02179													
Bahia	COXI 12S rDNA	0,66667 N.A.	-0,60000 N.A.	0,00000 N.A.												
Paraná	COXI 12S rDNA	0,78314*	0,47137 0,00000	0,00000 0,28850	0,00000 N.A.											
Rio de Janeiro	COXI 12S rDNA	0,60341*	0,03395 0,00000	-0,02031 -0,33216	-0,95311 N.A.	0,01219 0,00000										
Ceará ²	COXI 12S rDNA	-0,08727 N.A.	-0,05882 N.A.	0,79121* N.A.	-0,00000 N.A.	0,87193* N.A.	0,31152 N.A.									
Goiás	COXI 12S rDNA	0,49925* N.A.	-0,12285 N.A.	0,14685 N.A.	-0,80941 N.A.	0,25388 N.A.	0,01421 N.A.	0,04786 N.A.								
Minas Gerais ²	COXI 12S rDNA	0,73087* 0,00000	0,20000 0,00000	0,00000 -0,33216	0,00000 N.A.	0,00000 0,00000	-0,06913 0,00000	0,67568 N.A.	0,04906 N.A.							
Tocantins	COXI 12S rDNA	0,10932 N.A.	-0,40426 N.A.	0,71066 N.A.	-1,00000 N.A.	0,82533 N.A.	0,05848 N.A.	-0,61538 N.A.	-0,25639 N.A.	0,53846 N.A.						
Minas Gerais ³	COXI 12S rDNA	0,66537* N.A.	0,03597 N.A.	0,01030 N.A.	-1,00000 N.A.	0,07455 N.A.	-0,04653 N.A.	0,47661 N.A.	-0,01966 N.A.	-0,05882 N.A.	0,21348 N.A.					
Rio Grande do Norte	COXI 12S rDNA	-0,03607 0,31054	0,24344 0,25581	0,73245* 0,19698	0,50000 N.A.	0,79637* 0,00000	0,48143* -0,29032	-0,22006 N.A.	0,32289* N.A.	0,67296* -0,29032	-0,13721 N.A.	0,57941* N.A.				
Rondônia	COXI 12S rDNA	N.A. 0,00000	N.A. 0,00000	N.A. -0,33216	N.A. 0,00000	N.A. N.A.	N.A. 0,00000	N.A. N.A.	N.A. N.A.	N.A. 0,00000	N.A. N.A.	N.A. N.A.	N.A. N.A.	-0,29032		
Roraima	COXI 12S rDNA	0,10932 0,00000	-0,40426 0,00000	0,71066 -1,00000	-1,00000 N.A.	0,82533 0,00000	0,05848 0,00000	-0,61538 N.A.	-0,25639 N.A.	0,53846 0,00000	-1,00000 N.A.	0,21348 N.A.	-0,13721 -1,00000	N.A. 0,00000		
Rio Grande do Sul ¹	COXI 12S rDNA	0,76072* 0,00000	0,36970 0,00000	0,00000 -0,19810	0,00000 N.A.	0,00000 0,00000	-0,01057 0,00000	0,81690* N.A.	0,17467 N.A.	0,00000 0,00000	0,74757 N.A.	0,02743 N.A.	0,75000* -0,13208	N.A. 0,00000	0,74757 0,00000	
Rio Grande do Sul ²	COXI 12S rDNA	N.A. 0,00000	N.A. 0,00000	N.A. -1,00000	N.A. N.A.	N.A. 0,00000	N.A. 0,00000	N.A. N.A.	N.A. N.A.	N.A. 0,00000	N.A. N.A.	N.A. N.A.	N.A. -1,00000	N.A. 0,00000	N.A. 0,00000	N.A. 0,00000

Ceará¹- Amostras da Mata Atlântica; Ceará²- Amostras da Caatinga; Minas Gerais¹- Amostras da Mata Atlântica; Minas Gerais²- Amostras do Cerrado; Minas Gerais³- Amostras do Cerrado-Mata Atlântica; Rio Grande do Sul¹- Amostras da Mata Atlântica-Pampa; Rio Grande do Sul²- Amostras do Pampa; COXI, citocromo oxidase subunidade I; N. A., não analisado; *Significativo ($P < 0,05$).

A análise do F_{ST} par a par entre os grupos demonstrou que o grupo I (amostras de Mata Atlântica) e grupo III (Mata Atlântica-Caatinga) do gene 12S rDNA são geneticamente distintos, bem como os valores observados para o COX-I entre as populações grupo V (Mata Atlântica - Caatinga) em relação ao grupo I (Mata Atlântica), grupo III (Cerrado), grupo IV (Cerrado - Mata Atlântica) e grupo VII (Mata Atlântica – Pampa), e entre populações do grupo VII (Mata Atlântica – Pampa) com grupo I (Mata Atlântica) e grupo II (Caatinga) evidenciaram essa diferenciação genética significativa (Tabela 7). De forma complementar, o teste de Mantel indicou que a diferenciação genética não está associada à distância geográfica tanto para 12S rDNA quanto para COX- I (Tabela 8).

Os resultados da AMOVA apontaram que a maior parte da variância molecular dos haplótipos de *R. microplus* ocorreram dentro das populações estudadas para o 12S rDNA (92,88%) e para o COX-I entre populações dentro dos grupos - COX-I (68,17%). Esses resultados, quando associados aos valores obtidos na estatística, indicam que não há estruturação de *R. microplus* de acordo com os biomas (grupos) analisados, como pode se ver o F_{CT} com valor baixo e não significativo. Embora, é provável que exista alguma estruturação entre as populações, de acordo com as áreas/períodos de coleta, já que os índices de F_{SC} e F_{ST} foram significativos no gene COX-I, mas sem valores elevados (Tabela 9).

Tabela 7. Estimativas de diferenciação genética, representadas pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, entre os grupos delimitados e populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas do Brasil

População	Gene/ Região	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI
Grupo II	COXI	-0,02406					
	12S rDNA	-0,33314					
Grupo III	COXI	0,03587	0,22635				
	12S rDNA	0,40945*	-0,29032				
Grupo IV	COXI	0,08172	0,47661	-0,05126			
	12S rDNA	-0,19968	0,00000	-0,13208			
Grupo V	COXI	0,19185*	-0,22006	0,42620*	0,57941*		
	12S rDNA	-0,19968	0,00000	-0,13208	0,00000		
Grupo VI	COXI	-0,29424	-0,61538	-0,07745	0,21348	-0,13721	
	12S rDNA	-1,00000	0,00000	-1,00000	0,00000	0,00000	
Grupo VII	COXI	0,19163*	0,81690*	0,07967	0,02743	0,75000*	0,74757

Para o COXI: Grupo I- Amostras da Mata Atlântica (Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Bahia, Paraná e Rio de Janeiro); Grupo II- Amostras da Caatinga (Ceará); Grupo III- Amostras do Cerrado (Goiás, Minas Gerais e Tocantins); Grupo IV- Cerrado-Mata Atlântica (Minas Gerais); Grupo V- Mata Atlântica-Caatinga (Rio Grande do Norte); Grupo VI- Amazônia (Roraima); Grupo VII- Mata Atlântica-Pampa (Rio Grande do Sul). Para o 12S rDNA: Grupo I- Amostras da Mata Atlântica (Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro); Grupo II- Amostras do Cerrado (Minas Gerais); Grupo III- Mata Atlântica-Caatinga (Rio Grande do Norte); Grupo IV- Amazônia (Rondônia e Roraima); Grupo V- Mata Atlântica-Pampa (Rio Grande do Sul); Grupo VI- Pampa (Rio Grande do Sul). COXI, citocromo oxidase subunidade I; *Significativo ($P < 0,05$). COXI, citocromo oxidase subunidade I; *Significativo ($P < 0,05$).

Tabela 8. Teste de Mantel que avalia a associação entre as distâncias genéticas e geográficas nas populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas do Brasil

Teste de Mantel	COXI	12S rDNA
Coefficiente de regressão (b)	0,000069	-0,000053
Coefficiente de correlação (r)	0,187605	-0,246369
<i>P</i>	0,141	0,938

COXI: citocromo oxidase subunidade I; *Significativo ($P < 0,05$).

Tabela 9. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as sequências genéticas analisadas do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) e 12S ribossomal DNA (12SrDNA) de grupos e populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) analisadas no Brasil

AMOVA	COXI	12S rDNA
Entre grupos	-21,71%	15,04%
Entre populações dentro dos grupos	68,17%	-7,92%
Dentro das populações	53,54%	92,88%
F_{CT}	-0,217	0,150
F_{SC}	0,560*	-0,093
F_{ST}	0,465*	0,071

Para o COXI: Grupo I- Amostras da Mata Atlântica (Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Bahia, Paraná e Rio de Janeiro); Grupo II- Amostras da Caatinga (Ceará); Grupo III- Amostras do Cerrado (Goiás, Minas Gerais e Tocantins); Grupo IV- Cerrado-Mata Atlântica (Minas Gerais); Grupo V- Mata Atlântica-Caatinga (Rio Grande do Norte); Grupo VI- Amazônia (Roraima); Grupo VII- Mata Atlântica-Pampa (Rio Grande do Sul). Para o 12S rDNA: Grupo I- Amostras da Mata Atlântica (Ceará, Espírito Santo, Minas Gerais, Paraná e Rio de Janeiro); Grupo II- Amostras do Cerrado (Minas Gerais); Grupo III- Mata Atlântica-Caatinga (Rio Grande do Norte); Grupo IV- Amazônia (Rondônia e Roraima); Grupo V- Mata Atlântica-Pampa (Rio Grande do Sul); Grupo VI- Pampa (Rio Grande do Sul). COXI, citocromo oxidase subunidade I; *Significativo ($P < 0,05$).

4.2.2 Análises intrapopulacionais em *Dermacentor nitens*

4.2.2.1 Diversidade genética de *Dermacentor nitens* no Brasil

Foram identificados com base nas variações das sequências da região *D-loop* e do gene COX-I (Apêndice F e G) o total de 2 e 3 haplótipos, respectivamente.

Para a região *D-loop*, foi observado dois haplótipos (hA e hB), sendo que o haplótipo hA (93,05%) foi comum em todas as populações estudadas, nos biomas e populações de Mata Atlântica (CE-16, ES -12, PR-3 e RJ-14), Cerrado (GO-8), Mata Atlântica – Caatinga (RN-15) e Amazônia (RR -4). E o hB (6,95%) ocorreu apenas na população do Rio de Janeiro (5). O bioma que apresentou a maior diversidade de haplótipos para a região *D-loop* foi Mata Atlântica. Nesse contexto, o haplótipo hB foi exclusivo do bioma Mata Atlântica (RJ), enquanto o haplótipo hA foi encontrado em todos os biomas estudados. A população que apresentou os dois haplótipos identificados no estudo foi a do Rio de Janeiro. Devido à quantidade de haplótipos identificados, não foi possível confeccionar a rede de haplótipos (seriam necessários, no mínimo, três haplótipos) para o *D-loop* (Tabela 10, Apêndice G).

Tabela 10. Distribuição e frequência dos haplótipos da região *D-loop* identificados nas populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil

Bioma	População	Ns	Haplótipos D-loop (460 pb)	
			hA	hB
Mata Atlântica	Ceará	16	16	
	Espírito Santo	12	12	
	Paraná	3	3	
	Rio de Janeiro	14	9	5
Cerrado	Goiás	8	8	
Mata Atlântica- Caatinga	Rio Grande do Norte	15	15	
Amazônia	Roraima	4	4	
Total		72	67	5
Frequência (%)		100,00	93,05	6,95

Ns: número de sequências.

Para o *D-loop*, a diversidade haplotípica apresentou valor de $<0,001$ para todas as populações de *D. nitens* estudadas, exceto para população do RJ (0,495), e em todas as populações, o valor da diversidade nucleotídica foi de $<0,001$, e do mesmo modo com exceção para população do RJ (0,0011). Dos 460 nucleotídeos analisados, de forma individual o Rio de Janeiro exibiu um sítio polimórfico e as demais populações não apresentaram sítios polimórficos (Tabela 11).

Tabela 11. Síntese da distribuição, variabilidade, diversidade genética e história demográfica dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase Subunidade I (COX-I) e da região *D-loop* das populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil

Gene/ Região	Bioma	População	Tamanho amostral	<i>n</i>	<i>s</i>	<i>k</i> ± SD	<i>h</i> ± SD	<i>nd</i> ± SD	<i>F_s</i> de <i>F_u</i> (valor do <i>P</i>)	<i>D</i> de Tajima (valor do <i>P</i>)
COXI	Mata Atlântica	Bahia	4	2	1	0,67 ± 0,63	0,667 ± 0,204	0,0010 ± 0,0017	0,540 (0,49)	1,633 (0,96)
		Ceará	4	2	1	0,50 ± 0,52	0,500 ± 0,265	0,0008 ± 0,0010	0,172 (0,38)	-0,612 (0,38)
		Espírito Santo	6	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
		Paraná	1	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
		Rio de Janeiro	14	3	2	0,41 ± 0,40	0,385 ± 0,149	0,0006 ± 0,0007	-0,855 (0,08)	-0,959 (0,23)
		Santa Catarina	2	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
	Cerrado	Goias	2	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
		Minas Gerais	1	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
	Mata Atlântica - Caatinga	Rio Grande do Norte	31	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
	Amazônia	Rondônia	5	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
		Roraima	3	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
		Maranhão	1	1	0	<0,01 ± 0,00	1,000 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
	Mata Atlântica	Ceará	16	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
		Espírito Santo	12	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
		Paraná	3	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
Rio de Janeiro		14	2	1	0,49 ± 0,45	0,495 ± 0,088	0,0011 ± 0,0011	1,139 (0,61)	1,212 (0,91)	
Dloop	Cerrado	Goias	8	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)
Mata Atlântica - Caatinga	Rio Grande do Norte	15	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)	
Amazônia	Roraima	4	1	0	<0,01 ± 0,00	<0,001 ± 0,000	<0,0001 ± 0,0000	<0,001 (N. A.)	<0,001 (1,00)	

n: número de haplótipos; *s*: número de sítios polimórficos; *k*: número médio de diferenças nucleotídicas; *h*: diversidade genética/ haplotípica;

nd: diversidade nucleotídica /loci; SD: desvio padrão; N.A.: não se aplica; *P* < 0,05, exceto para *F_s* de *F_u* *P* < 0,02; *significativo; COXI, citocromo oxidase subunidade I.

Para o gene COX-I foi constatado três haplótipos (h1, h2 e h3), dentre esses não houve nenhum compartilhado em todas as populações. Assim como para a região *D-loop*, o bioma que apresentou a maior diversidade de haplótipos para COX-I foi Mata Atlântica. A frequência dos haplótipos foi de 45,95% (h1) 52,70% (h2) e 1,35% (h3). Nesse contexto, o haplótipo h1 foi identificado em todas as populações do bioma Mata Atlântica (BA, CE, ES, PR, RJ e SC) e do Cerrado (GO e MG), além de duas populações do bioma Amazônia (RO e RR). Já o haplótipo h2, foi observado em três populações do bioma Mata Atlântica (BA, CE e RJ), na população do bioma Mata Atlântica – Caatinga (RN) e em uma população do bioma Amazônia (MA). O haplótipo h3 foi exclusivo da população do RJ (Mata Atlântica) (Tabela 12, Apêndice F).

Foram registrados sítios polimórficos apenas em algumas populações do bioma Mata Atlântica (RJ, BA e CE) nos 640 nucleotídeos analisados. A diversidade haplotípica variou de $<0,001$ (ES, SC, GO, RN, RO e RR) a 1,000 (PR, MG e MA), enquanto a diversidade nucleotídica foi de $<0,0001$ a 0,0010. Três populações não tiveram o valor de diversidade nucleotídica $<0,0001$, sendo elas: BA (0,0010), CE (0,0008) e RJ (0,0006) (Tabela 11).

Tabela 12. Distribuição e frequência dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) identificados nas populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 analisadas de diferentes biomas e regiões do Brasil

Bioma	População	Ns	Haplótipos Citocromo oxidase subunidade I (640 pb)		
			h1	h2	h3
Mata Atlântica	Bahia	4	2	2	
	Ceará	4	1	3	
	Espírito Santo	6	6		
	Paraná	1	1		
	Rio de Janeiro	14	11	2	1
	Santa Catarina	2	2		
Cerrado	Goiás	2	2		
	Minas Gerais	1	1		
Mata Atlântica-Caatinga	Rio Grande do Norte	31		31	
Amazônia	Rondônia	5	5		
	Roraima	3	3		
	Maranhão	1		1	
Total		74	34	39	1
Frequência (%)		100,00	45,95	52,70	1,35

Ns: número de sequências.

4.2.2.2 História evolutiva de *Dermacentor nitens* com base na rede de haplótipos

A topologia da rede de haplótipos do gene COX-I de *D. nitens*, corroborou que todos os haplótipos foram geneticamente muito próximos, visto que foram separados por uma mutação. O haplótipo h1 foi detectado em todas as populações, exceto RN e MA, enquanto o haplótipo h2 esteve presente nas populações da BA, CE, RJ, RN e MA. Na extremidade da rede, o haplótipo h3, exclusivo do RJ, pode ser considerado um haplótipo recente, pois surgiu

por mutação de uma base do h1 (compartilhado pelas populações) e se apresentou em baixa frequência. O mesmo não ocorre com o haplótipo h2, que se apresentou com maior frequência (Figura 5, Tabela 12).

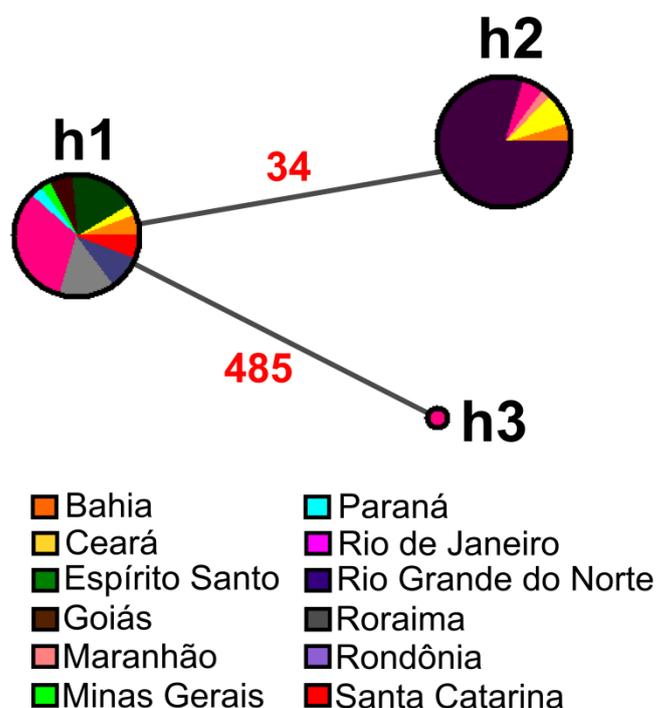


Figura 5. Rede de haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) de populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 de diferentes biomas e estados gerada pelo método de median-joining com pós-processamento pelo método de máxima parcimônia. O tamanho dos círculos corresponde a frequências de cada haplótipo, números em vermelho indicam passos mutacionais.

4.2.2.3 Dinâmica demográfica e diferenciação genética nas populações de *Dermacentor nitens* do Brasil

Todas as populações, tanto para região *D-loop* quanto para COX-I, não apresentaram resultados significativos para os testes de neutralidade F_s de Fu e D de Tajima. Esses

resultados não rejeitam a hipótese nula de neutralidade, e podem sugerir tamanho populacional constante (Tabela 11).

As estimativas de diferenciação genética entre as populações de *D. nitens*, representados pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, apresentaram valores significativos para a região *D-loop* entre populações do bioma Mata Atlântica [(RJ x ES) e (RJ x CE)], e também quando comparada com para população do bioma Mata Atlântica – Caatinga (RJ x RN). Para o gene COX-I, os valores significativos foram entre populações do bioma Mata Atlântica [(RJ x CE) e (ES x CE)], e ainda quando comparada com para população do bioma Amazônia (CE x RO). Assim como para a população compreendida no bioma Mata Atlântica – Caatinga (RN) quando confrontada com todas as demais populações estudadas e pertencentes aos biomas Mata Atlântica [(RN x BA); (RN x ES); (RN x PR); (RN x RJ); (RN x SC)], Cerrado [(RN x GO) e (RN x MG)], Amazônia [(RN x RO) e (RN x RR)]. O valor deste bioma Mata Atlântica – Caatinga (RN) não foi significativo somente quando contraposto com a população do CE (Tabela 13).

A análise do F_{ST} par a par entre os grupo demonstrou haver diferenciação significativa no gene COX-I entre as populações do grupo I (bioma Mata Atlântica) em relação à população do grupo III (bioma Mata Atlântica – Caatinga), entre as populações do grupo II (bioma Cerrado) em relação à população do grupo III e entre as populações do grupo III em relação a população do grupo IV (bioma Amazônia) (Tabela 14). Em conformidade, o teste de Mantel demonstrou haver associação significativa neste gene entre as distâncias genéticas e geográficas das populações de *D. nitens* do estudo (Tabela 15).

Tabela 13. Estimativas de diferenciação genética, representadas pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, entre as populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 analisadas do Brasil

Populações	Gene/ Região	Bahia	Ceará	Espírito Santo	Paraná	Rio de Janeiro	Santa Catarina	Goiás	Minas Gerais	Rio Grande do Norte	Rondônia	Roraima
Bahia	COXI D-loop											
Ceará	COXI D-loop	-0,16667 N. A.										
Espírito Santo	COXI D-loop	0,44186 N. A.	0,73626* <0,00001									
Paraná	COXI D-loop	-0,33333 N. A.	0,33333 <0,00001	-0,03330 <0,00001								
Rio de Janeiro	COXI D-loop	0,11560 N. A.	0,41885* 0,32822*	<0,00001 0,28511*	-0,89758 0,08696							
Santa Catarina	COXI D-loop	0,11111 N. A.	0,52941 N. A.	<0,00001 N. A.	<0,00001 N. A.	-0,27908 N. A.						
Goiás	COXI D-loop	0,11111 N. A.	0,52941 <0,00001	<0,00001 <0,00001	<0,00001 <0,00001	-0,27908 0,22995	<0,00001 N. A.					
Minas Gerais	COXI D-loop	-0,33333 N. A.	0,33333 N. A.	<0,00001 N. A.	<0,00001 N. A.	-0,89758 N. A.	<0,00001 N. A.	<0,00001 N. A.				
Rio Grande do Norte	COXI D-loop	0,79935* N. A.	0,55235 <0,00001	1,00000* <0,00001	1,00000* <0,00001	0,85649* 0,31818*	1,00000* N. A.	1,00000* <0,00001	1,00000* N. A.			
Rondônia	COXI D-loop	0,39394 N. A.	0,70588* N. A.	<0,00001 N. A.	<0,00001 N. A.	-0,05677 N. A.	<0,00001 N. A.	<0,00001 N. A.	<0,00001 N. A.	1,00000* N. A.		
Roraima	COXI D-loop	0,25000 N. A.	0,61290 <0,00001	<0,00001 <0,00001	<0,00001 <0,00001	-0,14947 0,13551	<0,00001 N. A.	<0,00001 <0,00001	<0,00001 N. A.	1,00000* <0,00001		
Maranhão	COXI D-loop	-0,33333 N. A.	-1,00000 N. A.	1,00000 N. A.	1,00000 N. A.	0,56221 N. A.	1,00000 N. A.	1,00000 N. A.	1,00000 N. A.	<0,00001 N. A.	1,00000 N. A.	1,00000 N. A.

COXI: citocromo oxidase subunidade I; N.A.: não analisado; *Significativo ($P < 0,05$).

Tabela 14. Estimativas de diferenciação genética, representadas pelos valores de F_{ST} na comparação par a par, entre os grupos delimitados e populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 analisadas do Brasil

População	Gene/ Região	Grupo I	Grupo II	Grupo III
Grupo II	COXI	-0,05539		
	D-loop	-0,00279		
Grupo III	COXI	0,73602*	1,00000*	
	D-loop	0,03485	<0,00001	
Grupo IV	COXI	-0,03587	-0,18033	0,94387*
	D-loop	-0,07623	<0,00001	<0,00001

Grupo I- Amostra da Mata Atlântica (Bahia, Ceará, Espírito Santo, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina); Grupo II- Amostras do Cerrado (Goiás e Minas Gerais); Grupo III- Amostras da Mata Atlântica-Caatinga (Rio Grande do Norte); Grupo IV- Amostras da Amazônia (Rondônia, Roraima e Maranhão); COXI: citocromo oxidase subunidade I; *Significativo ($P < 0,05$).

Tabela 15. Teste de Mantel que avalia a associação entre as distâncias genéticas e geográficas nas populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 analisadas do Brasil

Teste de Mantel	COXI	D-loop
Coefficiente de regressão (b)	0,000136	-0,000019
Coefficiente de correlação (r)	0,343999	-0,238836
P	0,045*	0,831

COXI: citocromo oxidase subunidade I; *Significativo ($P < 0,05$).

A AMOVA apontou que a maior parte da variância molecular de *D. nitens* aconteceu dentro das populações estudadas - *D-loop* (79,73%), e entre grupos - COX-I (57,74%).

Esses resultados indicam que para *D-loop* não houve estruturação de acordo com os biomas, entretanto pode haver estruturação de acordo com os biomas para o COX-I, visto que a maior parte da variância ocorreu entre grupos – biomas. Contudo a rede de haplótipos e outras análises populacionais não indicaram estruturação populacional de acordo com os

biomas, como pode-se observar F_{CT} com valor baixo e não significativo. É possível também, que exista alguma estruturação entre as populações, de acordo com as áreas/períodos de coleta, já que os índices de F_{SC} e F_{ST} foram significativos para COX-I e *D-loop* (Tabela 16).

Tabela 16. Análise de Variância Molecular (AMOVA) para as sequências genéticas analisadas do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) e da região *D-loop* de grupos e populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 analisadas no Brasil

AMOVA	COXI	D-loop
Entre grupos	57,74%	-32,11%
Entre populações dentro dos grupos	22,48%	52.37%
Dentro das populações	19,78%	79.73%
F_{CT}	0,577	-0.321
F_{SC}	0,532*	0,396*
F_{ST}	0,802*	0,203*

Grupo I- Amostra da Mata Atlântica (Bahia, Ceará, Espírito Santo, Paraná, Rio de Janeiro e Santa Catarina); Grupo II- Amostras do Cerrado (Goiás e Minas Gerais); Grupo III- Amostras da Mata Atlântica-Caatinga (Rio Grande do Norte); Grupo IV- Amostras da Amazônia (Rondônia, Roraima e Maranhão); COXI: citocromo oxidase subunidade I; *Significativo ($P < 0,05$).

4.3 Análises filogenéticas dos carrapatos

4.3.1 *Rhipicephalus microplus*

A reconstrução filogenética do 12S rDNA de *R. microplus* foi desenvolvida por meio da análise de máxima verossimilhança, com modelo evolutivo Tamura 3-parâmetros (T92 + G) e três haplótipos (hI-hIII) foram obtidos através de sequências geradas neste estudo,

depositadas no *GenBank* com os números de acesso **MT231546**, **MT231547** e **MT231548** (Figura 6).

Para a análise do 12S rDNA foram utilizadas as sequências de *R. microplus* da África do Sul (EU921764), Argentina (EU921758), Austrália (EU921769), Bangladesh (MG459958), Bolívia (EU921759), Brasil (EU921766), Costa Rica (EU921761), China (KF583590), Índia (EU921772), Indonésia (EU921771), Moçambique (EU921766), Myanmar (MG459960), Nova Caledônia (EU921770), Paquistão (MG459959), Paraguai (EU921762), República Democrática do Congo (MF479199), Tanzânia (EU921765), Uganda (KY688459), Uruguai (EU921763) e como grupo externo *Rhipicephalus annulatus* Neumann, 1904 (KU568500).

Na Figura 6, os haplótipos identificados no presente estudo foram observados em ramo separado de outras sequências da América do Sul e são filogeneticamente relacionados às amostras do continente africano (Uganda e República Democrática do Congo), com valor de suporte de 91%.

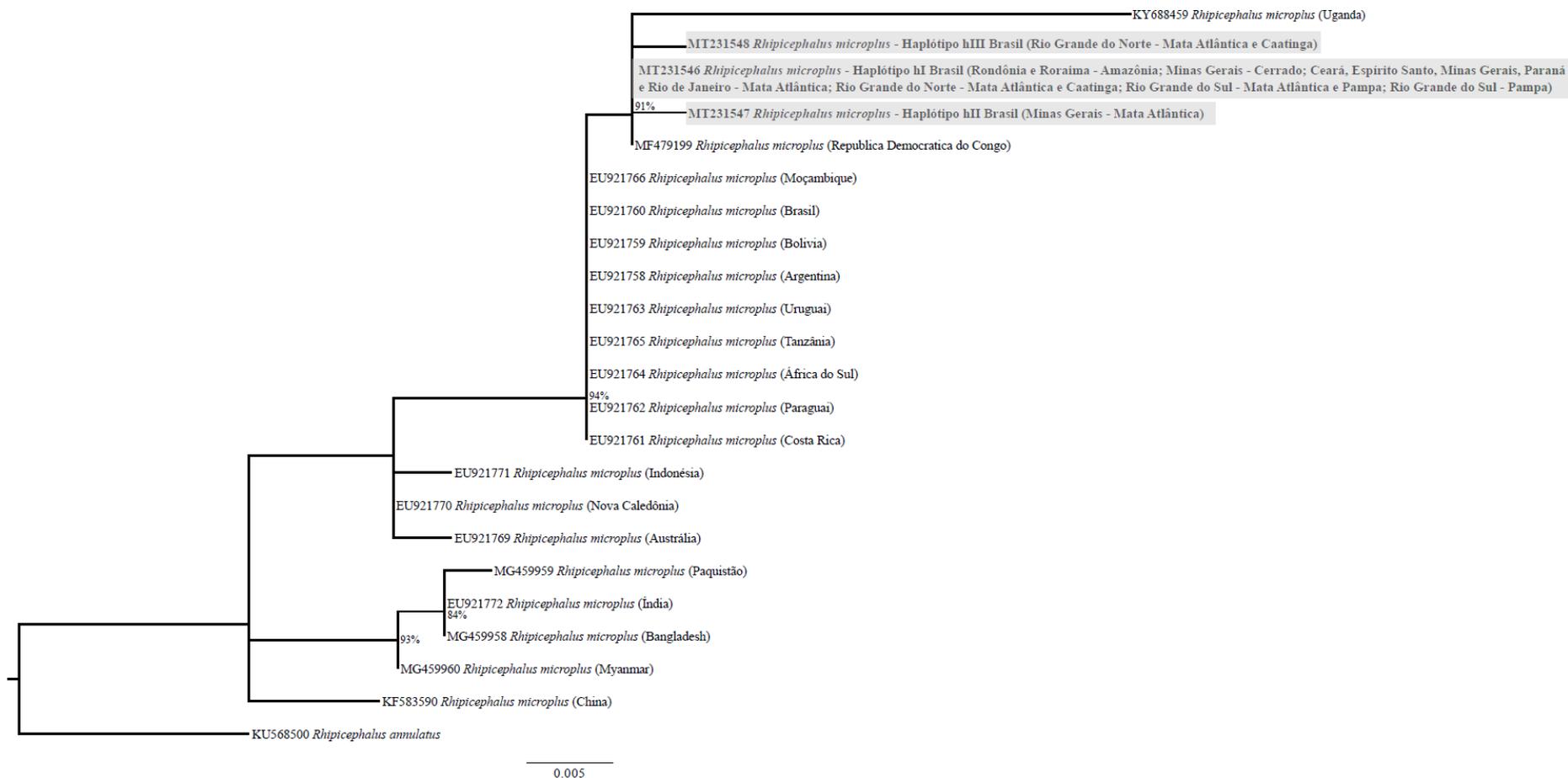


Figura 6. Filogenia, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92+G, para sequências parciais (359 pb) do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA), representando as relações entre os três haplótipos (hI a hIII) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) identificados no Brasil e as sequências do *GenBank*. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% *cut-off*).

A reconstrução filogenética de COX-I de *R. microplus* foi desenvolvida por meio da análise de máxima verossimilhança, com modelo evolutivo Tamura 3-parâmetros (T92 + G) e os sete haplótipos (h1 – h7) foram obtidos através de sequências geradas neste estudo, depositadas no *GenBank* com os números de acesso **MT229966**, **MT229967**, **MT229968**, **MT229969**, **MT229970**, **MT229971** e **MT229972** (Figura 7).

Para análise filogenética do COX-I foram utilizadas as sequências de *R. microplus* da África (MK648412), África do Sul (KY678117), Benin (KY678120), Bangladesh (MG459961), Camboja (KC503260), China (MK371430), Colômbia (MF363077), Estados Unidos (KP143546), Guiana Francesa (MH513250), Índia (KP792589), Madagascar (KY678119), Malásia (KM688459, KM246872, KM246875 e KM246876), Myanmar (MG459967), Panamá (KF200166), Paquistão (MG459963) e Brasil, dos estados do Amazonas (KP226162), Acre (KP226159), Bahia (KP226168), Ceará (KP226177), Distrito Federal (KP226166), Espírito Santo (KP226175), Maranhão (KP226160), Mato Grosso (KP226167), Mato Grosso do Sul (KC503261 e KP226164), Minas Gerais (KP226171), Pará (KP226163), Paraíba (KP226176), Paraná (KP226179), Piauí (KP226174), Rio de Janeiro (KP226165), Rio Grande do Norte (KP226172), Rio Grande do Sul (KP226169), Rondônia (KP226178), Roraima (KP226161), Santa Catarina (KP226173), São Paulo (KP226170) e Tocantins (KP226180). Além de sequências de *Rhipicephalus australis* Fuller, 1899 da Austrália (AF132827, KC503255), e como grupo externo *R. annulatus* (KC503256).

Na Figura 7, os haplótipos h1 (presente em populações de vários biomas), h3 (exclusivo de Goiás, bioma Cerrado) e h5 (exclusivo do Rio de Janeiro, bioma Mata Atlântica) foram observados formando um clado com sequências de carrapatos de seis estados brasileiros (CE, MA, MT, RN, RS, e PI), além da Colômbia, Estados Unidos e Panamá, com apoio estatístico de 82%. Já os haplótipos h4, h6 e h7 (exclusivos da população do Rio de Janeiro, bioma Mata Atlântica), assim como h2 (presente em todas as populações e biomas do

estudo), formaram grupos com espécimes de *R. microplus* de 13 estados brasileiros, África do Sul, Benin, Guiana Francesa e Madagascar.

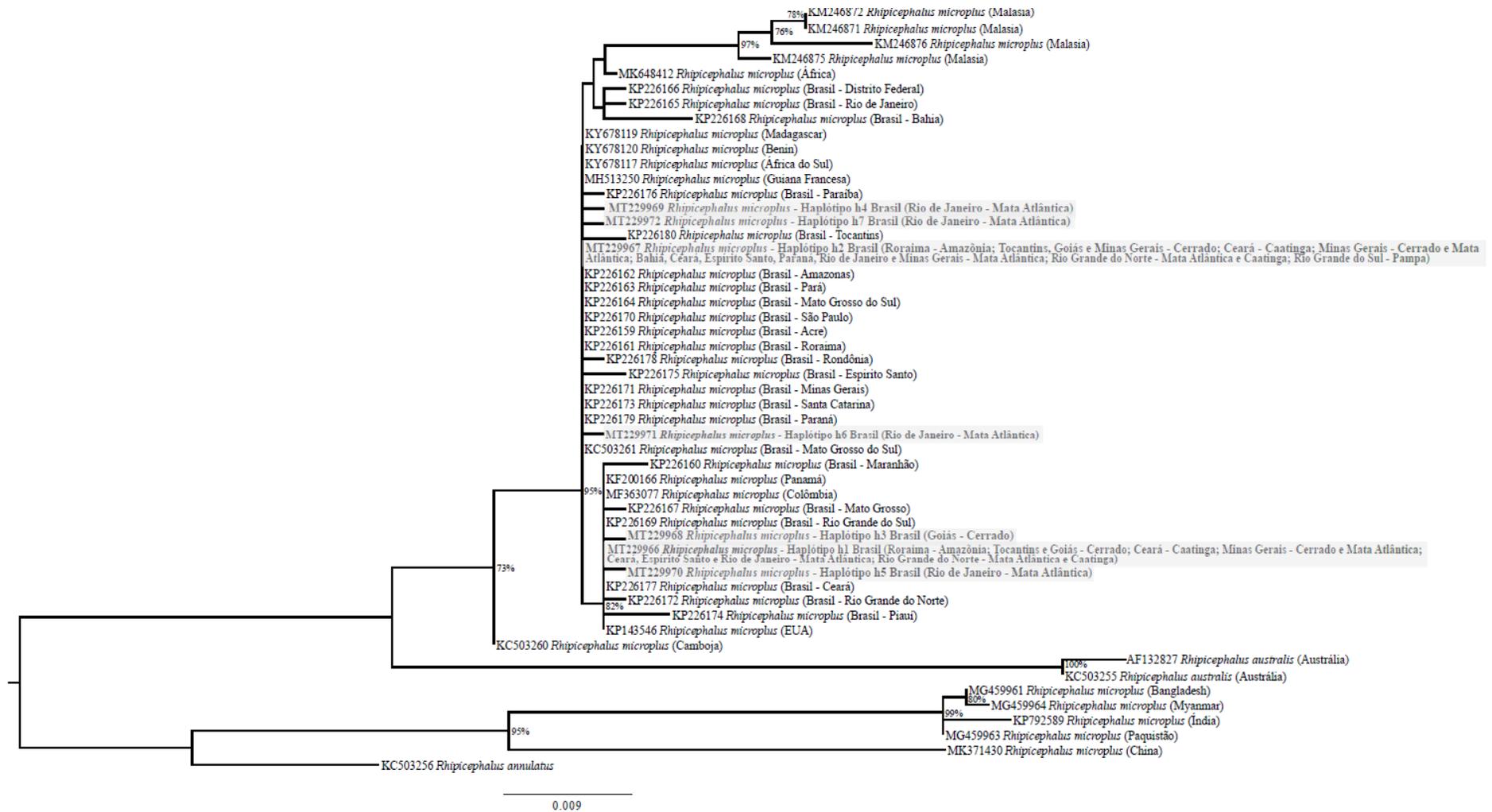


Figura 7. Filogenia, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92+G, para sequências parciais (639 pb) do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I), representando as relações entre os sete haplótipos (h1 a h7) de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1888) identificados no Brasil e as sequências do *GenBank*. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% *cut-off*).

4.3.2 *Dermacentor nitens*

A reconstrução filogenética do 12S rDNA de *D. nitens* foi desenvolvida por meio da análise de máxima verossimilhança, com modelo evolutivo Tamura 3-parâmetros (T92 + G) e as sequências geradas neste estudo foram depositadas no *GenBank* com os números de acesso **MT231542**, **MT231543**, **MT231544** e **MT231545** (Figura 8).

Foram utilizadas as sequências de *D. nitens* do Brasil – Mato Grosso do Sul (NC0233349) e Guatemala (JF523336). Além de sequências de *D. silvarum* (NC026552), *D. nuttalli* (KT764942) da China, *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 (KX018994) da Itália, *Dermacentor variabilis* Say, 1821 (U95869), *D. andersoni* (U95868), *D. albipictus* (AF150041), *Dermacentor niveus* Neumann, 1897 (MF973045), *D. marginatus* (MK905212), *D. everestianus* (NC042764), *Dermacentor rhinocerinus* Denny, 1843 (AF031850) e como grupo externo *R. sanguineus* (NC002074) e *R. microplus* (NC02335).

Na Figura 8, foi observado que amostras de *D. nitens* coletados nos estados de Goiás, Maranhão, Roraima e Rio de Janeiro agruparam com uma sequência do Brasil do Mato Grosso do Sul, bioma Cerrado (NC023349), e da Guatemala (JF523336), com apoio estatístico de 92% (Figura 8).

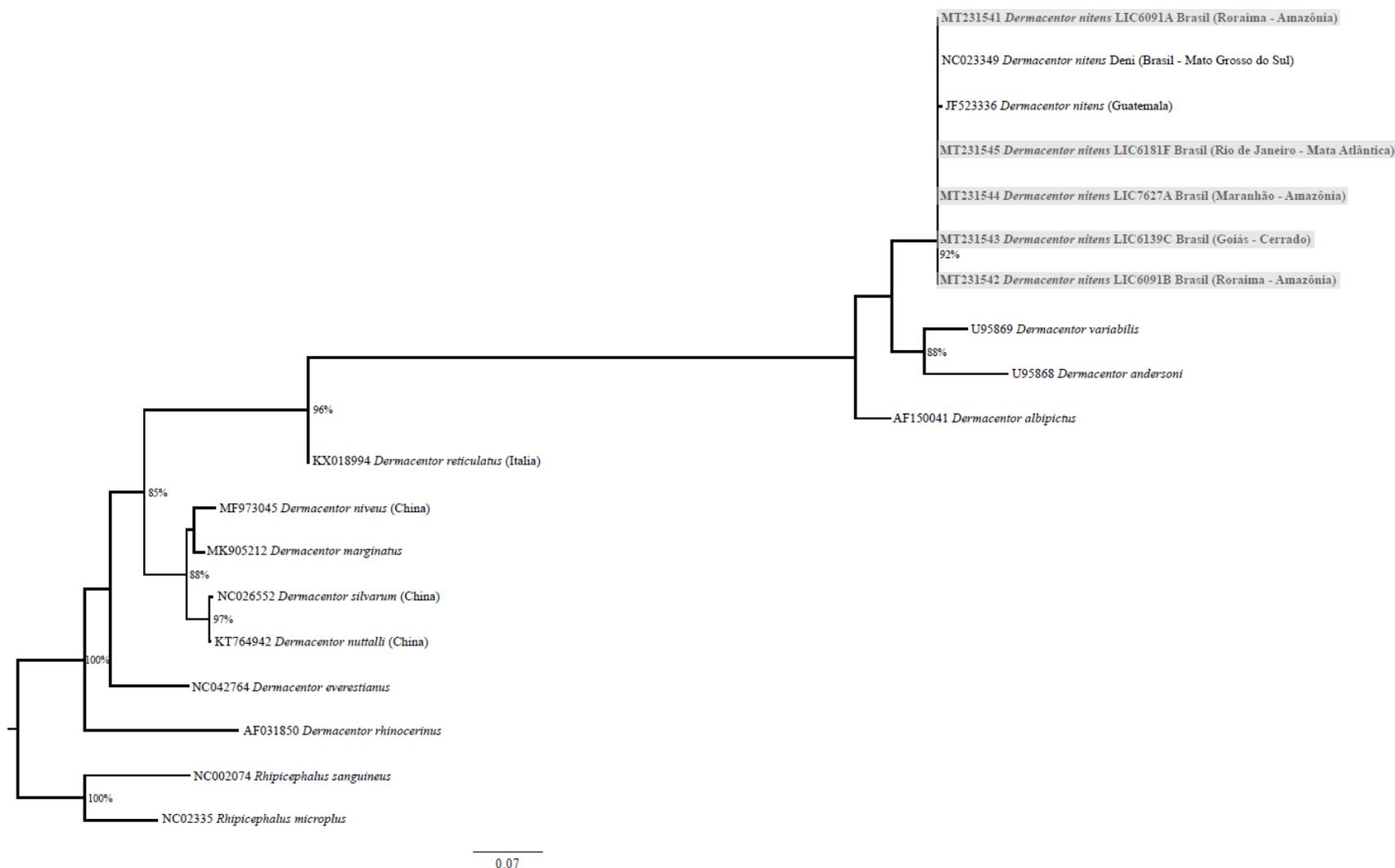


Figura 8. Filogenia, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo T92+G, para sequências parciais (357 pb) do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA) de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 identificados no Brasil e as sequências do *GenBank*. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% *cut-off*).

A reconstrução filogenética de COX-I de *D. nitens* foi desenvolvida por meio da análise de máxima verossimilhança, com modelo evolutivo GTR + G + I e os três haplótipos (h1 – h3) foram obtidos através de sequências geradas neste estudo, depositadas no *GenBank* com os números de acesso **MT229963**, **MT229964** e **MT229965** (Figura 9).

Para análise filogenética do COX-I foram utilizadas as sequências de *D. nitens* da Colômbia (MF363058, MF363059, MF363060, MF363061, MF36306162, MF363068, MF363070, MF363071, MF363092), Guiana Francesa (MH513243, MH513244), Panamá (KF200121, KF200162, KF200169, KF200094, KF200099) e Brasil, dos estados do Amapá (KY441477), Amazonas (KY441478), Mato Grosso (KY441480), Mato Grosso do Sul (NC023349, KY441481), Minas Gerais (KY441484), Paraná (KY441486), Pernambuco (KY441487), Rio de Janeiro (KY441485), Rondônia (KY441479) e São Paulo (KY441482, KY441483), além de sequências de *D. silvarum* (NC026552), *D. nuttalli* (KT764942), *Dermacentor sinicus* Schulze, 1932 (KM083592), *D. marginatus* (MK905212), *D. niveus* (JQ737080), *D. reticulatus* (HM193879), *Dermacentor auratus* Supino, 1897 (MG721047) da China, *D. albipictus* (GU968843), *D. andersoni* (MN358154) e *Dermacentor steini* Schulze, 1933 (HM193861) do Canadá, *D. variabilis* (MG834212) e *Dermacentor parumapertus* Neumann, 1901 (MN650067) dos EUA, *Dermacentor everestianus* Hirst, 1926 (NC042764), *D. rhinocerinus* (AF132830) e como grupo externo *R. microplus* (NC023335) e *R. sanguineus* (NC002074).

Na Figura 9, os haplótipos h1 e h3 agruparam com outras sequências de *D. nitens*, provenientes do Brasil (Mato Grosso do Sul, bioma Cerrado) (NC023349), Colômbia (MF363070, MF363071, MF363059, MF363060, MF363068, MF363092, MF363058), Guiana Francesa (MH513243, MH513244) e Panamá (KF200169, KF200162, KF200121, KF200099, KF200094), com apoio estatístico de 75%. Além

disso, foi observado que o haplótipo h2 é filogeneticamente relacionado a amostras desta espécie do Brasil, provenientes dos estados de Pernambuco e Amapá (KY441477, KY441487).

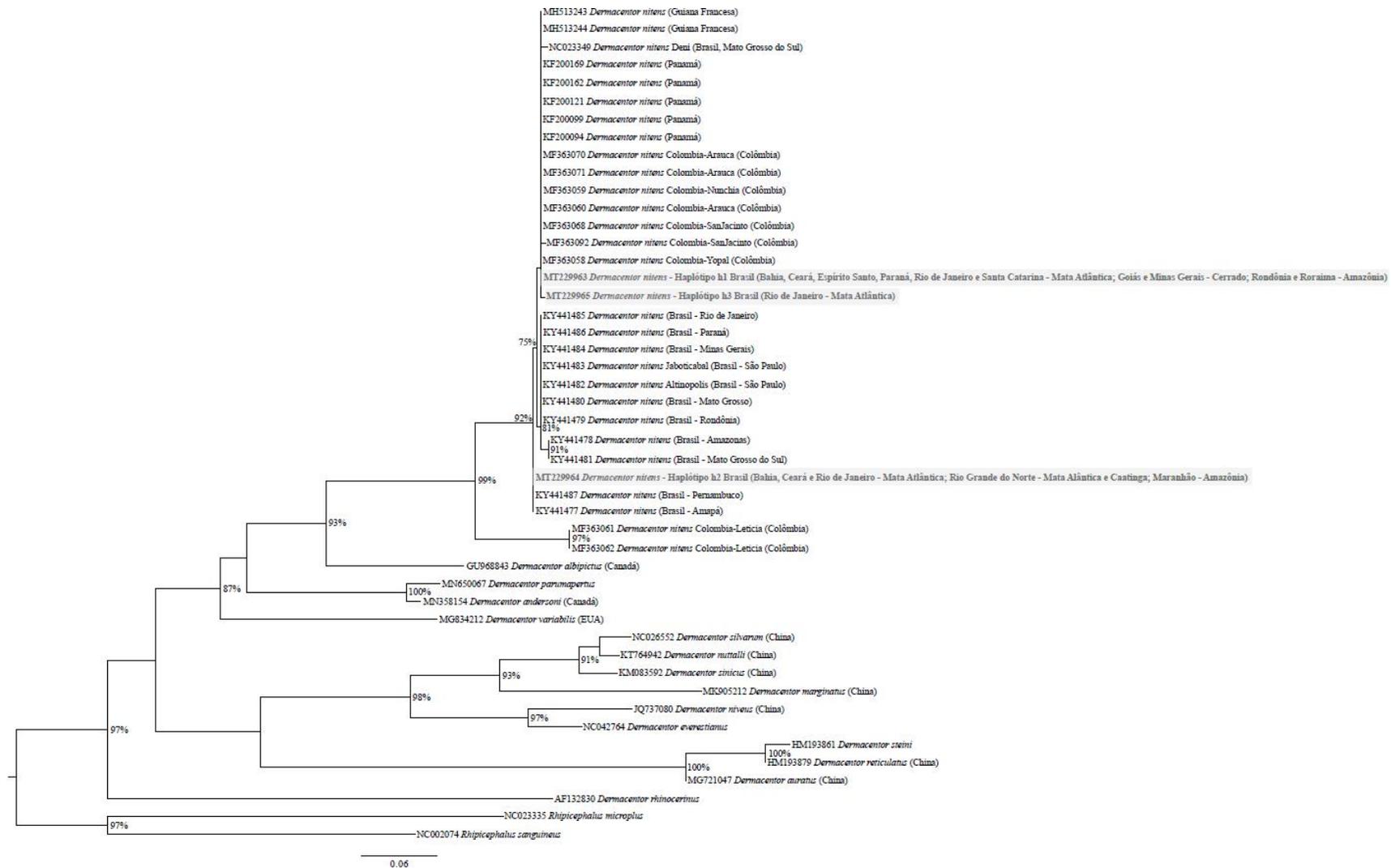


Figura 9. Filogenia, inferida por análise de máxima verossimilhança com modelo evolutivo GTR+G+I, para sequências parciais (640 pb) do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I), representando as relações entre os três haplótipos (h1 a h3) de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 identificados no Brasil e as sequências do *GenBank*. Os números nos ramos indicam valores de apoio estatístico (70% *cut-off*).

4.4 Pesquisa molecular de patógenos transmitidos por carrapatos

4.4.1 Riquétsias detectadas em *Rhipicephalus microplus*

Um total de 620 amostras de *R. microplus* provenientes de 16 estados, compreendendo áreas de praticamente todos os biomas brasileiros (com exceção do bioma Pantanal e Pampa), foram analisadas para a presença de patógenos. Destas, 12 amostras de *R. microplus* coletados de hospedeiros (equinos e bovinos) e ambiente apresentaram resultado positivo para a presença de genes riquetsiais (Tabela 17). A análise BLAST das sequências nucleotídicas obtidas revelou altas taxas de identidade com isolados de *Rickettsia* depositados no banco de dados do *GenBank*: *R. rickettsii* (MH194350, MH194352), *Rickettsia belli* (MH194351), *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (MK720994, MK720995, MH194354, MH194355, MH194358), *R. felis* (MK720997, MH194353, MH194356, MH194360), *Rickettsia rhipicephali* (MK720996, MK720998) e *Rickettsia tamurae* (MK720993), totalizando 15 sequências nucleotídicas obtidas (Tabela 17).

Tabela 17. Espécies de *Rickettsia* detectadas por análises de *gltA*, *ompA*, *ompB*, *htrA* e *sca4* em amostras de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) coletados parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Estado – Bioma	Município	Hospedeiro/ Ambiente	Código/Espécime	Amostra		Identidade*	
				Gene	Número de acesso		
Região Norte							
Tocantins – Cerrado	Palmas	<i>Bos taurus</i>	LIC7001B/1F	<i>gltA</i>	MK720994	<i>Rickettsia parkeri</i> 350/350 (100%) – MH160728	
	Palmas	<i>Bos taurus</i>	LIC7001E/1F	<i>gltA</i>	MK720995	<i>Rickettsia parkeri</i> 350/350 (100%) – MH160728	
Região Nordeste							
Ceará – Caatinga	Aratuba	<i>Bos taurus</i>	LIC3764A/1M	<i>gltA</i>	MH194351	<i>Rickettsia bellii</i> , 349/350 (99%) – MG550957	
	Baturité	<i>Bos taurus</i>	LIC3528B/1F	<i>gltA</i>	MH194350	<i>Rickettsia rickettsii</i> , 350/350 (100%) – MF988097	
	Baturité	<i>Bos taurus</i>	LIC4523A/1M	<i>gltA</i>	MH194352	<i>Rickettsia. rickettsii</i> , 350/350 (100%) – JN252696	
	Capistrano	<i>Bos taurus</i>	LIC4970B/1F	<i>gltA</i>	MK720993	<i>Rickettsia tamurae</i> 786/786 (100%) – MH158234	
Região Centro-Oeste							
Goiás – Cerrado	Itumbiara	Ambiente	LIC8928G/10L	<i>gltA</i>	MK720997	<i>Rickettsia felis</i> , 350/350(100%) – MG952933	
Região Sudeste							
Minas Gerais – Cerrado	Tiros	<i>Bos taurus</i>	LIC8786E/1F	<i>gltA</i>	MK720996	<i>Rickettsia rhipicephali</i> 349/350 (99%) – KX434745	
	São Paulo – Cerrado	Altair	<i>Bos taurus</i>	<i>gltA</i>	MK720998	<i>Rickettsia rhipicephali</i> 350/350 (100%) – KX434745	
Região Sul							
Paraná – Mata Atlântica	Senges	Ambiente	LIC7156/10L	<i>ompB</i>	MH194360	<i>Rickettsia felis</i> , 619/630 (98%) – KX090276	
		<i>Bos taurus</i>	LIC8514C/1N	<i>gltA</i>	MH194354	<i>Rickettsia parkeri</i> , 350/350 (100%) – MF536974	
	Pato Bragado				<i>ompA</i>	MH194358	<i>Rickettsia parkeri</i> , 491/491 (100%) – MF536975
					<i>sca4</i>	MH194355	<i>Rickettsia parkeri</i> , 701/701 (100%) – KY124260
Rio Grande do Sul – Mata Atlântica	Osório	<i>Equus caballus</i>	LIC5552C/1M	<i>gltA</i>	MH194353	<i>Rickettsia felis</i> , 350/350 (100%) – KY172878	
				<i>htrA</i>	MH194356	<i>Rickettsia felis</i> , 499/499 (100%) – CP000053	

M: macho; F: fêmea; N: ninfa; L: larva; *Identidades com sequências de *Rickettsia* sp. depositadas no *GenBank*.

A reconstrução filogenética de riquetsias identificadas em *R. microplus* foi desenvolvida por meio da análise de máxima verossimilhança, com modelo evolutivo GTR+G. As sequências finais foram obtidas através da concatenação dos fragmentos gênicos *gltA*, *ompA*, *ompB*, *htrA* e *sca4* e foram utilizadas sequências correspondentes a uma amostra de cada identidade de *Rickettsia* obtida nesta tese (Figura 10). As sequências geradas neste estudo foram depositadas no *GenBank* com os números de acesso **MH194350**, **MH194351**, **MH194352**, **MH194353**, **MH194354**, **MH194355**, **MH194356**, **MH194358** e **MH194360**.

Para análise das sequências dos genes riquetsiais, foram empregadas as sequências de: *R. rickettsii* (CP000848, CP003305, KX356604-05), *Rickettsia peacockii* (CP001227), *R. parkeri* (CP003341, KY113109-12, KJ855084), *R. africae* (CP001612), *R. sibirica* (AABW01000001, AHZB00000000), *R. conorii* (AJUR00000000, AE006914), *R. slovacica* (CP003375, CP002428), *R. japonica* (AP011533), *Rickettsia heilongjiangensis* (CP002912), *Rickettsia amblyommatis* (CP003334), *R. aeschlimannii* (MF098403/07/10/13/16), *Rickettsia massiliae* (CP000683, CP003319), *R. rhipicephali* (CP003342), *Rickettsia montanensis* (CP003340), *Rickettsia monacensis* (LN794217), *R. tamurae* (NZCCMG01000000), *R. felis* (CP000053), *Rickettsia asemboensis* (JN315968-70/72), *R. akari* (CP000847), *R. australis* (CP003338), *Rickettsia prowazekii* (CP003394, CP004888), *Rickettsia typhi* (AE017197, CP003397), disponíveis no banco de dados do *GenBank*. Como grupo externo foi incluída a sequência de *R. bellii* (KT153036, CP000087, CP000849).

O filodendograma gerado indica que as sequências das amostras de *R. microplus* coletadas no estado do Ceará, bioma Caatinga, são filogeneticamente relacionadas com *R. rickettsii*, *R. tamurae* e *R. bellii*; as sequências do estado de São Paulo, bioma cerrado, com *R. rhipicephali*; sequências do bioma Mata Atlântica, provenientes do estado do Paraná com *R. parkeri* Mata Atlântica (identificada em Barbieri et al., 2014 como cepa Aa46); e do Rio Grande do Sul, com grupo de *R. felis* (Figura 10).

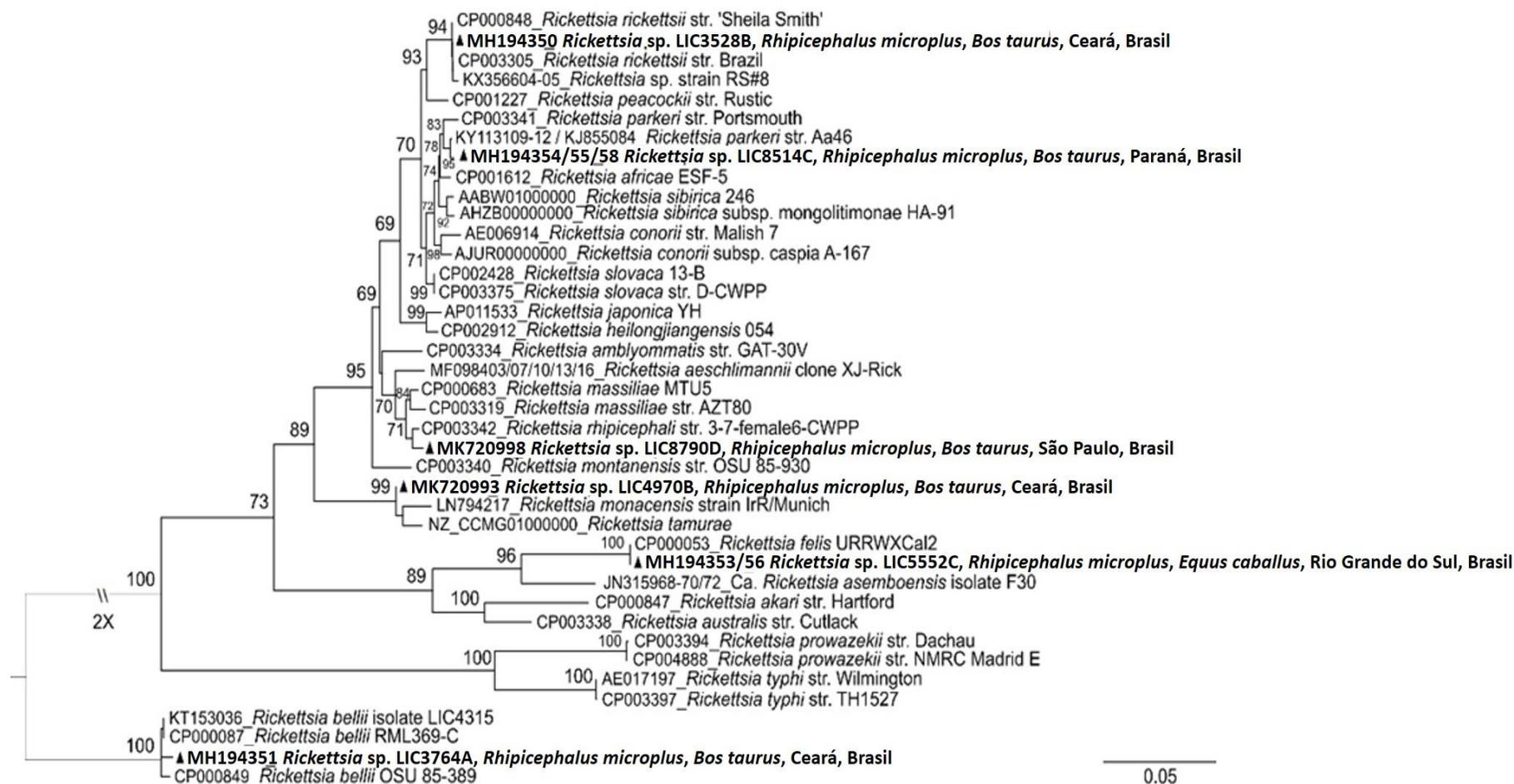


Figura 10. Inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais concatenadas dos genes *gltA*, *htrA*, *ompA*, *ompB* e *sca4* (de 401, 549, 532, 862 e 744 pb, respectivamente) de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), pelo método de máxima verossimilhança de 1.000 árvores replicadas. Como modelo evolutivo foi utilizado o algoritmo GTR+G e os valores de *bootstrap* superiores a 70% estão demonstrados nos ramos. As sequências obtidas nesta tese estão indicadas com um triângulo preto, precedidas pelos respectivos números de acesso ao *GenBank* e seguidas pelas informações da amostra (espécie do carrapato, hospedeiro e localidade).

Devido ao tamanho das sequências obtidas, os valores de bootstrap foram baixos em alguns ramos do filodendograma, indicando porções semelhantes nos fragmentos de espécies analisados. No entanto, os valores observados de BLAST mostraram, principalmente, sobreposição de 100% com a respectiva sequência de *Rickettsia*, além de uma sequência *ompB* com 98% de identidade com *R. felis* e duas sequências *gltA* com 99% de identidade com *R. rhipicephali* e *R. bellii* (Tabela 17).

4.4.2 Riquétsias detectadas em *Dermacentor nitens*

Um total de 177 amostras de *D. nitens* provenientes de 13 estados foram analisadas para a presença de patógenos e destas, três foram positivas para genes riquetsiais. A análise BLAST das sequências obtidas revelou altas taxas de identidade com sequências nucleotídicas de *R. felis* (MH194359.1), *Candidatus Rickettsia andeanae* (MH194357) e *R. rhipicephali* (MK720999), totalizando três sequências adquiridas (Tabela 18).

Tabela 18. Espécies de *Rickettsia* detectadas por análises de *ompB*, *ompA* e *gltA* em amostras de carrapatos *Dermacentor (Anocentor) nitens* coletados parasitando hospedeiros vertebrados, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Estado – Bioma	Município	Hospedeiro/ Ambiente	Amostra			Resíduos Idênticos/Resíduos Alinhados – Número de Acesso	Identidade*
			Código/Espécime	Gene	Número de acesso		
Região Norte							
Rondônia – Amazônia	Porto Velho	<i>Equus caballus</i>	LIC5763A/1N	<i>ompB</i>	MH194359	<i>Rickettsia felis</i> , 628/630 (99%) – KX090276	
	Porto Velho	<i>Equus asinus</i>	LIC5764H/1N	<i>ompA</i>	MH194357	<i>Candidatus Rickettsia andeanae</i> , 488/488 (100%) – KY273599	
Região Nordeste							
Bahia – Mata Atlântica	Valença	<i>Equus caballus</i>	LIC8891R/ 1M	<i>gltA</i>	MK720999	<i>Rickettsia rhipicephali</i> , 399/402 (99%) – CP013133	

M: macho; N: ninfa; *Identidades com sequências de *Rickettsia* sp. depositadas no *GenBank*.

A reconstrução filogenética foi desenvolvida por meio da análise de máxima verossimilhança, com modelo evolutivo GTR+G+I. As sequências finais foram obtidas através da concatenação dos fragmentos gênicos *ompB*, *ompA* e *gltA*, e foram utilizadas sequências correspondentes a uma amostra de cada identidade de *Rickettsia* obtida nesta tese (Figura 11). As sequências geradas neste estudo foram depositadas no *GenBank* com os números de acesso **MH194357**, **MH194359** e **MK720999**.

Para análise das sequências dos genes riquetsiais, foram empregadas as sequências de: *R. rickettsii* (CP000848, CP003305), *Rickettsia philipii* (CP00308), *R. peacockii* (CP001227), *R. parkeri* (LAOL01000001, CP003341, KY113109/10/11), *R. africae* (CP001612), *R. sibirica* (AABW01000001, AHZB00000000), *R. conorii* (AJUR00000000, AE006914), *R. slovacica* (CP003375, CP002428), *R. japonica* (AP011533), *R. heilongjiangensis* (CP002912), *Ca. R. andeanae* (KX576677/78), *R. amblyommatis* (CP003334), *R. rhipicephali* (CP003342), *R. massiliae* (CP000683, CP003319), *R. montanensis* (CP003340), *R. felis* (CP000053), *R. australis* (CP003338), *R. akari* (CP000847), *R. typhi* (AE017197, CP003397), *R. prowazekii* (CP003394, CP004888), disponíveis no banco de dados do *GenBank*. Como grupo externo foi incluída a sequência de *R. bellii* (CP000849, CP000087).

Na Figura 11, sequências de amostras de *D. nitens* coletadas no estado de Rondônia, no bioma Amazônia, foram agrupadas com os ramos das *R. felis* e *Ca. R. andeanae*, e amostra proveniente do estado da Bahia, pertencente ao bioma Mata Atlântica, foi agrupada com *R. rhipicephali* (Figura 11).

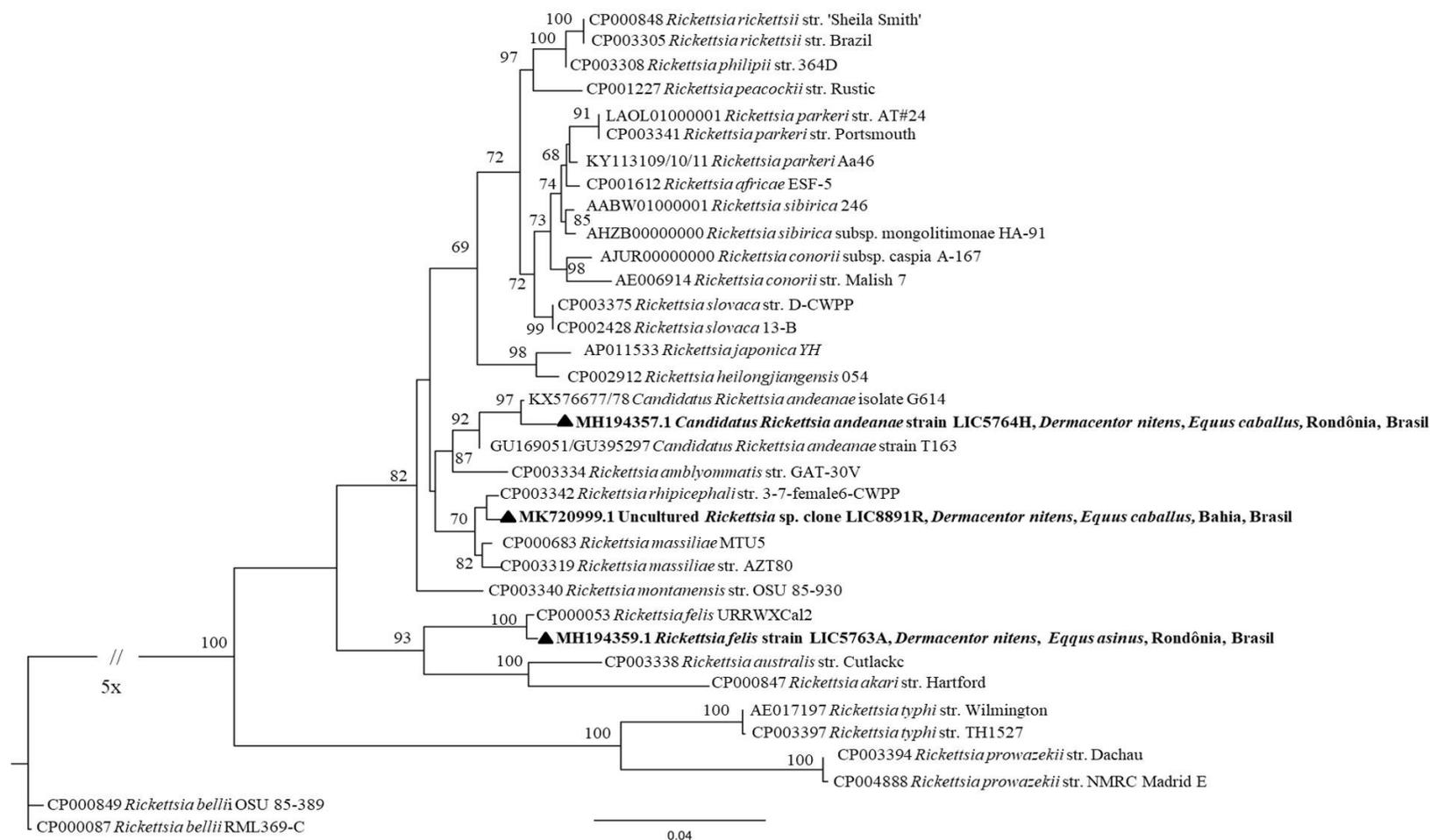


Figura 11. Inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais concatenadas dos genes *ompB*, *ompA* e *gltA* (de 862, 532 e 401 pb, respectivamente) de carrapatos *Dermacentor* (*Anocentor*) *nitens* Neumann, 1897, pelo método de máxima verossimilhança de 1.000 árvores replicadas. Como modelo evolutivo foi utilizado o algoritmo GTR+G+I e os valores de *bootstrap* superiores a 70% estão demonstrados nos ramos. As sequências obtidas nesta tese estão indicadas com um triângulo preto, precedidas pelos respectivos números de acesso ao *GenBank* e seguidas pelas informações da amostra (espécie do carrapato, hospedeiro e localidade).

4.4.3 *Erlíquias detectadas em Rhipicephalus microplus e Dermacentor nitens*

Dentre as amostras de *R. microplus* testadas por métodos moleculares, 14 amostras que foram coletadas parasitando bovinos, nos quatro estados da Região Sudeste e, também, no Paraná, região Sul do país, apresentaram resultado positivo para a presença de *Ehrlichia* sp. Após as análises de similaridade de nucleotídeos, pôde-se observar que três sequências obtidas [de MG (n=1), SP (n=1) e PR (n=1)] apresentaram 100% de identidade com *E. canis* cepa Uberlândia (GU586135), disponível no *GenBank* e 11 sequências [ES (n=1), MG (n=8), SP (n=1) e RJ (n=1)] apresentaram 99% de identidade com *Ehrlichia minasensis* cepa UFMG-EV (JX629808), disponível no *GenBank* (Tabela 19).

Todas as amostras de carrapatos *D. nitens* analisadas nos ensaios moleculares apresentaram resultado negativo para a presença de *Ehrlichia* sp.

Tabela 19. Espécies de *Ehrlichia* detectadas por análise de sequências nucleotídicas parciais do gene gênero-específico da proteína de formação de ligação dissulfeto *dsb* de amostras de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888), coletados parasitando hospedeiros vertebrados, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Estado – Bioma	Município	Hospedeiro/ Ambiente	Amostra		Identidade*
			Código/Espécime	Número de acesso	
Região Sudeste					
Espírito Santo – Mata Atlântica	Nova Venécia	<i>Bos taurus</i>	LIC 4010A/10L	MT135760	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 372/373 (99%) – JX629808
Minas Gerais – Mata Atlântica e Cerrado	Juiz de Fora	<i>Bos taurus</i>	LIC 4137A/1M	MT135758	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
	Juiz de Fora	<i>Bos taurus</i>	LIC 4138A/1M	MT135769	<i>Ehrlichia canis</i> , 386/386 (100%) – GU586135
	Juiz de Fora	<i>Bos taurus</i>	LIC 4143A/1M	MT135761	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 371/372 (99%) – JX629808
	Santo Antônio do Monte Verde	<i>Bos taurus</i>	LIC 8767B/1F	MT135762	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
	Teixeiras	<i>Bos taurus</i>	LIC 8784B/1F	MT135764	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 376/377 (99%) – JX629808
	Uberaba	<i>Bos taurus</i>	LIC 8789B/1F	MT135765	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 369/370 (99%) – JX629808
	Uberaba	<i>Bos taurus</i>	LIC 8792A/1F	MT135768	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
	Uberaba	<i>Bos taurus</i>	LIC 8792B/1F	MT135766	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 369/370 (99%) – JX629808
	Uberaba	<i>Bos taurus</i>	LIC 8792C/1F	MT135759	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
Rio de Janeiro – Mata Atlântica	Barra do Pirai	<i>Bos taurus</i>	LIC 8769A/1F	MT135763	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
São Paulo – Cerrado	Altair	<i>Bos taurus</i>	LIC 8790C/1F	MT135771	<i>Ehrlichia canis</i> , 394/394 (100%) – GU586135
	Altair	<i>Bos taurus</i>	LIC 8790E/1F	MT135767	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 373/374 (99%) – JX629808
Região Sul					
Paraná – Mata Atlântica	Inajá	<i>Bos taurus</i>	LIC 7344A/1N	MT135770	<i>Ehrlichia canis</i> , 400/400 (100%) – GU586135

M: macho; F:fêmea; L:larva; N: ninfa; *Identidades com sequências de *Ehrlichia* sp. depositadas no *GenBank*.

A reconstrução filogenética das espécies de *Ehrlichia* identificadas em *R. microplus* foi desenvolvida por meio da análise de máxima verossimilhança, com modelo evolutivo Tamura 3-parâmetros (T92+I) (Figura 12). As sequências geradas neste estudo foram depositadas no *GenBank* com os números de acesso: **MT135758, MT135759, MT135760, MT135761, MT135762, MT135763, MT135764, MT135765, MT135766, MT135767, MT135768, MT135769, MT135770 e MT135771.**

Para análise das sequências parciais do gene *dsb* de gênero-específico para *Erlichia* sp., foram utilizadas as sequências de *E. minasensis* (JX629808), *E. canis* (GU586135, AF403710, DQ460716, DQ460715), *E. chaffeensis* (AF403711), *Ehrlichia muris* (AY236484), disponíveis no banco de dados do *GenBank*. Como grupo externo foi incluída a sequência de *E. ewingii* (AY428950) e *E. ruminantum* (CR925677).

Na Figura 12, observa-se que as sequências obtidas de três amostras de carrapatos *R. microplus* de Minas Gerais, São Paulo e Paraná se agruparam com as sequências de *E. canis* (GU586135, AF403710, DQ460716, DQ460715), e, da mesma forma, outras 11 sequências obtidas de amostras provenientes dos quatro estados da região sudeste do Brasil formaram um agrupamento com sequências de *E. minasensis* (JX629808).

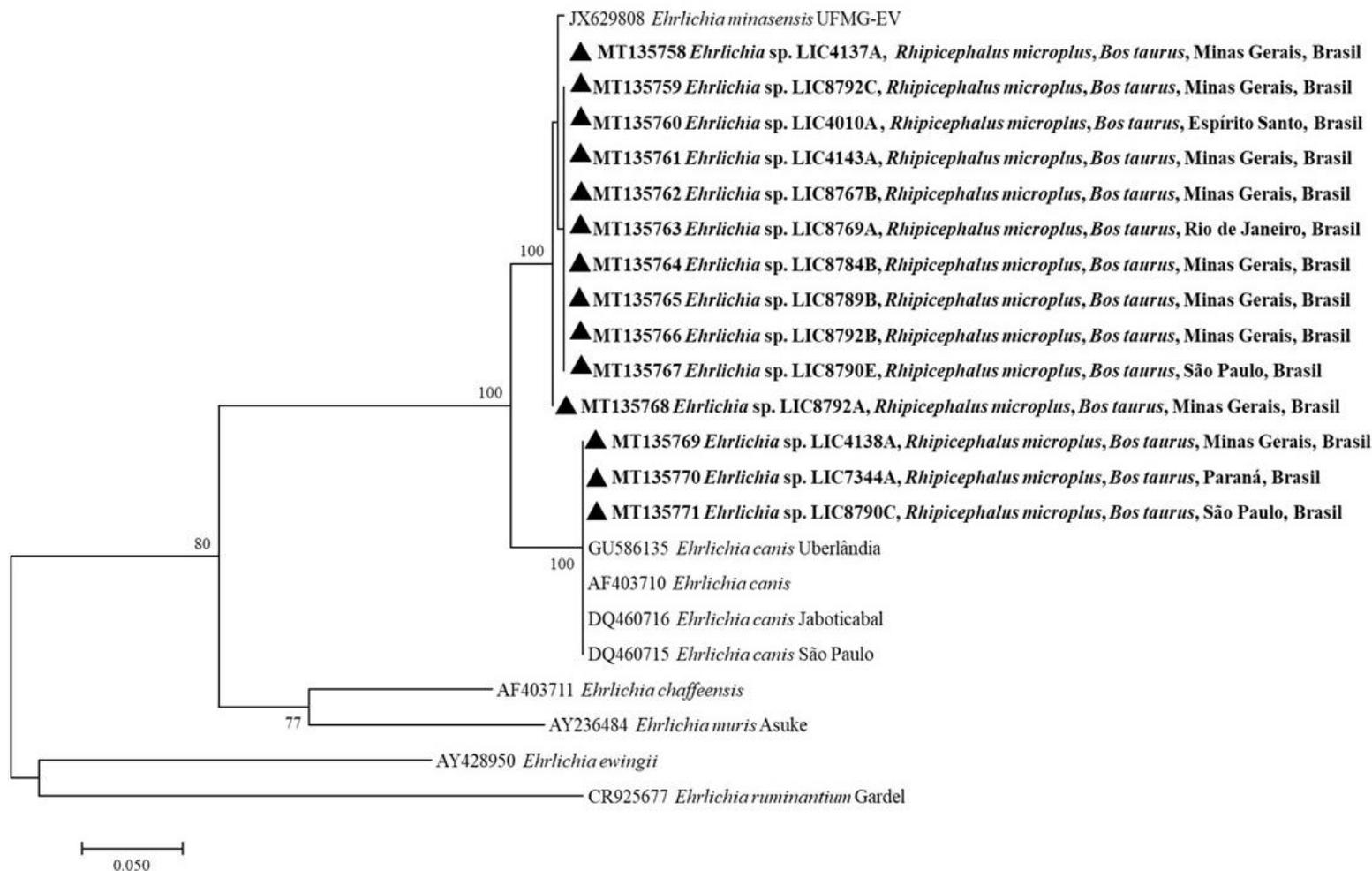


Figura 12. Inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais do gene *dsb* - *disulfide bond* (de 409 pb) de carrapatos *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1888), pelo método de máxima verossimilhança de 1.000 árvores replicadas. Como modelo evolutivo foi utilizado o algoritmo T92+I e os valores de *bootstrap* superiores a 70% estão demonstrados nos ramos. As sequências obtidas nesta tese estão indicadas com um triângulo preto, precedidas pelos respectivos números de acesso ao *GenBank* e seguidas pelas informações da amostra (espécie do carrapato, hospedeiro e localidade).

4.4.4 Babesias e Theilerias detectadas em Rhipicephalus microplus e Dermacentor nitens

Oito amostras de *R. microplus* provenientes dos estados do Minas Gerais, Rio de Janeiro e Paraná, contemplando os biomas Mata Atlântica e Cerrado, apresentaram resultado positivo para presença de *Theileria spp.* Estes carrapatos eram provenientes dos municípios: Tombos (MG), coletados em equinos (n=5); Resende (RJ), coletado em bovino (n=1), Saquarema (RJ), coletado em bovino (n=1); e Querência do Norte (PR), coletado em equino (n=1). As sequências nucleotídicas obtidas destas amostras apresentaram 100% de identidade com sequências de *T. equi* depositadas no banco de dados do *GenBank* (Tabela 20).

Da mesma forma, uma amostra de *D. nitens* coletada parasitando equino e no município Natal, estado Rio Grande do Norte, que apresenta o bioma Caatinga, demonstrou resultado positivo para *Babesia spp.* A análise de similaridade de nucleotídeos do BLAST indicou que a sequência obtida apresenta 99% de identidade com *B. caballi* (Tabela 20).

Tabela 20. Espécies de *Babesia* e *Theileria* detectadas por análise de sequências nucleotídicas parciais do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal 18S (18S rRNA) de amostras de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897, coletados parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Estado – Bioma	Município	Hospedeiro/ Ambiente	Amostra		Identidade*
			Código/Espécime	Número de acesso	
<i>Dermacentor nitens</i>					
Região Norte					
Rio Grande do Norte – Mata Atlântica – Caatinga	Natal	<i>Equus asinus</i>	LIC6049C/1M	MT129634	<i>Babesia caballi</i> , 387/388 (99%) – AY309955
<i>Rhipicephalus microplus</i>					
Região Sudeste					
Rio de Janeiro – Mata Atlântica	Resende	<i>Bos taurus</i>	LIC4953A/1F	MT129635	<i>Theileria equi</i> , 344/344 (100%) – MG052902
	Saquarema	<i>Bos taurus</i>	LIC6010A/1M	MT129642	<i>Theileria equi</i> , 405/405 (100%) – KX165376
Minas Gerais – Mata Atlântica	Tombos	<i>Equus caballus</i>	LIC5751L1/1F	MT129636	<i>Theileria equi</i> , 319/319 (100%) – KX165376
	Tombos	<i>Equus caballus</i>	LIC5751N1/1F	MT129637	<i>Theileria equi</i> , 415/415 (100%) – KX165376
	Tombos	<i>Equus caballus</i>	LIC5751R1/1F	MT129638	<i>Theileria equi</i> , 413/413 (100%) – KX165376
	Tombos	<i>Equus caballus</i>	LIC5751Z/1F	MT129639	<i>Theileria equi</i> , 413/413 (100%) – KX165376
	Tombos	<i>Equus caballus</i>	LIC5751Z1/1F	MT129640	<i>Theileria equi</i> , 402/402 (100%) – KX165376
Região Sul					
Paraná - Mata Atlântica	Querência do Norte	<i>Equus caballus</i>	LIC5978C/1F	MT129641	<i>Theileria equi</i> , 415/415 (100%) – KX165375

M: macho; F: fêmea; *Identidades com sequências de *Babesia* sp. e *Theileria* sp. depositadas no *GenBank*.

A reconstrução filogenética de *Babesia* e *Theileria* identificadas em amostras das duas espécies de carrapatos aqui estudadas foi desenvolvida por meio da análise de máxima verossimilhança, com modelo evolutivo Kimura 2-parâmetros (K2) (Figura 13). As sequências geradas nesta tese foram depositadas no *GenBank* com os números de acesso **MT129634, MT129635, MT129636, MT129637, MT129638, MT129639, MT129640, MT129641 e MT129642.**

Para análise das sequências do 18S rRNA de *Babesia* e *Theileria*, foram utilizadas as sequências de *T. equi* (KX165376, MG052902), *B. caballi* (AY309955), *Babesia gibsoni* WH71 (KP666160), disponíveis no banco de dados do *GenBank*. Como grupo externo foi incluída a sequência de *Theileria parva* (L02366), *Babesia bigemina* JRCH-1 (JX974332) e *Babesia microti* BmSSR2183 (LC005772).

Na Figura 13, o filodendograma construído demonstrou que as sequências obtidas das amostras de *R. microplus* se agruparam com o clado de *T. equi* DN126 (KX165376) e *T. equi* BR_NES (MG052902). Enquanto que a sequência obtida da amostra de *D. nitens* se mostrou filogeneticamente relacionada a *B. caballi* (AY309955).

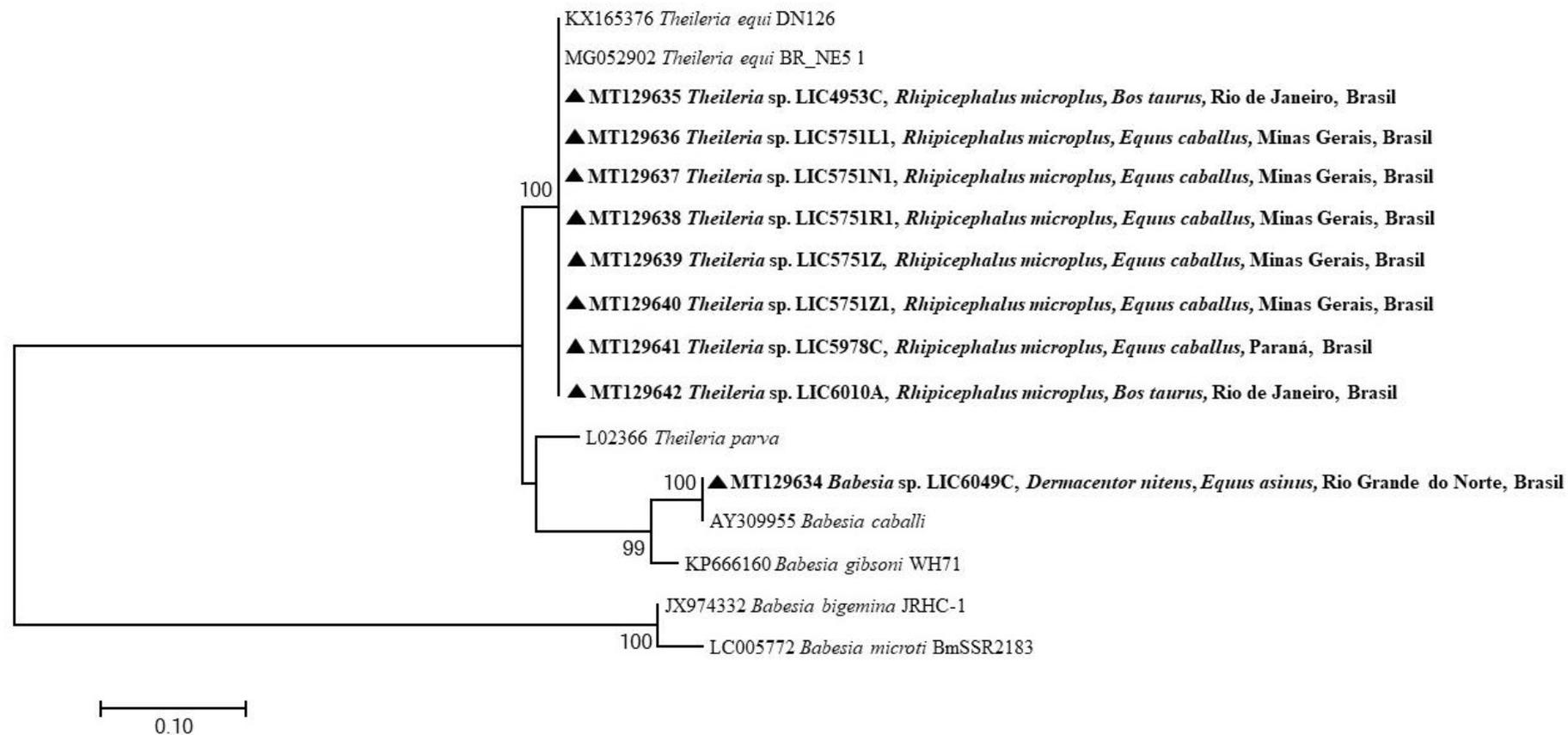


Figura 13. Inferências filogenéticas da comparação das sequências parciais do gene que codifica a subunidade menor do RNA ribossomal 18S (18S rRNA) (de 395 a 410 pb) de carrapatos *Dermacentor* (*Anocentor*) *nitens* Neumann, 1897 e *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1888), pelo método de máxima verossimilhança de 1.000 árvores replicadas. Como modelo evolutivo foi utilizado o algoritmo K2 e os valores de *bootstrap* superiores a 70% estão demonstrados nos ramos. As sequências obtidas nesta tese estão indicadas com um triângulo preto, precedidas pelos respectivos números de acesso ao *GenBank* e seguidas pelas informações da amostra (espécie do carrapato, hospedeiro e localidade).

4.4.5 Pesquisa de *Anaplasma* e *Borrelia* em *Rhipicephalus microplus* e *Dermacentor nitens*

Todas as amostras de carrapatos *R. microplus* (n=620) e *D. nitens* (n=177) testadas nos ensaios moleculares apresentaram resultado negativo para a presença de *Anaplasma* sp. e *Borrelia* sp.

4.5 Relação entre patógenos e haplótipos

Os dados obtidos para relação das amostras e *R. microplus* positivas para bioagentes e haplótipos correspondentes, foi observado que o haplótipo hI do 12S rDNA foi encontrado nas amostras positivas para *R. felis*, *R. bellii* e *E. minasensis*, no bioma Mata Atlântica e Mata Atlântica – Pampa. Dois haplótipos de COX-I (h1 e h2) foram observados em amostras positivas para riquetsias. O haplótipo h1 em amostras positivas para *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *E. minasensis*, provenientes do bioma Mata Atlântica, Cerrado, Cerrado – Mata Atlântica, respectivamente. O haplótipo h2 em amostras positivas para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *T. equi* e *E. minasensis*, provenientes dos mesmos biomas citados anteriormente e incluindo o bioma Mata Atlântica – Pampa. Para a região *D-loop* apresentou apenas o hA que foi visualizado em amostras positivas para *E. minasensis* do bioma Mata Atlântica (Tabela 21).

Em relação as amostras de *D. nitens*, dois haplótipos foram observados nas amostras positivas para riquetsias. O haplótipo h1 em amostras positivas para *R. felis* e *Ca. R. andeanae*, provenientes do bioma Amazônia, e o haplótipo h2 em amostra positiva para *R. rhipicephali* no bioma Mata Atlântica. E ainda, um haplótipo (h2) em amostra positiva para *B. caballi*, no Bioma Mata Atlântica e Caatinga (Tabela 22).

Tabela 21. Relação das amostras de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) que amplificaram fragmentos de genes de bioagentes transmitidos por carrapatos e os haplótipos identificados

Município (UF)	Hospedeiro/ Ambiente	Amostra Código/Espécime	Haplótipos			Bioagente		Identidade* Resíduos Idênticos/Alinhados – N° de Acesso
			12SrDNA	COX-I	D-loop	Gene	N° de Acesso	
Bioma Cerrado								
Altair (SP)	<i>Bos taurus</i>	LIC8790C/1F	-	-	-	<i>dsb</i>	MT135771	<i>Ehrlichia canis</i> , 394/394 (100%) – GU586135
Altair (SP)	<i>Bos taurus</i>	LIC8790D/1F	-	-	-	<i>gltA</i>	MK720998	<i>Rickettsia rhipicephali</i> 350/350 (100%) – KX434745
Itumbiara (GO)	Ambiente	LIC8928G/10L	**	**	**	<i>gltA</i>	MK720997	<i>Rickettsia felis</i> , 350/350(100%) – MG952933
Palmas (TO)	<i>Bos taurus</i>	LIC7001B/1F	-	h2	-	<i>gltA</i>	MK720994	<i>Rickettsia parkeri</i> 350/350 (100%) – MH160728
Palmas (TO)	<i>Bos taurus</i>	LIC7001E/1F	-	h1	-	<i>gltA</i>	MK720995	<i>Rickettsia parkeri</i> 350/350 (100%) – MH160728
Tiros (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC8786E/1F	-	-	-	<i>gltA</i>	MK720996	<i>Rickettsia rhipicephali</i> 349/350 (99%) – KX434745
Bioma Cerrado - Mata Atlântica								
Santo Antônio do Monte Verde (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 8767B/1F	-	h1	-	<i>dsb</i>	MT135762	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
Uberaba (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 8789B/1F	-	h2	-	<i>dsb</i>	MT135765	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 369/370 (99%) – JX629808
Uberaba (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 8792A/1F	-	h2	-	<i>dsb</i>	MT135768	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
Uberaba (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 8792B/1F	-	h2	-	<i>dsb</i>	MT135766	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 369/370 (99%) – JX629808
Uberaba (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 8792C/1F	-	h2	-	<i>dsb</i>	MT135759	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
Bioma Mata Atlântica								
Aratuba (CE)	<i>Bos taurus</i>	LIC3764A/1M	hI	-	-	<i>gltA</i>	MH194351	<i>Rickettsia bellii</i> , 349/350 (99%) – MG550957
Baturité (CE)	<i>Bos taurus</i>	LIC3528B/1F	-	h1	-	<i>gltA</i>	MH194350	<i>Rickettsia rickettsii</i> , 350/350 (100%) – MF988097
Baturité (CE)	<i>Bos taurus</i>	LIC4523A/1M	-	h2	-	<i>gltA</i>	MH194352	<i>Rickettsia rickettsii</i> , 350/350 (100%) – JN252696
Capistrano (CE)	<i>Bos taurus</i>	LIC4970B/1F	-	-	-	<i>gltA</i>	MK720993	<i>Rickettsia tamurae</i> 786/786 (100%) – MH158234
Inajá (PR)	<i>Bos taurus</i>	LIC7344A/1N	hI	**	**	<i>dsb</i>	MT135760	<i>Ehrlichia canis</i> , 400/400 (100%) – GU586135
Juiz de Fora (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 4137A/1M	hI	-	hA	<i>dsb</i>	MT135758	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 382/383 (99%) – JX629808
Juiz de Fora (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 4138A/1M	-	-	-	<i>dsb</i>	MT135769	<i>Ehrlichia canis</i> , 386/386 (100%) – GU586135
Juiz de Fora (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 4143A/1M	-	-	hA	<i>dsb</i>	MT135761	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 371/372 (99%) – JX629808
Nova Venécia (ES)	<i>Bos taurus</i>	LIC 4010A/10L	**	**	**	<i>dsb</i>	MT135760	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 372/373 (99%) – JX629808
Pato Bragado (PR)	<i>Bos taurus</i>	LIC8514C/1N	-	-	-	<i>gltA</i>	MH194354	<i>Rickettsia parkeri</i> , 350/350 (100%) – MF536974
						<i>ompA</i>	MH194358	<i>Rickettsia parkeri</i> , 491/491 (100%) – MF536975
						<i>sca4</i>	MH194355	<i>Rickettsia parkeri</i> , 701/701 (100%) – KY124260

Continua

Município (UF)	Hospedeiro/ Ambiente	Amostra Código/Espécime	Haplótipos			Bioagente		Identidade* Resíduos Idênticos/Alinhados – N° de Acesso
			12SrDNA	COX-I	D-loop	Gene	N° de Acesso	
Querência do Norte (PR)	<i>Equus caballus</i>	LIC5978C/1F	-	-	-	<i>18S rRNA</i>	MT129641	<i>Theileria equi</i> , 415/415 (100%) – KX165375
Resende (RJ)	<i>Bos taurus</i>	LIC4953A/1F	-	h2	-	<i>18S rRNA</i>	MT129635	<i>Theileria equi</i> , 344/344 (100%) – MG052902
Saquarema (RJ)	<i>Bos taurus</i>	LIC6010A/1M	-	-	-	<i>18S rRNA</i>	MT129642	<i>Theileria equi</i> , 405/405 (100%) – KX165376
Senges (PR)	Ambiente	LIC7156/10L	**	**	**	<i>ompB</i>	MH194360	<i>Rickettsia felis</i> , 619/630 (98%) – KX090276
Teixeiras (MG)	<i>Bos taurus</i>	LIC 8784B/1F	-	h2	-	<i>dsb</i>	MT135764	<i>Ehrlichia minasensis</i> , 376/377 (99%) – JX629808
Tombos (MG)	<i>Equus caballus</i>	LIC5751L1/1F	-	-	-	<i>18S rRNA</i>	MT129636	<i>Theileria equi</i> , 319/319 (100%) – KX165376
Tombos (MG)	<i>Equus caballus</i>	LIC5751N1/1F	-	-	-	<i>18S rRNA</i>	MT129637	<i>Theileria equi</i> , 415/415 (100%) – KX165376
Tombos (MG)	<i>Equus caballus</i>	LIC5751R1/1F	-	-	-	<i>18S rRNA</i>	MT129638	<i>Theileria equi</i> , 413/413 (100%) – KX165376
Tombos (MG)	<i>Equus caballus</i>	LIC5751Z/1F	-	-	-	<i>18S rRNA</i>	MT129639	<i>Theileria equi</i> , 413/413 (100%) – KX165376
Tombos (MG)	<i>Equus caballus</i>	LIC5751Z1/1F	-	-	-	<i>18S rRNA</i>	MT129640	<i>Theileria equi</i> , 402/402 (100%) – KX165376
Bioma Mata Atlântica – Pampa								
Osório (RS)	<i>Equus caballus</i>	LIC5552C/1M	hI	h2	-	<i>gltA</i>	MH194353	<i>Rickettsia felis</i> , 350/350 (100%) – KY172878
					-	<i>htrA</i>	MH194356	<i>Rickettsia felis</i> , 499/499 (100%) – CP000053

M: macho; F: fêmea; N: ninfa; L: larva; *Identities com sequências depositadas no *GenBank*;

Conclusão

** amostra de larvas não foram utilizadas para análises de haplótipos; - não foram obtidas sequências destas amostras.

Tabela 22. Relação das amostras de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 que amplificaram fragmentos de genes de bioagentes transmitidos por carrapatos e os haplótipos identificados

Município (UF)	Hospedeiro/ Ambiente	Amostra Código/Espécime	Haplótipos			Bioagente		Identidade* Resíduos Idênticos/Alinhados – N° de Acesso
			12SrDNA	COX-1	D-loop	Gene	N° de Acesso	
Bioma Amazônia								
Porto Velho (RO)	<i>Equus caballus</i>	LIC5763A/1N	**	h1	***	<i>ompB</i>	MH194359	<i>Rickettsia felis</i> , 628/630 (99%) – KX090276
Porto Velho (RO)	<i>Equus asinus</i>	LIC5764H/1N	**	h1	***	<i>ompA</i>	MH194357	<i>Candidatus Rickettsia andeanae</i> , 488/488 (100%) – KY27359
Bioma Mata Atlântica								
Valença (BA)	<i>Equus caballus</i>	LIC8891R/ 1M	**	h2	***	<i>gltA</i>	MK720999	<i>Rickettsia rhipicephali</i> , 399/402 (99%) – CP0131133
Bioma Mata Atlântica - Caatinga								
Natal (RN)	<i>Equus asinus</i>	LIC6049C/1M	**	h2	***	<i>18S rRNA</i>	MT129634	<i>Babesia caballi</i> , 387/388 (99%) – AY309955

M: macho; F: fêmea; N: ninfa; *Identidades com sequências depositadas no *GenBank*; **número de sequências insuficiente para gerar haplótipos;

***não foram obtidas sequências destas amostras para região *D-loop*.

5 DISCUSSÃO

Os estudos de genética de população de carrapatos servem como conexão entre a biologia básica dos vetores e a investigação de patógenos transmitidos por carrapatos. Além disso, implicam em novas perspectivas sobre aspectos evolutivos que impulsionam o fluxo gênico, a distribuição das espécies e adaptações em hospedeiros que podem influenciar a especificidade e resistência de doenças e acaricidas (Araya-Anchetta et al., 2015).

É importante ressaltar que dentre os artrópodes, estes parasitos vetores possuem a mais ampla variedade de patógenos transmitidos conhecidos, levando a problemas de saúde pública e perdas econômicas na pecuária (Parola e Raoult, 2001; Jongejan e Uilenberg, 2004; Hill e Wikel, 2005; Pagel Van Zee et al., 2007). E como parasitos obrigatórios e vetores, os carrapatos influenciam diretamente seus hospedeiros e os patógenos que transmitem (Anderson e Magnarelli, 2008; Hill e Wikel, 2005; Pagel Van Zee et al., 2007; Sonenshine, 1993). Cada membro de um o sistema hospedeiro-vetor-patógeno é afetado pelos outros atores; este efeito combinado pode influenciar a variação genética em carrapatos (Jongejan et al., 2007).

5.1 *Rhipicephalus microplus*

Em 1986 foi realizado a primeira investigação sobre a diferenciação genética entre quatro populações naturais e quatro colônias de laboratório de *R. microplus* utilizando isoenzimas (Sattler et al., 1986). Em contraste com a baixa estrutura genética inferida pelas isoenzimas mitocondriais, o avanço do conhecimento e do aprimoramento das ferramentas de análise populacional exibiram diferenciação genética muito maior entre populações desse carrapato do sul do Texas (Busch et al., 2014) e caracterizaram a formação de clado

constituído por populações de *R. microplus* do Brasil, China e Camboja (Burger et al., 2014), demonstrando uma nova compreensão sobre a diversidade populacional desta espécie.

Estudos recentes continuam focando na caracterização molecular deste ixodídeo, trazendo novas informações sobre a diversidade críptica e conjuntos genéticos distintos em todo o mundo. Em 2015, pesquisadores da Malásia propuseram que o complexo destes carrapatos é composto por pelo menos cinco táxons, sendo que alguns, como *R. microplus* e *Rhipicephalus australis*, coexistem em determinados países asiáticos (Low et al., 2015). Populações de *R. microplus* da Austrália, Nova Caledônia, Bornéu, Filipinas, Camboja, Nova Guiné, Taiti e Indonésia, obtiveram uma renomeação de *R. microplus* em *R. australis*, devido estudos baseados em análises das características morfológicas e no DNA mitocondrial com os genes 12S rDNA e 16S rDNA, que deram suporte para a reclassificação do carrapato (Ali et al., 2016).

Visando novas perspectivas relacionadas com o entendimento do caráter genético do *R. microplus*, Csordas et al. (2016) mostraram que os representantes dessa espécie no Brasil são constituídos por, ao menos, duas populações, ressaltando que um maior número de amostras permitiria maior capacidade de identificação e compreensão destas populações.

Experimentos com um número maior de amostras de carrapatos, provenientes de diferentes localizações geográficas, como as amostras do presente estudo, também foram sugeridos por Labruna et al. (2009), que já haviam levantado a hipótese de que pelo menos duas espécies diferentes evoluíram sob o nome *R. microplus* em nível mundial.

Nossos resultados trazem essa análise de acordo com o proposto pelos autores, e foi constatado que a diversidade intraespecífica de *R. microplus* encontrada no território brasileiro foi próxima ao já observado em estudos anteriores (Labruna et al., 2009; Csordas et al., 2016), pelo encontro de quatro haplótipos [(hI – 12S rDNA), (h1 e h2 – COX- I) e (hA – *D-loop*)] presentes em todas as populações e biomas estudados, somado a presença de haplótipos exclusivos (hII e hIII – 12S rDNA, h3 – h7 COX-I) mesmo que em baixa

frequência e associados a diferenciação por uma ou duas mutações (Figura 3 e 4, Tabela 3 e 5).

Os testes de neutralidade, o F_s de Fu e D de Tajima apresentaram valores significativos para populações dos biomas estudados, com exceção dos biomas Pampa e Amazônia (Tabela 4). Dessa forma, é sugerido que populações de *R. microplus* de MG, PR, ES e RJ (Mata Atlântica), RN (Mata Atlântica - Caatinga), CE (Mata Atlântica e Caatinga), GO e MG (Cerrado), MG (Cerrado – Mata Atlântica) e RS (Mata Atlântica – Pampa) possam estar em expansão (Tabela 4).

As estimativas de diferenciação genética revelaram valores significativos para os biomas contemplados no estudo, com exceção do bioma Amazônia e Pampa (Tabela 6 e 7). Contudo, essa diferenciação genética não está associada às distâncias geográficas (Tabela 8). A AMOVA em adição aos resultados das demais análises sugerem que não há estruturação de *R. microplus* de acordo com os biomas (grupos) analisados. Entretanto, é plausível a hipótese de que exista alguma estruturação entre as populações, possivelmente de acordo com as áreas/períodos de coleta (Tabela 9).

Essa ausência de estruturação populacional pode estar intimamente relacionada com a dispersão desse carrapato através de seu principal hospedeiro, os bovinos. Devido ao seu valor comercial e relevância para agropecuária, bovinos têm grande movimentação não apenas pelo território brasileiro, mas também entre países, o que permite a manutenção do fluxo genético entre essas populações, assim como sua expansão invasiva (Lewis et al., 1970; Madder, 2011; Busch et al., 2014).

Os haplótipos detectados, na filogenia do 12S rDNA, agruparam com amostras de Uganda e República Democrática do Congo (Figura 6), filogeneticamente relacionada a sequências que fazem parte do complexo de *R. microplus* em Burguer et al. (2014), dentre elas três sequências (EU921769-71) renomeadas para *R. australis* (Ali et al., 2016; Roy et al., 2018), bem como de sequências componentes do clado C em Low et al. (2015).

Para a topologia das árvores COX-I mostrou ter a vantagem de apresentar maiores taxas de mutação do que outro gene, corroborando os dados apresentados por Burguer et al. (2014), Csordas et al. (2016) e Amzati et al. (2018). Na filogenia inferida para este gene, os haplótipos exclusivos do bioma Cerrado (h3), bioma Mata Atlântica (h5) e o haplótipo h1 formaram um clado com sequências do clado B conformado em Csordas et al. (2016), USA, Panamá e Colômbia, formando o *R. microplus* clado A designado por Burguer., (2014). O h2 em conjunto com h4, h6 e h7 (exclusivos da população do bioma Mata Atlântica) agruparam com espécimes de *R. microplus* do clado A e B considerados por Csordas et al. (2016) e do complexo *R. microplus* segundo Burguer et al. (2014) (Figura 7).

As análises filogenéticas aqui apresentadas (Figuras 6 e 7) mostram sequências de *R. microplus* da África do Sul, Argentina, Benin, Bolívia, Brasil, Camboja, Colômbia, Costa Rica, Estados Unidos, Guiana Francesa, Madagascar, Moçambique, Panamá, Paraguai, República Democrática do Congo, Tanzânia, Uganda e Uruguai. Estas sequências foram denominadas de “clado A” por Burger et al. (2014).

É sugerido que o clado A de *R. microplus* tenha sido originado na Ásia e depois se espalhou para outros continentes através transporte de gado (Barre e Uilenberg, 2010). Este clado pode ser encontrado em todos os países da região Neotropical, exceto no Chile (Guglielmone et al., 2003) e foi recentemente importado para a África Ocidental, presumivelmente do Brasil com o gado Girolando, onde parece estar deslocando outras espécies nativas da região do mesmo subgênero (De Clercq et al., 2012).

Dispersou para vários países da África Ocidental (Madder et al., 2007; Madder et al., 2012; Adakal et al., 2013; Kamani et al., 2017). Provavelmente introduzido da Ásia para África do Sul e Oriental, presumivelmente através de Madagascar, no final do século XIX ou início do século XX (Hoogstraal, 1956). Ocorre em áreas dispersas em climas de savana, do sul da faixa costeira do Quênia, ao norte, até a Província do Cabo Ocidental da África do Sul no sul, bem como em Madagascar (Walker et al., 2003).

Embora a propagação de *R. microplus* permaneça não muito bem documentada, a hipótese de que tenha se originado na Índia (Hoogstraal, 1986) e depois se espalhou para Madagascar e África do Sul é bem aceitável. Existem poucas evidências de como ou quando a espécie se espalhou para as Américas (Labruna et al., 2009), mas provavelmente ocorreu em bovinos da Índia ou da África nos séculos XVI e XVII (Barré e Uilenberg, 2010). Também foi recentemente relatado como uma espécie introduzida na África Ocidental, onde parece estar substituindo as espécies locais do Gênero, incluindo *R. annulatus* (Madder et al., 2007, 2011, 2012). A introdução no Brasil ocorreu em meados do século XVIII, por meio da dispersão global de animais domésticos (González, 1995), espalhando-se rapidamente por todo o país e ocupando diferentes biomas.

Da mesma forma, sequências de *R. microplus* denominadas “Clado C” por Low et al. (2015) estão presentes nas filogenias realizadas neste estudo (Figuras 6 e 7) como Bangladesh, Índia, Malásia, Myanmar e Paquistão. Espécimes pertencentes a este clado costumam estar associado à raça Nelore (Low et al., 2015). Austrália, Indonésia e Nova Caledônia formaram o clado de *R. australis* (Roy et al., 2018). De origem na Indonésia, teve sua distribuição com o transporte de gado de Timor para a Austrália (Angus, 1996).

5.2 *Dermacentor nitens*

Algumas espécies do gênero *Dermacentor*, têm sido o foco de estudos genéticos populacionais múltiplos (De la Fuente et al., 2005; Lysyk e Scoles, 2008; Patterson et al., 2009; Krakowetz et al., 2010; Dharmarajan et al., 2010; Leo et al., 2010, 2012, 2014; Araya-Anchetta et al., 2013, Chen et al., 2014, Rivera-Páes et al., 2018) e até hoje a espécie deste gênero com maior relevância para o Brasil, *D. nitens*, permanece sem informação sobre sua dinâmica populacional e potencial ligação com capacidade vetorial no país.

O presente estudo traz aspectos inéditos relacionados com o entendimento da diversidade genética do *D. nitens*. O encontro de três haplótipos (hA, h1 e h2) em quase todas as populações e biomas estudados, somado a presença de haplótipos exclusivos (hB – *D-loop*, h3 – COX-I) para a população do RJ (bioma Mata Atlântica), ainda que em baixa frequência, acrescentado a diferenciação por uma mutação (Figura 5, Tabela 10 e 12), infere que a diversidade intraespecífica de *D. nitens* encontrada no território brasileiro é reduzida em relação a outra espécie do gênero *Dermacentor* (Lysyc e Scoles, 2008; Patterson et al., 2009; Leo et al., 2010), bem como quando comparada com outros estudos de genética de população de carrapatos no país (Bitencourth et al., 2016, 2017, 2019; Fournier et al., 2019).

Ainda que os testes de neutralidade tenham apresentado valores não significativos, o que sugeriria uma população em equilíbrio (Tabela 11). As análises de F_{ST} , para o COX-I, indicaram estimativas de diferenciação genética significativas entre as populações de *D. nitens* de acordo com os biomas analisados (Mata Atlântica-Caatinga, Mata Atlântica, Cerrado e Amazônia) (Tabela 13 e 14). Essa diferenciação genética pode estar associada às distâncias geográficas entre as populações (Tabela 15). Nesse sentido, no COX-I há possibilidade de estruturação genética de acordo com os biomas, pois a maior parte da variância molecular ocorreu entre grupos (biomas) (Tabela 16). No entanto a rede de haplótipos e demais análises não corroboram essa hipótese.

A ausência de estruturação entre populações de espécies de carrapato com ampla distribuição geográfica pode ser associada também aos movimentos de seus hospedeiros (*e.g.* Madhav et al., 2004; Kempf et al., 2009). O Brasil possui o maior rebanho de equinos da América Latina e o terceiro maior rebanho do mundo. Nesse contexto, somente com a produção de cavalos o país movimenta pouco mais de 7 bilhões de reais (PNSE, 2010). Dessa forma, a dispersão através do hospedeiro pode ser o principal fator responsável pela inexistência de estruturação nas populações de *D. nitens*.

Em análise filogenética do gene 12S rDNA, houve agrupamento de amostras obtidas dos biomas Amazônia (MA, RR), Mata Atlântica (RJ) e Cerrado (GO) com sequência brasileira do Mato Grosso do Sul (Cerrado) e da Guatemala do *GenBank* (Figura 8). Formando um clado de *D. nitens* e separado das demais espécies do gênero, não evidenciando nenhuma estruturação. Devido à quantidade de sequências obtidas para esse marcador, não foi possível inferir dados sobre a genética de população de *D. nitens*.

Assim como descrito por Chen et al. (2014), dois grandes clados constituídos por espécies do gênero *Dermacentor* da linhagem da Eurásia e Neártico foram formados neste trabalho, apoiando a hipótese de que este gênero é composto, pelo menos, de duas linhagens.

A filogenia inferida para o gene COX-I apresenta quatro agrupamentos para *D. nitens*, separado das demais espécies do gênero, sendo: agrupamento dos haplótipos h1 e h3 com amostras da Colômbia, Panamá e Guiana Francesa (sem valor de suporte); agrupamento Leticia (Colômbia); agrupamento do haplótipo h2 com sequências de PE e AP (Brasil); e *D. nitens* de diferentes locais do Brasil (com valor de suporte igual ou maior que 70%). Em estudo anterior, as sequências da Colômbia também ficaram separadas em dois clados, onde sequências da localidade Leticia, área fronteira com Brasil (estado da Amazônia) e Peru, divergiram de outras cidades localizadas no outro extremo do país (Rivera-Páes et al., 2018).

E ainda que não ocorra uma estruturação populacional por biomas, é possível que outro fator influencie no agrupamento dessas sequências, como observado por Rivera-Páes et al. (2018).

O fator bioma foi considerado na análise genética de populações de *D. andersoni* de áreas de pradarias e montanhosas, onde a população de pradaria apresentou um maior nível de diversidade genética (Lysyc e Scoles, 2008). Além disso, a diferença na composição genética das populações parece ter surgido por meio do isolamento geográfico, pois populações de pradarias não compartilharam nenhum haplótipo com a população montanhosas (Lysyc e Scoles, 2008; Patterson et al., 2009).

Estudos de variância em sequências de genes do mtDNA indicaram duas linhagens divergentes de *D. albipictus*, diferente dos outros caracteres estudados, tais como variância morfológica de aerópilos, sequências genéticas nucleares e endossimbiontes bacterianos (Leo et al., 2010). Já no Brasil, foi constatada a variação morfológica do número de aerópilos em *D. nitens* como indicativo de estado adaptativo (Gazêta et al., 2001), estes resultados adicionados aos recentes dados de filogenia em *Dermacentor* (Leo et al., 2010) nos faz considerar sobre a importância de abordagens integrativas na delimitação de espécies.

Diante do exposto para as duas espécies estudadas, foi verificado assim a baixa diversidade genética e ausência de estruturação estabelecida, corroborando com estudos anteriores no Brasil (Csordas et al., 2016, 2018) e divergindo de estudos realizados para o gênero *Amblyomma*, que apresentou estruturação populacional para determinados biomas (Martins et al., 2016; Ogrzewalska et al., 2016; Bitencourth et al., 2017, 2019; Founier et al., 2019).

5.3 Pesquisa de bioagentes nos carrapatos

Até o momento, poucos estudos detectaram presença de *Rickettsia* em carrapatos *R. microplus*: infecção por *R. amblyomatis* no Panamá (Eremeeva et al., 2009), *Rickettsia* sp. cepa Columbianense na Colômbia (Miranda et al., 2012), *Rickettsia* sp. cepa 12G1 no Equador (Pesquera et al., 2015) e *R. rickettsii* no Brasil (Moura-Martiniiano et al., 2014).

Nesse sentido, nossos resultados evidenciaram, pela primeira vez, sequências geneticamente relacionadas a *R. tamurae*, *R. rhipicephali*, *R. parkeri*, *R. felis* e *R. bellii* em *R. microplus*. Adicionalmente, os resultados aqui apresentados indicaram sequências relacionadas a *R. rickettsii* em *R. microplus* pela primeira vez no estado do Ceará, nordeste do Brasil.

As cepas Columbianense e 12G1 estão relacionadas geneticamente a *R. tamurae*, bem como outras cepas registradas no Brasil: cepa Pampulha do estado de Minas Gerais (Szabó et al. 2013; Guedes et al., 2011; Sato et al., 2019), cepa Serra dos Órgãos do estado do Rio de Janeiro (Spolidorio et al., 2012) e cepa Aragoi do estado do Paraná (Blanco et al., 2016). Embora exista evidência desta *Rickettsia* em diferentes áreas do Brasil e em diferentes espécies de vetores, o mecanismo pelo qual os carrapatos do boi são infectados por esta bactéria ainda é desconhecido.

A bactéria *R. rhipicephali* é comumente relatada em carrapatos *R. sanguineus*, com encontros esporádicos em espécies de *Dermacentor* nos Estados Unidos (Wikswa et al., 2008). Já no Brasil, foi detectada em *Amblyomma* sp. no estado de Minas Gerais (Zeringóta et al., 2016) e também em *Haemaphysalis juxtakochi* nos estados de Rondônia, São Paulo e Mato Grosso (Labruna et al., 2005; Labruna et al., 2007; Soares et al., 2015). Embora *H. juxtakochi* mostre afinidade pelos hospedeiros cervídeos, foi relatado parasitar uma variedade de outras espécies de vertebrados (Guimarães et al., 2001; Guglielmone et al., 2014), incluindo cães domésticos e humanos (Labruna et al., 2005). Demonstrando a proximidade de *H. juxtakochi* às áreas antrópicas, permitindo uma possível aquisição de *Rickettsia* por *R. microplus* por co-alimentação nos hospedeiros vertebrados. Portanto, a infecção por *R. microplus* por *R. rhipicephali* pode não ser tão aleatória, dependendo da área.

Outra possibilidade para a introdução de *R. rhipicephali* em uma população local de carrapatos é a migração de aves, que servem de hospedeiro para uma variedade de espécies de carrapatos (Ogrzewalska et al., 2010; Luz et al., 2017) e potenciais vetores de patógenos, incluindo *Rickettsia* (Ogrzewalska e Pinter, 2016). Sabe-se um importante papel desempenhado pelas aves como portador de parasitas por longas distâncias, inclusive através de barreiras geográficas. Um carrapato infectado inserido por aves em uma população de carrapatos não infectados pode transmitir patógenos co-alimentando em um novo hospedeiro.

No entanto, são necessários mais estudos para entender essa forma de circulação de *Rickettsia* no Brasil e em toda a sua gama de hospedeiros.

Como discutido para *R. rhipicephali*, os carrapatos das aves representam um recurso valioso para a compreensão da bioecologia desses patógenos transmitidos por carrapatos. No Brasil, o potencial papel das aves na dispersão de *A. ovale* infectado com *R. parkeri* foi sugerido (Luz et al., 2017), e os resultados obtidos aqui mostram uma nova área de ocorrência para esta bactéria. As amostras LIC7001B e LIC7001E (Tabela 17) são carrapatos de *R. microplus* coletados parasitando bovinos em uma área do bioma Cerrado no estado do Tocantins, região norte do país, evidenciando diferentes características eco-epidemiológicas do padrão geralmente observado para *R. parkeri* na país.

Em várias regiões das Américas, *R. parkeri* é relatado como indutor de uma forma clínica leve de FM (Parola et al., 2013). No Brasil, *R. parkeri* ocorre em várias regiões, estando envolvido em casos humanos de FM nos estados da região sul, sudeste e nordeste (Szabó et al., 2013; Oliveira et al., 2016a; Faccini-Martínez et al., 2018) e em um enzoótico ciclo associado a *A. ovale* e cães (Szabó et al., 2013; Moerbeck et al., 2016; Vizzoni et al., 2016; Acosta et al., 2018). A capacidade de *R. microplus* de transmitir *R. parkeri* é experimentalmente inconclusiva (Cordeiro et al., 2018a) e, considerando o cenário ecológico do ciclo desse bioagente, pode não ter importância epidemiológica.

A aquisição de *Rickettsia* patogênica por carrapatos também pode ocorrer pelo processo de co-alimentação, já estabelecido para este grupo de riquetsias (Socolovschi et al., 2009b). *R. parkeri* foi relatado em *Amblyomma triste*, um carrapato ixodídeo com capacidade de parasitar vários vertebrados, incluindo cervídeos e bovinos (Labruna et al., 2003; Mertins et al., 2010), espécies de hospedeiros que compartilham os mesmos ambientes, permitindo a infecção de *R. microplus* por *R. parkeri*.

Além disso, aqui também relatamos pela primeira vez *R. felis* no carrapato do boi, uma bactéria com ampla distribuição geográfica, incluindo todas as regiões brasileiras (Horta et al.,

2014). No entanto, além de ser detectado em várias espécies de artrópodes que se alimentam de sangue, a maioria dos relatos está associada ao gênero de pulga *Ctenocephalides* (Reif e Macaluso, 2009; Parola, 2011; Medolanikov et al., 2012), comuns em todo o mundo como ectoparasitas de vários carnívoros, principalmente cães.

Assim, a detecção desta riquetsia em outras espécies de ectoparasitas de cães parece não ser incomum (Gehrke et al., 2009; Parola et al., 2013). No entanto, relatos, de vários estados do Brasil, de sua presença em *R. microplus* (Figura 10; Tabela 17) são importantes, principalmente considerando que os carrapatos de boi não costumam parasitar carnívoros. Os espécimes encontrados neste estudo infectados com *R. felis* foram coletados de bovinos, cavalos e ambiente (pasto), sem evidências dos mecanismos de infecção.

Outras sequências do Ceará foram identificadas como *R. rickettsii* e *R. bellii*. As amostras infectadas por *R. rickettsii* foram coletadas em Maciço do Baturité, uma área endêmica de FM (Moerbeck et al., 2016), com floresta de alta altitude, com condições de alta umidade e temperatura amena no clima semiárido do bioma Caatinga. Embora os casos de FM relatados na região estejam associados a *R. parkeri* (= *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica) transmitida por *A. ovale* (Moerbeck et al., 2016), e apesar de não haver relatos de casos de FM clinicamente associados a *R. rickettsii*, essa espécie também foi isolada de *R. sanguineus* coletada em um cão de Maciço do Baturité (Silva et al., 2017b).

Juntamente com os resultados aqui obtidos, essa detecção adverte a circulação de *R. rickettsii* na região e em diferentes de espécies de carrapatos. Assim, em função da importância de *R. rickettsii* para a saúde pública, faz-se necessário o entendimento do ciclo enzoótico na região estudada para, conseqüentemente, haver a elaboração de um potencial cenário epidemiológico e tomadas de medidas preventivas à formação de um novo foco de FM causada por *R. rickettsii* no Brasil. Neste contexto, *R. microplus* passa a ter relevância de estudo, já que seu potencial na transmissão de *R. rickettsii* foi demonstrada experimentalmente (Monteiro e Fonseca, 1932).

Além das riquetsias patogênicas, a *R. bellii* geralmente não-patogênica é uma espécie amplamente distribuída, tendo sido detectada em uma grande variedade de hospedeiros, indicando ampla capacidade de circulação (Labruna et al., 2004a; Tomassone et al., 2010; Parola et al., 2013). Possivelmente desempenhando um papel importante na ecologia e epidemiologia de outras espécies de *Rickettsia* (Macaluso et al., 2002). O primeiro registro dessa espécie no Maciço do Baturité foi em um carrapato de *Amblyomma nodosum* coletado de um animal selvagem (Moerbeck et al., 2016). Apresentamos aqui o primeiro relato para o Brasil de *R. bellii* detectado em *R. microplus*, indicando a circulação dessa bactéria por toda a região estudada.

Sabe-se que uma infecção primária por uma espécie de riquetsia impediria a transmissão transovariana de uma segunda espécie (Burgdorfer, 1988; Macaluso et al., 2002). Tal fato foi corroborado recentemente por um estudo experimental realizado com *Amblyomma dubitatum*, onde a infecção primária por *R. bellii* pareceu diminuir a eficácia da transmissão transovariana subsequente de *R. rickettsii* (Sakai et al., 2014).

Quanto a ocorrência de infecção de *Rickettsia* em *D. nitens*, poucos estudos demonstraram infecção de *R. rickettsii* nesta espécie de carrapato: dois com amostras do Panamá (Bermúdez et al., 2009; Bermúdez et al., 2011); um com amostras do Brasil (Gehrke, 2010). Nesse cenário, este estudo relata pela primeira vez a detecção de *R. rhipicephali*, *Ca. R. andeanae* e *R. felis* infectando naturalmente *D. nitens* (Figura 11, Tabela 18).

Existem encontros de *Dermacentor* infectados com a bactéria *R. rhipicephali* nos Estados Unidos (Wikswow et al., 2008). No Brasil, este é o primeiro relato desta riquetsia para *D. nitens*. E assim como exposto para *R. microplus* em relação a possível forma de infecção, bem como a questão de co-alimentação, é provável que o *D. nitens* por apresentar o ciclo de vida monoxênico como o *R. microplus*, tenha capacidade de realizar o mesmo comportamento.

Diferentes espécies de carrapatos foram relatadas abrigando *Ca. R. andeanae* em diferentes países. Essas espécies compreendem *Amblyomma maculatum*, *Amblyomma pseudoconcolor*, *Ixodes boliviensis*, *R. sanguineus*, *A. parvum* e *A. triste* (Blair et al., 2004; Pacheco et al., 2007; Paddock et al., 2010; Tomassone et al., 2010; Abarca et al., 2012; Luce-Fedrow et al., 2012; Flores-Mendoza et al., 2013).

O primeiro registro de *Ca. R. andeanae* no Brasil foi em carrapatos da espécie *A. parvum* coletados em áreas distantes de dois biomas brasileiros (Pantanal e Cerrado). É possível que a distribuição desse organismo no país seja muito mais ampla do que é conhecido (Niere-Bastos et al., 2014). Em seguida, existem relatos da infecção por esta riquetsia em *A. sculptum* coletados no Cerrado (Witter et al., 2016; Bittencourth et al., 2017). Esta tese contribui para o entendimento da dispersão desta riquetsia no território brasileiro, visto que foi encontrada no bioma Amazônia, e ainda em um potencial vetor como *D. nitens* de ampla distribuição e circulação no país.

E tal como mencionado em *R. microplus*, um espécime de *D. nitens* foi encontrado infectado com *R. felis* e coletado em um asno, sem evidências dos mecanismos de infecção. Entretanto, ainda com o conhecimento de sua biologia escasso, e que a doença causada por esta riquetsia consista em apenas um caso reportado no Brasil (Raoult et al., 2001), o encontro nessas espécies evidencia sua participação na manutenção do seu ciclo.

No presente estudo, foi realizada detecção e identificação de patógenos em menos de 3% (4 amostras positivas /177 amostras analisadas) das amostras de *D. nitens*, sugerindo que a participação desta espécie no ciclo enzoótico e epidêmico dos bioagentes nas áreas investigadas precisa ser melhor estudada.

Com relação à pesquisa de erliquias nas espécies de carrapatos estudadas, é importante citar os estudos realizados com a espécie de *Ehrlichia*, recentemente descrita, que parece ter evoluído de uma cepa variável de *E. canis* (Cabezas-Cruz et al., 2014) e que foi denominada de *E. minasensis* cepa UFMG-EV (Cabezas-Cruz et al., 2016). De forma adicional, uma outra

cepa de *E. minasensis* (UFMT-BV) foi descrita recentemente e parece ser patogênica para bovinos no Brasil (Aguiar et al., 2014). Além disso, estudos evidenciaram a transmissão transestadial de *E. minasensis* em *R. microplus* (Carvalho et al., 2016), destacando um papel potencial deste carrapato na transmissão do patógeno.

Além de três amostras aqui analisadas (provenientes do estado do Paraná, Minas Gerais e São Paulo) apresentaram altas taxas de identidade com cepas de *E. canis*, algumas das sequências obtidas no presente estudo (amostras dos estados de Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo), estão filogeneticamente relacionadas a *E. minasensis* (Figura 8; Tabela 12), sugerindo a expansão da ocorrência da bactéria pelo sudeste brasileiro e aumentando a dispersão desse bioagente em biomas Mata Atlântica e Cerrado.

Perdas econômicas constantes ocorrem na indústria equina devido a doenças infecciosas, incluindo a PE. Causada pelos hematozoários *T. equi* e *B. caballi*, sendo que os animais podem ser parasitados por um ou ambos agentes, os quais são transmitidos principalmente através de carrapatos ixodídeos (Zaugg, 2006). Esta doença acomete equinos, burros, mulas e zebras e, recentemente, foi relatada em camelos (Sloboda et al., 2011). A PE é considerada o principal impedimento no movimento internacional de cavalos, uma vez que os animais PE-positivos são proibidos de entrar em países considerados livres da doença (Friedhoff et al., 1990; Knowles, 1996).

No caso de *T. equi*, o carrapato *R. microplus* é o vetor biológico na América do Sul, indicado por estudos experimentais (Guimarães et al., 1998; Stiller e Coan, 1995; Ueti et al., 2005 e 2008). Este trabalho detectou *R. microplus* coletados em bovinos e equinos provenientes de Rio de Janeiro, Minas Gerais e Paraná, infectados com *T. equi* (Figura 9; Tabela 13). Assim como Nogueira et al. (2017) em que os carrapatos infectados foram coletados em equinos, embora *R. microplus* seja um carrapato monoxeno e possua o bovino como o principal hospedeiro. No entanto, cavalos podem se tornar hospedeiros alternativos em ambientes de proximidade entre bovinos e equinos. Pode-se sugerir que, pelo menos, no

Brasil, *R. microplus*, o principal carrapato em bovinos e em muitas áreas em equinos, desempenha um papel importante na transmissão de *T. equi* (Torres et al., 2012).

Além da transmissão transtadial previamente documentada (Ueti et al., 2005), a transmissão intrastadial por carrapatos adultos de *R. microplus* é um mecanismo de transmissão para parasitas de *T. equi* (Ueti et al., 2008). Além disso, a capacidade de aquisição desses parasitas a partir de cavalos com parasitemia de baixo nível e de transmitir subsequentemente os parasitas com um número mínimo de carrapatos infectados indica a importância de detectar com precisão os cavalos persistentemente infectados, mesmo com a ausência de doença clínica (Ueti et al., 2008). Evidenciando a importância desta espécie de carrapato na manutenção do sistema enzoótico ciclo de *T. equi* (Nogueira et al., 2017).

Apesar de bactérias do gênero *Anaplasma* serem frequentes patógenos transmitidos por *R. microplus* (Aguirre et al., 1994; Estrada-Pena et al., 2006b; Barre e Uilenberg, 2010), o presente estudo não detectou presença deste patógeno em *R. microplus* e *D. nitens*.

A descrição de *Borrelia* sp. em *R. microplus* na América do Sul foi feita apenas por achados acidentais em esfregaço de hemolinfa (Martins et al., 1996; Soares et al., 2000). No Brasil, Yparraguirre et al. (2007) relataram um isolado de *Borrelia* sp. BR na região sudeste (Minas Gerais e Rio de Janeiro), com similaridade de 99% com *Borrelia theileri* e *Borrelia lone stari*. Recentemente *B. theileri* teve sua caracterização morfológica, molecular e filogenética partir de um *R. microplus* naturalmente infectado em bovino no Estado do Rio de Janeiro (Cordeiro et al., 2018b).

Já a espiroqueta *B. burgdorferi* s.s. foi detectada pela primeira vez em *D. nitens* que parasitavam uma população equina no Paraná. Este achado foi promissor para o entendimento da distribuição de *B. burgdorferi* s.l. no estado do Paraná e em outros estados brasileiros, apontando a importância da comunidade hospedeira na ecologia da borreliose (Gonçalves et al., 2013). Assim, devido a procedência de material de diversas regiões do país, algumas amostras foram coletadas em áreas que apresentam características de interesse epidemiológico

para a circulação de *B. burgdorferi* s.l., dessa forma as amostras foram testadas para detecção e *Borrelia* sp., contudo nenhuma amostra foi positiva.

5.4 Relação entre patógenos e haplótipos

Diferenças genéticas entre as populações de carrapatos também podem ter implicações importantes no que diz respeito à capacidade de transmitir patógenos aos hospedeiros (Patterson et al., 2009).

Para o *R. microplus*, os haplótipos hI (12S rDNA), h1 e h2 (COX-I) foram encontrados disseminados em diferentes populações e biomas (Tabela 21 e 22). A frequência do haplótipo h2 relatado aqui (Tabela 5), é visivelmente mais alta do que descrito para *R. microplus* no Brasil.

As amostras de *D. nitens* infectadas com riquetsias pertencem ao haplótipo h1, e visto que este haplótipo foi observado distribuído em diferentes populações e biomas, assim como para *R. microplus*, é plausível inferir que represente um perfil genético antigo da espécie no país. Nesse contexto, não foi observada relação entre os haplótipos identificados e a detecção de riquetsias nesses carrapatos. Embora a sinalização da presença destas riquetsias, e a diversidade encontrada, seja de importância relevante para epidemiologia de determinadas regiões do país, como em áreas de foco de FM.

Além disso, como houve a detecção de *B. caballi* em apenas uma amostra de *D. nitens*, não foi possível analisar relação entre o haplótipo identificado e a detecção de babesia, assim como *T. equi* para *R. microplus*. Entretanto o h2 (COX-I) de *R. microplus* foi identificado em seis amostras positivas para *E. minasensis*, levando ao questionamento de uma possível relação entre haplótipo e patógeno.

Estudos relacionados têm apontado ecoepidemiologia da FM no Brasil, bem como a necessidade de pesquisa com o objetivo de entender a participação de carrapatos em

diferentes ciclos de riquétisia (Ogrzewalska et al., 2012, 2016; Bitencourth et al., 2017, 2019). Assim, novos estudos e perspectivas são necessárias para determinar a extensão da variação genética e capacidade vetorial de carrapatos de diferentes populações.

6 CONCLUSÕES

O presente estudo sobre a diversidade genética e pesquisa de patógenos transmitidos por carrapatos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) e *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897, provenientes de diferentes biomas do Brasil, permitiu concluir que:

- *R. microplus* e *D. nitens* apresentaram baixa diversidade genética e não apresentaram estruturação populacional de acordo com os biomas analisados no Brasil;
- *E. minasensis*, *E. canis* e *T. equi* foram identificadas em *R. microplus*, ampliando a distribuição geográfica de *E. minasensis* no Brasil;
- *R. microplus* foi encontrado com *R. rickettsii*, e pela primeira vez *R. bellii*, *R. felis*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* e *R. tamurae*, foram relatadas infectando este carrapato no Brasil, sugerindo esta espécie como sinalizador de potencial presença ou circulação de *Rickettsia* sp. no país;
- *D. nitens* foi encontrado infectado com *B. caballi*, e pela primeira vez *R. rhipicephali*, *Ca. R. andeanae* e *R. felis* foram relatadas infectando este carrapato;
- Não foi observada relação entre os haplótipos identificados em *R. microplus* e *D. nitens* e os patógenos detectados nestas espécies;

REFERÊNCIAS

ABARCA, K., LÓPEZ, J., ACOSTA-JAMETT, G., LEPE, P., SOARES, J. F., LABRUNA, M. B. A third *Amblyomma* species and the first tick-borne *Rickettsia* in Chile. **J. Med. Entomol.**, v. 49, p. 219 - 222, 2012.

ACOSTA, I. C., LUZ, H. R., FACCINI-MARTÍNEZ, A. A., MUÑOZ-LEAL, S., CERUTTI, J. R. C., LABRUNA, M. B. First molecular detection of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in *Amblyomma ovale* ticks from Espírito Santo state, Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v. 27, p. 420 - 422, 2018.

ADAKAL, H., BIGUEZOTON, A., ZOUNGRANA, S., COURTIN, F., DE CLERCQ, E. M., MADDER, M. Alarming spread of the Asian cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa-another three countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 61, p. 383 – 386, 2013.

AGUIAR, D. M., ZILIANI, T. F., ZHANG, X., MELO, A. L., BRAGA, I. A., WITTER, R., FREITAS, L. C., RONDELLI, A. L., LUIS, M. A. et al. A novel *Ehrlichia* genotype strain distinguished by the TRP36 gene naturally infects cattle in Brazil and causes clinical manifestations associated with ehrlichiosis. **Ticks Tick - Borne Dis.**, v. 5, p. 537 – 544, 2014.

AGUIRRE, D. H., GAIDO, A. B., VINABAL, A. E., DE ECHAIDE, S. T., GUGLIELMONE, A. A. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. **Parasite** v. 1, p. 405 – 407, 1994.

ALI, A., PARIZI, L. F., FERREIRA, B. R., VAZ JUNIOR, I. S. A revision of two distinct species of *Rhipicephalus*: *R. microplus* and *R. australis*. **Cienc. Rural**, v. 46, n. 7, p. 1240-1248, 2016.

ALJANABI, S. M., MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high-quality genomic DNA for PCR- based techniques. **Nucl. Acids. Res.**, v. 25, n. 22, p. 4692 - 4693, 1997.

ALLSOPP, B. A., Natural history of *Ehrlichia ruminantium*. **Vet. Parasitol.**, v. 167, p. 123 – 135, 2010.

AMORIM, M., GAZÊTA, G. S., GUERIM, L., SERRA-FREIRE, N. M. Morphological description of tick larval stage (Acari Ixodidae). 5. *Anocentor nitens* (Neumann, 1897). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 6 n. 2, p.143 - 156, 1997.

AMZATI, G. S., PELLE, R., MUHIGWA, J-B. B., KANDUMA, E. G., DJIKENG, A., MADDER, M., KIRSCHVINK, N., MARCOTTY, T. Mitochondrial phylogeography and population structure of the cattle tick *Rhipicephalus appendiculatus* in the African Great Lakes region. **Parasite Vector**, v. 11, n. 1, p. 329, 2018.

ANDERSON, J. F., MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 22, p. 195 – 215, 2008.

ANDREOTTI, R., GARCIA, M. V., KOLLER, W. W. (Ed.). Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos. Brasília, DF: Embrapa, 2019. 240 p.

ANGUS, B. M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and Achievements in its control. **Int. J. Parasitol.**, v. 26, p. 1341 – 1355, 1996.

ANISIMOVA, M., GASCUEL, O. Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. **Syst. Biol.**, v.55, n. 4, p. 539-552, 2006.

ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA (ANUALPEC). São Paulo: IEG / FNP, 2016.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H., FONSECA, F. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de ixodologia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p.115 - 129, 1961.

ARAYA-ANCHETTA, A., BUSCH, J. D., SCOLES, G. A., WAGNER, D. M. Thirty years of tick population genetics: a comprehensive review. **Infect. Genet. Evol.**, v.29, p.164–179, 2015.

ARAYA-ANCHETTA, A., SCOLES, G. A., GILES, J., BUSCH, J. D., WAGNER, D. M. Hybridization in natural sympatric populations of *Dermacentor* ticks in northwestern North America. **Ecol. Evol.**, v. 3, p. 714 – 724, 2013.

AZAD, A. F., BEARD, C. B. Rickettsial diseases and their arthropod vectors. **Emerg. Inf. Dis.**, v. 4, p. 179-186, 1998.

BANDELT, H. J., FORSTER, P., RÖHL A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Mol Biol Evol.**, v. 16, p. 37-48, 1999.

BANETH, G. Tick-borne infections of animals and humans: a common ground. **Int. J Parasitol.**, v. 44, p. 591-596, 2014.

BARBIERI, A. M., VENZAL, J. M., MARCILI, A., ALMEIDA, A.P., GONZÁLEZ, E.M., LABRUNA, M. B. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting ticks of the *Ixodes ricinus* complex in Uruguay: first report for the Southern Hemisphere. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 13, p. 147-53, 2013.

BARBOUR, A. G., MAUPIN, G.O., TELTOW, G.J., CARTER, C.J., PIESMAN, J. Identification of an uncultivable *Borrelia* species in the hard tick *Amblyomma americanum*: Possible agent of a Lyme disease-like illness. **J. Infect. Dis.** v. 173, p.403–409, 1996.

BARKER, S.C., MURRELL, A. Systematics and evolution of ticks with a list of valid genus and species names. **Parasitol.**, v. 129, p. 15-36, 2004.

BARRE, N., UILENBERG, G. Spread of parasites transported with their hosts: case study of two species of cattle tick. **Rev. Sci. Tech.**, v.29, n.1, p. 149-160, 2010.

BARROS-BATTESTI, D. M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo: Butantan, 2006, 223p.

BASTOS, K. M. S., DAEMON, E., FACCINI, J. L. H., CUNHA, D. W. Efeitos de diferentes temperaturas sobre a fase não parasitária de *Dermacentor (Anocentor) nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 5, p. 29-32, 1996.

BEATI, L., KEIRANS, J. E. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. **J. Parasitol.**, v. 87, p. 32-48, 2001.

BEATI, L., PATEL, J., LUCAS-WILLIAMS, H., ADAKAL, H., KANDUMA, E. G., TEMBO-MWASE, E., et al. Phylogeography and demographic history of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the tropical bont tick. **Ticks Tick Borne Dis.** v. 12, n. 6, p. 514-525, 2012.

BERMÚDEZ, S. E., EREMEEVA, M. E., KARPATY, S. E., SAMUDIO, F., ZAMBRANO, M. L., ZALDIVAR, Y., MOTTA, J. A., DASCH, G. A. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in eastern Panama. **J. Med. Entomol.**, v.46, p.856–861, 2009.

BERMÚDEZ, C. S., ZALDÍVAR, A. Y., SPOLIDORIO, M. G., MORAES-FILHO, J., MIRANDA, R. J., CABALLERO, C. M., MENDOZA, Y., LABRUNA, M. B. Detection and Identification of Rickettsial Agents in Ticks from Domestic Mammals in Eastern Panama. **Vet. Parasitol.**, v. 19, n.177, p. 134-138, 2011.

BIESIADA, G., CZEPIEL, J., LEŚNIAK, M. R., GARLICKI, A., MACH, T. Lyme disease: review. **Arch. Med. Sci.**, v. 8, p. 978-982, 2012.

BIGGS, H., BEHRAVESH, C., BRADLEY, K. et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: rocky mountain spotted fever and other spotted fever group rickettsioses, ehrlichioses, and anaplasmosis. United States. **MMWR Recomm. Rep.**, v. 65, p. 1–44, 2016.

BILLINGS, A. N., YU, X. J., TEEL, P. D., WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in South Texas. **J. Med. Entomol.**, v.35, p.474-478, 1998.

BITENCOURTH, K., AMORIM, M., OLIVEIRA, S. V., CAETANO, R. L., VOLOCH, C. M., GAZÊTA, G. S. *Amblyomma sculptum*: genetic diversity and rickettsias in the Brazilian Cerrado biome. **Med. Vet. Entomol.**, v. 31, n 4, p. 427-437, 2017.

BITENCOURTH, K., AMORIM, M., OLIVEIRA, S. V., VOLOCH, C. M., GAZÊTA, G. S. Genetic diversity, population structure and rickettsias in, *Amblyomma ovale* in areas of epidemiological interest for spotted fever in Brazil. **Med. Vet. Entomol.**,v. 33, n. 2, 256-268, 2019.

BITENCOURTH, K., VOLOCH, C. M., SERRA-FREIRE, N. M., MACHADO-FERREIRA, E., AMORIM, M., GAZÊTA, G. S. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. **Med. Vet. Entomol.**, v.30, p.342–350, 2016.

BLAIR, P. J., JIANG, J., SCHOELER, G. B., MORON, C., ANAYA, E., CESPEDES, M., CRUZ, C., FELICES, V., GUEVARA, C., MENDOZA, L., VILLASECA, P., SUMNER, J. W., RICHARDS, A. L., OLSON, J. G. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 4961-4967, 2004.

BLANCO, C. M., TEIXEIRA, B. R., SILVA, A. G., OLIVEIRA, R. C., STRCHT, L., OGRZEWALSKA, M. Microorganisms in ticks (Acari: Ixodidae) collected on marsupials and rodents from Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. **Ticks Tick - Borne Dis.**, v. 8, p. 90-98, 2016.

BORGES, L. M. F., LEITE, R. C. Fauna Ixodológica do pavilhão auricular de equinos em municípios de Minas Gerais e da Bahia. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 50, n. 1, p. 87-89, 1998.

BORGES, L. M. F., OLIVEIRA, P. R., RIBEIRO, M. F. B. Seasonal dynamics of the free-living phase of *Anocentor nitens* at Pedro Leopoldo, Minas Gerais, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.87, n.1, p.73-81, 1999.

BORGES, L. M. F., OLIVEIRA, P. R., RIBEIRO, M. F. B. Seasonal dynamics of *Anocentor nitens* on horses in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v.89, p.165-171, 2000.

BOCK, R., JACKSON, L., DE VOS, A., JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitol.**, v. 129, p. 247–269, 2004.

BRITO, D. R. B., SANTOS, A. C. G., GUERRA, R. M. S. N. C. Ectoparasitos em rebanhos de caprinos e ovinos na microrregião do Alto Mearim e Grajaú, Estado do Maranhão. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 14, p. 59– 63, 2005.

BROUQUI, P., BACELLAR, F., BARANTON, G., BIRTLES, R. J., BJOERSDORFF, A., BLANCO, et al. Guideline for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 10, n. 12, p. 1108–1132, 2004

BULL, C. M., ANDREWS, R. H., ADAMS, M. Patterns of genetic variation in a group of parasites, the Australian reptile ticks. **Heredity**, v. 53, p. 509–525, 1984.

BURGDORFER, W. **Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus.** In: Walker DH, editor. Biology of rickettsial diseases. Boca Raton (FL): CRC; 1988. p. 33–50.

BURGDORFER, W. The hemolymph tests. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.19, p.1010-4, 1970.

BURGDORFER, W., BARBOUR, A. G., HAYES, S. F., BENHACH, J. L., DAVIS, J. P. Lyme disease, a tick-borne spirochetosis. **Sci.**, v. 216. p. 1317-1319., 1982.

BURGER, T. D., SHAO, R., BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicate that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 76, p. 241 – 253, 2014.

BURGER, T. D., SHAO, R., BEATI, L., MILLER, H., BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of ticks (Acari: Ixodida) using mitochondrial genomes and nuclear rRNA genes indicates that the genus *Amblyomma* is polyphyletic. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 64, p. 45–55, 2012.

BURKMAN, E. J. Genetic structure of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) populations based on mitochondrial gene sequences. MS Thesis. Georgia Southern University, Statesboro, GA. 2009, 58p.

BUSCH, J. D., STONE, N. E., NOTTINGHAM, R., ARAYA-ANCHETTA, A., LEWIS, J., HOCHHALTER, C., et al. Widespread movement of invasive cattle fever ticks (*Rhipicephalus microplus*) in southern Texas leads to shared local infestations on cattle and deer. **Parasit Vector.**, 7: 188, 2014.

CABEZAS-CRUZ, A., VALDES, J. J., DE LA FUENTE, J. The glycoprotein TRP36 of *Ehrlichia* sp. UFMG-EV and related cattle pathogen *Ehrlichia* sp. UFMT-BV evolved from a highly variable clade of *E. canis* under adaptive diversifying selection. **Parasit. Vectors**, 7: 584, 2014.

CABEZAS-CRUZ, A., ZWEYGARTH, E., RIBEIRO, M. F., DA SILVEIRA, J. A., DE LA FUENTE, J., GRUBHOFFER, L., VALDES, J. J., PASSOS, L. M. New species of *Ehrlichia* isolated from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* shows an ortholog of the *E. canis* major immunogenic glycoprotein gp36 with a new sequence of tandem repeats. **Parasit. Vectors**, v. 5, p. 291, 2012.

CABEZAS-CRUZ, A., ZWEYGARTH, E., VANCOVÁ, M., BRONISZEWSKA, M., GRUBHOFFER, L., PASSOS, L. M. F., RIBEIRO, M. F. B., ALBERDI, O., DE LA FUENTE, J. *Ehrlichia minasensis* sp. Nov. isolated from the tick *Rhipicephalus microplus*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 66, n. 3, p. 1426-1430, 2016.

CAETANO, R. L., VIZZONI, V. F., BITENCOURTH, K., CARRIÇO, C., SATO, T. P., PINTO, Z. T., OLIVEIRA, S. V., AMORIM, M., VOLOCH, C. M., GAZÊTA, G. S. Ultrastructural Morphology and Molecular Analyses of Tropical and Temperate “species” of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in Brasil. **J. Med. Entomol.**, v. 54, n. 5, p. 1201 – 1212, 2017.

CAMICAS, J. L., HERVY, J. P., ADAM, F., MOREL, P. C. **Les Tiques du Monde. Nomenclature, Stades Décrits, Hôtes, Répartition (Acarida, Ixodida)**. Paris: Orstom, 1998. 233p.

CAMPBELL, N. J. H., BARKER, S. C. The novel mitochondrial gene arrangement of the cattle tick, *Boophilus microplus*: fivefold tandem repetition of a coding region. **Mol. Biol.**, v.16, p.732-740, 1999.

CAMPOS PEREIRA, M., LABRUNA, M.B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Chapter 3. In: CAMPOS PEREIRA, M., LABRUNA, M.B., SZABÓ, M. P.J., KLAFE, G.M. (Editors). ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência***. Medicina veterinária, São Paulo, 2008. 169p.

CAPORALE, D. A., RICH, S. M., SPIELMAN, A., TELFORD, S. R., KOCHERT, D. Discriminating between Ixodes ticks by means of mitochondrial DNA sequences. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 4, n. 4, p. 361-365, 1995.

CASATI, S., BERNASCONI, M. V., GERN, L., PIFFARETTI, J. C. 2008. Assessment of intraspecific mtDNA variability of European *Ixodes ricinus* sensu stricto (Acari: Ixodidae). **Infect. Genet. Evol.**, v. 8, p.152-158, 2008.

CENTERS FOR DISEASES CONTROL AND PREVENTION (CDC). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/ticks>>. Acesso em: 15/11/2019.

CHEN, Z., LI, Y., REN, Q., LUO J., LIU, Z., ZHOU, X., LIU, G., LUO, J., YIN, H. *Dermacentor everestianus* Hirst, 1926 (Acari: Ixodidae): phylogenetic status inferred from molecular characteristics. **Parasitol. Res.**, v. 113, p. 3773 – 3779, 2014.

COHN, L. A., Ehrlichiosis and related infections. **Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract.**, v. 33, p. 863–884, 2003.

CORDEIRO, M. D., BAËTA, B. A., CEPEDA, P. B., TEIXEIRA, R. C., RIBEIRO, C. C. D. U., VALIM, J. R. A, et al. Experimental infection of *Rickettsia parkeri* in the *Rhipicephalus microplus* tick. **Tick Tick Borne Dis.**, v.9, p.93-96, 2018a.

CORDEIRO, M. D., BAHIA, M., MAGALHÃES-MATOS, P.C., CEPEDA, M. B., GUTERRES, A., FONSECA, A.H. Caracterização morfológica, molecular e filogenética de *Borrelia theileri* em *Rhipicephalus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, vol.27, n.4, pp.555-561. 2018b

CRIADO-FORNELIO A., MARTINEZ-MARCOS A., BULING-SARAÑA A., BARBACARRETERO J. C. Presence of *Haemobartonella felis* and piroplasmids in cats from southern Europe: a molecular study. **Vet. Microbiol.**, v. 93, p. 307-317, 2003.

CROSBIE, P.R., BOYCE, W.M., RODWELL, T.C. DNA sequence variation in *Dermacentor hunteri* and estimated phylogenies of *Dermacentor* spp. (Acari: Ixodidae) in the New World. **J. Med. Entomol.**, v. 35, p. 277–288, 1998.

CRUICKSHANK, R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **Syst. Appl. Acarol.**, v.7, p.3-14, 2002.

CSORDAS, B. G., GARCIA, M. V., CUNHA, R. C., GIACHETTO, P. F., BLECHA, I. M. Z., ANDREOTTI, R. New insight from molecular characterization of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.**, v.25, n.3, 317-326, 2016.

CSORDAS, B. G., RODRIGUES, V. S., GARCIA, M. V., BLECHA, I. M. Z., HIGA, L. O. S., DUARTE, P. O., SOUZA, A. S., AGUIRRE, A. A. R., BARROS, J. C., KOLLER, W. W., ANDREOTTI, R. **Relações filogenéticas de populações distintas de *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) no Brasil.** In: ANAIS DO CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 2017, . Anais eletrônicos... Campinas, GALOÁ, 2020. Disponível em: <<https://proceedings.science/medtrop/papers/relacoes-filogeneticas-de-populacoes-distintas-de-dermacentor-nitens--acari--ixodidae--no-brasil?lang=pt-br>> Acesso em: 23 mar. 2020.

CUTLER, S. J., RUZIC-SABLJIC, E., POTKONJAK, A. Emerging borreliae e Expanding beyond Lyme borreliosis. **Mol. Cell. Probe.**, v. 31, p. 22-27, 2017.

DAHLGREN, F. S., MANDEL, E. J., KREBS, J. W., MASSUNG, R. F., MCQUISTON, J. H. Increasing incidence of *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* in the United States, 2000–2007. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 85, p. 124, 2011.

DANTAS-TORRES, F., MARTINS, T. F., MUNOZ-LEAL, S., ONOFRIO, V. C., BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Update species checklist and taxonomic keys. **Ticks Tick – Borne Dis.**, v.10, n. 6, p. 101252, 2019.

DE CLERCQ, E.M., VANWAMBEKE, S.O., SUNGIRAI, M., ADEHAN, S., LOKOSSOU, R., MADDER, M. Geographic distribution of the invasive cattle tick *Rhipicephalus microplus*, a country-wide survey in Benin. **Exp. Appl. Acarol.**, v.58, p. 441 – 452, 2012.

DE LA FUENTE, J., ALMAZÁNA, C., VAN DEN BUSSCHEC, R. A., BOWMAND, J., YOSHIOKAA, J. H., KOCAN, K. M. Characterization of genetic diversity in *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) with body size and weight polymorphism. *Exp. Parasitol.*, v. 109, p.16–26, 2005.

DE LA FUENTE, J., ESTRADA-PENÑA, A., VENZAL, J. M., KOCAN, K. M., SONENSHINE, D. E. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Front. Biosci.**, v.13, n.13, p.6938-6946, 2008.

DHARMARAJAN, G., BEASLEY, J. C., RHODES JR, O. E. Spatial and temporal factors affecting parasite genotypes encountered by hosts: Empirical data from American dog ticks (*Dermacentor variabilis*) parasitising raccoons (*Procyon lotor*). **Int. J. Parasitol.**, v. 40, p. 787–795, 2010.

DONOHUE, H., OMODIOR, O., ROE, J. Tick-borne disease occupational risks and behaviors of Florida Fish, Wildlife, and Parks service employees—a health belief model perspective. **J. Outdoor Recreat. Tour.**, v. 22, p. 9–17, 2018.

DOYLE, C. K., LABRUNA, M. B., BREITSCHWERDT, E. B., TANG, Y. W., CORSTVET, R. E., HEGARTY, B. C., BLOCH, K. C., LI, P., WALKER, D. H., MCBRIDE, J. W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor taqman real-time PCR of the *dsb* gene. **J. Mol. Diagn.**, v. 7, n. 4, p. 504-510, 2005.

DUMLER, J. S. 2005. *Anaplasma* and *Ehrlichia* Infection. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1063, n. 1, p. 361 - 373, 2005.

DUMLER, J. S., BARBET, A. F., BEKKER, C. P., DASCH, G. A., PALMER, G. H., RAY, S. C., RIKIHISA, Y., RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE

agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 2145–2165, 2001.

EREMEEVA, M. E., DASCH, G. A. Closing the gaps between genotype and phenotype in *Rickettsia rickettsii*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 1166, p. 12–26, 2009.

EREMEEVA, M. E., DASCH, G. A., SILVERMAN, D. J. **Interaction of rickettsiae with eukaryotic cells. Adhesion, entry, intracellular growth, and host cell responses.** In: Oelschlaeger T, Hacker J, editors. Subcellular biochemistry. 33. Bacterial invasion into eukaryotic cells. New York, N.Y: Kluwer Academic/Plenum Publishers. 2000. 479–516p.

ESTRADA-PEÑA, A., BOUATTOUR, A., CAMICAS, J. L., GUGLIELMONE, A., HORAK, I., JONGEJAN, F., et al. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Exp. Appl. Acarol.**, v.38, n.2-3, p.219-235, 2006.

EXCOFFIER, L. **Analysis of population subdivion.** In: Balding, D.J., Bishop, M. Cannings, C. Handbook of statistical genetics. New York: John Wiley and Sons. 2001, 271-307p.

EXCOFFIER, L., LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Mol. Ecol. Resour.**, v. 10, p. 564-567, 2010.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A., OLIVEIRA, S. V., CERUTTI JUNIOR, C., LABRUNA, M. B. Febre maculosa por *Rickettsia parkeri* no Brasil: Conduas de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento. **J. Health Biol. Sci.**, v. 6, p. 299-312, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO), Rome, Italy, 2004. Available: <http://www.apps.fao.org>.

FELSENSTEIN, J. Phylogenies and the comparative method. **Am. Nat.**, v. 125, p. 1-15, 1985.

FLECHTMANN, C. H. W. **Ácaros de importância médica veterinária.** São Paulo: Nobel, 1973. 192 p.

FLECHTMANN, C. H. W. **Elementos de acarologia.** São Paulo: Nobel, 1975. 344p.

FLORES-MENDOZA, C., FLORIN, D., FELICES, V., POZO, E. J., GRAF, P. C., BURRUS, R. G., RICHARDS, A. L. Detection of *Rickettsia parkeri* from within Piura, Peru, and the first reported presence of *Candidatus 'Rickettsia andeanae'* in the tick *Rhipicephalus sanguineus*. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 13, p. 505-508, 2013.

FONSECA, R. S. **Carrapatos em Equinos** - Definição, Diagnóstico e Tratamento. CPT Cursos Presenciais. Minas Gerais, abr. 2010. Disponível em: <<http://www.cptcursospresenciais.com.br/artigos/equinos/saude-equina/carrapatos-em-equinos--definicao-diagnostico-e-tratamento/>>. Acesso em: 22 abr. 2018.

FOURNIER, P-E., BELGHAZI, L., ROBERT, C., ELKARKOURI, K., RICHARDS, A. L., et al. Variations of Plasmid Content in *Rickettsia felis*. **PLoS ONE**, v. 3, e2289, 2008.

FOURNIER, G. F. S. R., PINTER, A., SANTIAGO, R., MUNOZ – LEAL, S., MARTINS, T. F., LOPES, M. G., MCCOY, K. D., TOTY, C., HORTA, M. C., LABRUNA, M. B., DIAS, R. A. A high gene flow in populations of *Amblyomma ovale* ticks found in distinct fragments of Brazilian Atlantic rainforest **Exp Appl Acarol.**, v. 77, n. 2, p. 215 - 228, 2019.

FRANKE, J., HILDEBRANDT, A., DORN, W. Exploring gaps in our knowledge on Lyme borreliosis spirochaetes – Updates on complex heterogeneity, ecology, and pathogenicity. **Ticks Tick borne Dis.**, v. 4, p. 11-25, 2013.

FRIEDHOFF, K., TENTER, A., MÜLLER, I. Haemoparasites of equines: impact on international trade of horses. **Rev. Sci. Tech.**, v.9, p.1187–1194, 1990.

FU, Y.X. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth hitchhiking and background selection. **Genetics**, v. 147, p. 915-925, 1997.

GALVÃO, M. A., SILVA, L. J., NASCIMENTO, E. M., et al. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence distribution and diagnosis. **Rev Saúde Pública**, 2005, 39:850-856.

GAUDITANO, G., BONOLDI, V. L. N., COSTA, I. P., BARROS-BATTESTI, D. M., BARROS, P. J. L., FONSECA, A. H. Síndrome de Lyme-símile ou complexo infecto-reacional do carrapato – Síndrome de Baggio-Yoshinari. **Rev. Paul. Reumatol.** v. 4, p. 16-17, 2005.

GAUSS, C. L. B., FURLONG, J. Comportamento de Larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagem de *Brachiaria decumbens*. **Ciêñ. Rural**, v.32, p. 467-472, 2002.

GAZÊTA, G. S., GUERIM, L., AMORIM, M., SERRA-FREIRE, N. M. Seasonal analysis of the number of aeropiles in *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) from the State of Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 733-736, 2001.

GAZÊTA, G. S., SERRA-FREIRE, N. M. *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) na Região Sudeste do Brasil: constatação da assimetria entre placas peritremáticas e reavaliação do caráter festões. **Rev. Bras. Med.**, v. 17, n. 1, p. 21-25, 1995.

GAZÊTA, G. S., SERRA-FREIRE, N. M. Reavaliação dos caracteres da placa peritremática para diagnose de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897), na Região Sudeste. **Arq. Bras. Vet. Zootec.**, v.48, n.2, p.133-140, 1996.

GAYLE, A., RINGDAHL, E. Tick-borne Diseases. **Amer. Fam. Phys.**, v. 64, p. 461, 2001.

GEHRKE, F. S. **Detecção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da região sudeste do Brasil**. 2010. 100 f. Tese (Doutorado em Ciências – Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GEHRKE, F. S., GAZÊTA, G. S., SOUZA, E. R., RIBEIRO, A., MARRELLI, M. T. T., SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro. **Brazil. Clin Microbiol Infect.**, v. 15, p. 267–268, 2009.

GHANE, M., WONG, L., TAY, S., BULGIBA, A., ZANDI, K., KHO, K., HASSAN, Q. et al. Factors associated with tick bite preventive practices among farmworkers in Malaysia. **PLoS One**, 11: e0157987, 2016.

GILLESPIE, J. J., BEIER, M. S., RAHMAN, M. S., AMMERMAN, N. C., SHALLOM, J. M., PURKAYASTHA, A., SOBRAL, B. S., AZAD, A.F. Plasmids and Rickettsial Evolution: Insight from *Rickettsia felis*. **PLoS ONE**, v. 2, e266, 2007.

GILLESPIE JJ, WILLIAMS K, SHUKLA M, SNYDER EE, NORDBERG EK, et al. *Rickettsia* Phylogenomics: Unwinding the Intricacies of Obligate Intracellular. Life. **PLoS ONE**, v. 3, e2018, 2008.

GONÇALVES DD, CARREIRA T, NUNES M, BENITEZ A, LOPES-MORI FMR, VIDOTTO O, et al. First record of *Borrelia burgdorferi* B31 strain in *Dermacentor nitens* ticks in the northern region of Parana (Brazil). **Braz. J. Microbiol.**, v. 44, n. 3, p. 883-887. 2013

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina, 1995. 235p.

GONZALES, J. C., SERRA-FREIRE, N. M. O couro dos bovinos no Rio Grande do Sul: riqueza há muito maltratada. **Hora Vet.**, v. 12, n. 69, p. 6-14, 1992.

GONZALES, J.C., SILVA, N.R., WAGNER, E.M., O ciclo parasitário do *Boophilus microplus* em bovinos estabulados. **Arq. Faculdade Med. Vet. UFRGS**, v. 2, p. 25-34, 1974.

GONZÁLEZ-ACUÑA, D., ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp. Appl. Acarol.**, v.40, p.83-100, 2006.

GOOGLE MAPS. Disponível em: <http://www.google.com.br/maps> acesso em 05 de mar. 2018.

GRAVES, S., STENOS, J. *Rickettsia honei* - A spotted fever group rickettsia on three continents. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 990, p. 62-66, 2003.

GRAY, J. S., ESTRADA-PEÑA, A. ZINTL, A. Vectors of Babesiosis. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 64, p. 149 – 165, 2019.

GREENE, C. E., BREITSCHWERDT, E. B. **Rocky Mountain spotted fever, murine typhus-like disease, rickettsialpox, typhus, and Q Fever**. In: GREENE, C. E. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3 rd. ed., St Louis: Saunders, Elsevier. 2006.

GRISI, L., LEITE, R.C., MARTINS, J.R., BARROS, A.T., ANDREOTTI, R., CANÇADO, P.H., et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v.23, n.2, p.150-156, 2014.

GRISI, L., MASSARD, C. L., MOYA BORJA, G. E., PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Vet.**, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

GUEDES, E., LEITE, R. C., PACHECO, R. C., SILVEIRA, I., LABRUNA, M. B. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 20, p. 308-311, 2011.

GUGLIELMONE, A. A., BEATI, L., BARROS-BATTESTI, D. M., LABRUNA, M. B., NAVA, S., VENZAL, J. M., ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A., ESTRADA-PEÑA, A., KEIRANS, J. E., ROBBINS, R.G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the neotropical zoogeographic region**. Universiteit Utrecht, Utrecht, the Netherlands. 2003, 173 p.

GUGLIELMONE, A. A., ROBBINS, R. G., APANASKEVICH, D. A., PETNEY, T. N., ESTRADA-PEÑA, A., HORAK, I. G. **The Hard Ticks of the World: (Acari: Ixodida: Ixodidae)**. New York, London: Springer. 2014. 738p.

GUILLEMI, E. C., RUYBAL, P., LIA, V., GONZALES, S., LEW, S., ZIMMER, O., ARIAS, L. L., RODRIGUEZ, J. L., RODRIGUEZ, S., FRUTOS, R., WILKOWSKY, S. E., FARBER, M. D. Development of a multilocus sequence typing scheme for the study of *Anaplasma marginale* population structure over space and time. **Infect. Genet. Evol.**, v.30, n.1, p.186-194, 2015.

GUIMARÃES, A.M., LIMA, J.D., RIBEIRO, M.F.B. Sporogony and experimental transmission of *Babesia equi* by *Boophilus microplus*. **Parasitol. Res.**, v.84, n.4, p.323-327, 1998.

GUIMARÃES, J. H., TUCCI, E. C., BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de importância veterinária**. São Paulo: Plêiade. 2001. 213p.

GUIMARÃES DA SILVA, C. L., SANTOS, A. C. G., CUNHA, D. W., DAEMON, E., FACCINI, J. L. H. Efeito de diferentes teores de umidade sobre a biologia da fase de vida livre de *Anocentor nitens* (Neumann) Schulze, 1937 (Acari: Ixodidae). **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 6, p. 29-32, 1997.

GUINDON, S., DUFAYARD, J. F., LEFORT, V., ANISIMOVA, M., HORDIJK, W., GASCUEL, O. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Syst. Biol.**, v. 59, n. 3, p. 307-321, 2010.

GUZMÁN-CORNEJO, C., ROBBINS, R. G., GUGLIELMONE, A. A., MONTIEL-PARRA, G., RIVAS, G., PÉREZ, T. M. The *Dermacentor* (Acari, Ixodida, Ixodidae) of Mexico: hosts, geographical distribution and new records. **ZooKeys**, v.569, p.1-22, 2016.

HARVEY, J. W. **Thrombocytotropic Anaplasmosis** (*A. platys* [*E. platys*] Infection). In: Greene CE. Infectious Diseases of the Dog and Cat. 3rd ed., Elsevier, St. Louis, 2006, p. 229-231.

HEBERT, P. D., CYWINSKA, A., BALL, S. L. Biological identifications through DNA barcodes. Proceedings of the Royal Society of London. **Biol. Sci.**, v. 270, n. 1512, p. 313-321, 2003.

HILBURN, L., SATTLER, P. Electrophoretically detectable protein variation in natural populations of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Heredity**, v. 57, p. 67–74, 1986.

HILL, C. A., WIKEL, S. K. The *Ixodes scapularis* Genome Project: an opportunity for advancing tick research. **Trends Parasitol.**, v. 21, p. 151–153, 2005.

HILLIS, D. M., MORTIZ, C., MABLE, B. K. **Molecular Systematics**. Sinauer Associates, Massachusetts, USA. 1996. 665p.

HITCHCOK, L.F. Studies on the parasitic stages of the cattle fever tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina:Ixodidae). **Aust. J. Zool.**, v.3, p.145-155, 1955.

HORAK, I. G., CAMICAS, J. L., KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Exp. Appl. Acarol.**, v.28, n.1-4, p.27-54, 2002.

HORTA, M. C., OGRZEWALSKA, M., AZEVEDO, M. C., COSTA, F. B., FERREIRA, F., LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* from Five Geographic Regions of Brasil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, p. 96-100, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). Centro agropecuário. 2017. Disponível em: https://censoagro2017.ibge.gov.br/templates/censo_agro/resultadosagro/index.html
Acesso em: 10 de agosto de 2018.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). Mapas interativos. 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/mapas_ibge/>. Acesso em: 8 de junho de 2019.

INOKUMA, H., RAOULT, D., BROUQUI, P. Detection of *Ehrlichia platys* DNA in brown dog ticks (*Rhipicephalus sanguineus*) in Okinawa Island, Japan. **J. Clin. Microbiol.**, v. 38, n. 11, p. 4219 - 4221, 2000.

JACINTO, S. L., ANGERAMI, R. N., NASCIMENTO, E. M. M. **Doenças causadas por Rickettsias**. In: Fogaccia R. Tratado de Infectologia. 3ª Ed. São Paulo, Rio de Janeiro, Ribeirão Preto, Belo Horizonte: Editora Atheneu, 2005.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Vet. Parasitol.**, v. 137, p. 1–10, 2006.

JONGEJAN, F., NENE, V., DE LA FUENTE, J., PAIN, A., WILLADSEN, P. Advances in the genomics of ticks and tick-borne pathogens. **Trends Parasitol.**, v. 23, p. 391 – 396. 2007.
JONGEJAN, F., UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitol.**, v.129, p.3-14, 2004.

KAMANI, J., APANASKEVICH, D. A., GUTIERREZ, R., NACHUM-BIALA, Y., BANETH, G., HARRUS, S. Morphological and molecular identification of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Nigeria, West Africa: a threat to livestock health. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 73, p. 283 – 296, 2017.

KEMPF, F., BOULINIER, T., MEEUS, T., ARNATHAU, C., MCCOY, K. D. Recent evolution of host-associated divergence in the seabird tick *Ixodes uriae*. **Mol. Ecol.**, v. 18, p. 4450 – 4462, 2009.

KESSLER, R. H., SCHENK, M. A. M. **Carrapato, tristeza parasitaria e tripanossomose dos bovinos**. Campo Grande: Embrapa-CNPGC, 1998, 157p.

KILPATRICK, A. M., RANDOLPH, S. E. **Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases**. *Lancet*. 2012. 380: 1946-1955.

KLAFKE, G., WEBSTER, A., DALL AGNOL, B., PRADEL, E., SILVA J, DE LA CANAL, L. H., BECKER, M., OSÓRIO, M. F., MANSSON, M., BARRETO, R., SCHEFFER, R., SOUZA, U. A., CORASSINI, V. B., DOS SANTOS, J., RECK, J., MARTINS, J.R. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 8, n. 1, p. 73-80, 2017.

KNOWLES, D. P. Control of *Babesia equi* parasitemia. **Parasitol. Today**, v. 12, n. 5, p. 195–198, 1996.

KOCAN, K. M., DE LA FUENTE, J., BLOUIN, E. F., COETZEE, J. F., EWING, S. A. The natural history of *Anaplasma marginale*. **Vet. Parasitol.**, v. 167, p. 95 – 107, 2010.

KOVALEV, S. Y., MUKHACHEVA, T. A. Phylogeographical structure of tick *Ixodes persulcatus*: a novel view. **Ticks Tick Borne Dis.** v. 3, p. 212-218, 2012.

KRAKOWETZ, C. N., DERGOUSOFF, S. J., CHILTON, N. B. Genetic variation in the mitochondrial 16S rRNA gene of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **J. Vector Ecol.**, v. 35, p. 163–173, 2010.

KRAKOWETZ, C. N., LINDSAY, L. R., CHILTON, N.B. Genetic diversity in *Ixodes scapularis* (Acari:Ixodidae) from six established populations in Canada. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 2, n. 143- 150, 2011.

KRAWCZAK, F. S., MUÑOZ-LEAL, S., GUZTZAKEY, A. C., OLIVEIRA, S. V., SANTOS, F. C., ANGERAMI, R. N., et al. *Rickettsia* sp. Strain Atlantic Rainforest Infection in a Patient from a Spotted Fever-Endemic Area in Southern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 95, p. 551-553, 2016.

KUBASU, S. S. The ability of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina, Ixodidae) stocks in Kenya to become infected with *Theileria parva*. **Bull. Entomol. Res.**, v. 82, p. 349–353, 1992.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Mol Biol Evol.**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

KUNZ, S. E., KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Rev. Sci. Technol.**, v. 13, p. 1249–1286, 1994.

LA SCOLA, B., RAOULT, R. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases. **J. Clin. Microbiol.**, v. 35, p. 2715-2727, 1997.

LABUDA, M., NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. **Parasitol.**, v.129, p. 221-245, 2004.

LABRUNA, M. B., AMAKU, M. Rhythm of engorgement and detachment of *Anocentor nitens* females feeding on horses. **Vet. Parasitol.**, v. 137, p. 316-332, 2006.

LABRUNA, M. B., CAMARGO, L. M., CAMARGO, E. P., WALKER, D. H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 127, p. 169–174, 2005.

LABRUNA, M. B., FUGISAKI, E.Y., PINTER, A., DUARTE, J. M. B., SZABÓ, M. J. P. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 30, p. 305–316, 2003.

LABRUNA, M. B., KASAI, N., FERREIRA, F., FACCINI, J. L. H., GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.

LABRUNA, M. B., KERBER, C. E., FERREIRA, F., FACCINI, J. L. H., DE WAAL, D. T., GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 97, p.1-14, 2001.

LABRUNA, M. B., MATTAR, S., NAVA, S., BERMUDEZ, S., VENZAL, J. M., DOLZ, G., et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Rev. MVZ Córdoba**, v. 16, p. 2435–2457, 2011.

LABRUNA, M. B., MCBRIDE, J. W., BOUYER, D. H., CAMARGO, L. M. A., CAMARGO, E. P., WALKER, D. H. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 41, p. 533–537, 2004b.

LABRUNA, M. B., NAVA, S., MARCILI, A. BARBIERI, A. R. M., NUNES, P. H., HORTA, M. C., VENZAL, J. M. 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**, v.9, p.511, 2016.

LABRUNA, M. B., NARANJO, V., MANGOLD, A. J., THOMPSON, C., ESTRADA-PEÑA, A., GUGLIELMONE, A. A, et al. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evol. Biol.**, v. 9, n. 46, 2009.

LABRUNA, M. B., PACHECO, R. C., RICHTZENHAIN, L. J., SZABÓ, M. P. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of Sao Paulo, Brazil. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 73, p. 869–873, 2007.

LABRUNA, M. B., VERÍSSIMO, C. J. Observações sobre a infestação por *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em bovinos mantidos em rotação de pastagem, sob alta densidade animal. **Arq. Inst. Biol.**, v.68, n.2, p.115-120, 2001.

LABRUNA, M. B., WHITWORTH, T., HORTA, M. C., MCBRIDE, J. W., PINTER, A., et al. Rickettsia species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, v. 42, p. 90–98, 2004a.

LASTA, C. S., SANTOS, A. P., MESSICK, J. B., OLIVEIRA, S. T., BIONDO, A. W., VIEIRA, R. F., et al.; Molecular detection of *Ehrlichia canis* and *Anaplasma platys* in dogs in Southern Brazil. **Rev. Bras. Parasitol.Vet.**, v. 22, n. 3, p. 360 – 366, 2013.

LAUS, F., SPATERNA, A., FAILLACE, V., VERONESI, F., RAVAGNAN, S., BERIBÉ, F., et al. Clinical investigation on *Theileria equi* and *Babesia caballi* infections in Italian donkeys. **BMC Vet. Res.**, v. 11, p. 100-107, 2015.

LEGG, L. Some observations on the life history of the cattle tick (*Boophilus australis*). **Proc. R. Soc. Queensl.**, v.41, 1930.121-132p.

LESLIE, M. Thrown for a *D-loop*. **J. Cell Biol.**, v. 176, n. 2, p.129, 2007.

LEO, S. S. T., DAVIS, C. S., SPERLING, F. A. H. Characterization of 14 microsatellite loci developed for *Dermacentor albipictus* and cross-species amplification in *D. andersoni* and *D. variabilis* (Acari: Ixodidae). **Conserv. Genet. Resour.**, v. 4, p. 379–382, 2012.

LEO, S. S., PYBUS, M. J., SPERLING, F.A. Deep mitochondrial DNA lineage divergences within Alberta populations of *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae) do not indicate distinct species. **J. Med. Entomol.**, v. 47, p. 565–574, 2010.

LEO, S. S., SAMUEL, W. M., PYBUS, M. J., SPERLING, F.A. Origin of *Dermacentor albipictus* (Acari: ixodidae) on elk in the Yukon, Canada. **J. Wildl. Dis.**, v. 50, p. 544– 551, 2014.

LEWIS IJ. Observations on the dispersal of larvae of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bull. Entomol. Res.**, v. 59, n. 4, p. 595 – 604, 1970.

LI, W.H. **Molecular evolution**. Sinauer, Sunderland, Mass. 1997. 487p.

LIM, M. Y., BRADY, H., HAMBLING, T., SEXTON, K., TOMPKINS, D., SLANEY, D. *Rickettsia felis* infections, New Zealand. **Emerg. Infect. Dis.**, v.18, n.1, p.167-169, 2012.

LIMA, R. A. S., SHIROTA, R., BARROS, G. S. C. **Estudo do complexo do agronegócio cavalo**. Brasília: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada da ESALQ/Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil, 2006. 70p.

LÓPEZ-PÉREZ, A. M., SÁNCHEZ-MONTES, S., FOLEY, J., GUZMÁN-CORNEJO, C., COLUNGA-SALAS, P., PASCOE, E., et al. Molecular evidence of *Borrelia burgdorferi* sensu stricto and *Rickettsia massiliae* in ticks collected from a domestic-wild carnivore interface in Chihuahua, Mexico. **Ticks Tick borne Dis.**, v. 10, n. 5, p. 1118-1123, 2019.

LOW, V. L., TAY, S. T., KHO, K. L., KOH, F. X., TAN, T. K., LIM, Y. A., ONG, B. L., PANCHADCHARAM, C., NORMA-RASHID, Y., SOFIAN-AZIRUN, M. Molecular characterisation of the tick *Rhipicephalus microplus* in Malaysia: new insights into the cryptic diversity and distinct genetic assemblages throughout the world. **Parasite Vector**, v. 8, p. 341, 2015.

LUCE-FEDROW, A., WRIGHT, C., GAFF, H. D., SONENSHINE, D. E., HYNES, W. L., RICHARDS, A. L. In vitro propagation of *Candidatus Rickettsia andeanae* isolated from *Amblyomma maculatum*. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 64, p.74-81, 2012.

LUZ HR, FACCINI JL, MCINTOSH D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. **Ticks Tick - Borne Dis.**, v. 8, p. 657-665, 2017.

LYSYK, T. J., SCOLES, G. A. Reproductive compatibility of prairie and montane populations of *Dermacentor andersoni*. **J. Med. Entomol.**, v. 45, p. 1064–1070, 2008.

MACALUSO, K. R., SONENSHINE, D. E., CERAUL, S. M., AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. **J. Med. Entomol.**, v. 39, p. 809–813, 2012.

MADHAV, N. K., BROWNSTEIN, J. S., TSAO, J. I., FISH, D. A dispersal model for the range expansion of black legged tick (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 41, p. 842 - 852, 2004.

MADDER M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a most successful invasive tick species in West-Africa. **Exp Appl Acarol.**, v. 53, n. 2, p. 139 – 145, 2011.

MADDER, M., THYS, E., GEYSEN, D., BAUDOUX, C., HORAK, I. *Boophilus microplus* ticks found in West Africa. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 43, p. 233 – 234, 2007.

MADDER, M., ADEHAN, S., DE DEKEN, R., ADEHAN, R., LOKOSSOU, R. New foci of *Rhipicephalus microplus* in West Africa. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 56, p. 385 – 390, 2012.

MALHEIRO, D. M. Sobre a ocorrência de *Otocentor nitens* (Neumann, 1897) Cooley, 1938, Acari – Ixodoidea – Ixodidae, em cavalos dos Estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso, Brasil. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária de São Paulo**, v.4, n.4, p.533-535, 1952.

MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res.**, v. 27, p. 209-220, 1967.

MARTINS, J. R., CERESÉR, V. H., CORRÊA, B. L., SMITH, R. D. *Borrelia theileri*: observação em carrapatos do gênero *Boophilus microplus* no município de Guaíba, RS, Brasil. **Ciênc Rural**. v. 26, n. 3, p. 447 – 450, 1996.

MARTINS, T. F., TEIXEIRA, R. H. F., LABRUNA, M. B. Ocorrência de carrapatos em animais silvestres recebidos e atendidos pelo Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros, Sorocaba, São Paulo, Brasil. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.52, p.319-324, 2015.

MARQUEZ, F. J., MOREL, P. C., GUIGUEN, C., BEAUCOURNU, J. C. Clé Dichotomique des Ixodidade D'Europe. I. Les larves du genre Ixodes. **Acarol.**, v. 33, p. 325-330, 1992.

MAROUN, S., AMORIM, M., GAZÊTA, G., SERRA-FREIRE, N. Estudo morfológico de ninfas de *Anocentor nitens* (Neumann,1897) (Acari:Ixodidae). **Entomol. Vectores**, v. 6, p. 543–554, 1999.

MCCOY, K. D. The population genetic structure of vectors and our understanding of disease epidemiology. **Parasite**, v.15, p. 444-448, 2008.

MCCOY, B. N., MAÍGA, O., SCHWAN, T. G. Detection of *Borrelia theileri* in *Rhipicephalus geigy* from Mali, **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 5, p. 401–403, 2014.

MEDIANNIKOV, O., ABDISSA, A., DIATTA, G., TRAPE, J. F., RAOULT, D. *Rickettsia felis* in fleas, southern Ethiopia. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 18, p. 1385–1386, 2012.

MERTINS JW, MOORHOUSE AS, ALFRED JT, HUTCHESON HJ. *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae): new North American collection records, including the first from the United States. **J. Med. Entomol.**, v. 47, p. 536-542, 2010.

MIRANDA, J., PORTILLO, A., OTEO, J. A., MATTAR, S. *Rickettsia* sp. Strain Colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): A New Proposed Rickettsia Detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) from iguanas and free-living larvae ticks from vegetation. **J. Med. Entomol.**, v. 49, p. 960-965, 2012.

MIXSON, T. R., LYDY, S. L., DASCH, G. A., REAL, L. A. Inferring the population structure and demographic history of the tick, *Amblyomma americanum* Linnaeus. **J. Vector Ecol.**, v. 31, p. 181–192, 2006.

MIZIARA, S. R., PAIVA, F., FRANCO, P. A., SOUZA, A. I., KOLLER, W. W., ANDREOTTI, R., LOPES, V. A., PONTES, N.T., MURTA, A. V. F. **Ocorrência de *Anocentor nitens* (Neumann, 1897) em *Puma concolor* (Linnaeus, 1771), em Campo Grande, MS, Brasil.** In SIMPÓSIO BRASILEIRO SOBRE ANIMAIS SILVESTRES E SELVAGENS, 4., Viçosa, 2007. Anais... Viçosa: Universidade Federal de Viçosa / Univiçosa, p. 80-81, 2007. Resumo.

MONTEIRO JL, FONSECA F. Typho endêmico de São Paulo. Novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos *Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*. **Mem. Inst. Butantan.**, v. 10, p. 33-50, 1932.

MOERBECK, L., VIZZONI, V. F., MACHADO-FERREIRA, E., CAVALCANTE, R. C., OLIVEIRA, S. V., SOARES, C. A., et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. **J. Med. Entomol.**, v. 53, p. 1458-1466, 2016.

MOURA-MARTINIANO, N. O., MACHADO-FERREIRA, E., CARDOSO, K. M., GEHRKE, F. S., AMORIM, M., FOGACA, A. C., et al. *Rickettsia* and vector biodiversity of spotted fever focus Atlantic rain forest biome. Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 20, p. 498–500, 2014.

MURRELL, A., BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst Parasitol.*, v.56, n.3, p.169-172, 2003.

MURRELL A, CAMPBELL NJH, BARKER SC. Mitochondrial 12S rDNA indicates that the Rhipicephalinae (Acari: Ixodida: Ixodidae) is paraphyletic. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 12, p. 83-86, 1999.

NAVA, S., GUGLIELMONE, A. A., MANGOLD, A. J. An overview of systematics and evolution of ticks. **Front. Biosci.**, v. 14, p. 2857-2577, 2009.

NAVA, S., VENZAL, J. M., GONZALEZ-ACUÑA, D., MARTINS, T. F., GUGLIELMONE, A. A. **Ticks of the Southern Cone of América: Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance.** Academic Press, 2017. 339 p.

NCBI – Nacional Center for Biotechnology Information. Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>. acesso em 05 de mar. 2018.

NIERI-BASTOS, F. A., LOPES, M. G., CANÇADO, P. H. D., ROSSA, G. A. R., FACCINI, J. L. H., GENNARI, S. M. *Candidatus Rickettsia andeanae*, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.109, p.259–261, 2014.

NIERI-BASTOS, F. A., MARCILI, A., DE SOUSA, R., PADDOCK, C. D., LABRUNA, M. B. Phylogenetic Evidence for the Existence of Multiple Strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 84, n.8, 2018.

NOGUEIRA, R. M. S., SILVA, A. B., SATO, T.P., SÁ, J. C., SANTOS, A. C. G., AMORIM FILHO, E. F., VALE, T. L., GAZÊTA G.S. Molecular and serological detection of *Theileria equi*, *Babesia caballi* and *Anaplasma phagocytophilum* in horses and ticks in Maranhão, Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 37, n. 12, p. 1416-1422, 2017.

NORRIS, D. E., KLOMPEN, J. S. H., BLACK, W. C. Comparison of the mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA genes in resolving phylogenetic relationships among hard ticks (Acari: Ixodidae). **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 92, p. 117-129, 1999.

NORRIS, D. E., KLOMPEN, J. S. H., KEIRANS, J. E., BLACK, W. C. I. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. **J. Med. Entomol.**, v. 33, p. 78-89, 1996.

NUÑES, J. L., MUÑOZ COBENAS, M. E., MOLTEDO, H. L. ***Boophilus microplus*, la garrapata comun del ganado vacuno**. Buenos Aires: Hemisfério Sur, 1982. 19p.

NUNES, E. D. C., VIZZONI, V. F., NAVARRO, D. L., IANI, F. C. D. M., DURÃES, L. S., DAEMON, E. ET AL. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 1058-1061, 2015.

OLIVEIRA, P. R., BORGES, L. M., LEITE, R. C., FREITAS, C. M. Seasonal dynamics of the Cayenne tick, *Amblyomma cajennense* on horses in Brazil. **Med. Vet. Entomol.**, v. 17, p. 412–416, 2003.

OLIVEIRA, S.V., COSTA, R.F., FERREIRA, G., PEREIRA, S.V.C., AMORIM, M., MONTEIRO, M.F.M., et al. Fatal case of spotted fever in a patient from Northeastern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo**, v. 60, e21, 2018.

OLIVEIRA, S.V., GUIMARÃES, J.N., RECKZIEGEL, G.C., NEVES, B.M.C., ARAÚJO-VILGES, K.M., FONSECA, L.X., et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **J. Venom. Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.**, v. 22, n. 22, 2016a.

OLIVEIRA, J. B., MONTOYA, J., ROMERO, J. J., URBINA, A., SOTO-BARRIENTOS, N., MELO, E. S. P., RAMOS, C. A. N., ARAÚJO, F. R. Epidemiology of bovine anaplasmosis in dairy herds from Costa Rica. **Vet. Parasitol.**, v. 177, p. 359–365, 2010.

OLIVEIRA, S.V., PEREIRA, S.V.C., VOIETTA, F., FONSECA, L., SERRA-FREIRE, N.M., CARDOSO, K.M. et al. Vigilância de ambientes da febre maculosa: explorando as áreas silenciosas do Brasil. **Rev. Pan. Amaz. Saúde**, v.7, p.65-72. 2016b.

OLIVEIRA, S.V., WILLEMANN, M.C.A., GAZÊTA, G.S, ANGERAMI, R.N., GURGEL-GONCALVES, R. Predictive Factors for Fatal Tick-Borne Spotted Fever in Brazil. **Zoonoses Public Health**, v.64, p.44-50, 2017.

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.**, 53:1–31, 2016.

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

OGRZEWALSKA, M., SCHWARCZ, K., BAJAY, M.M., BAJAY, S. K., PINHEIRO, J. B., ZUCCHI, M. I., PINTER, A., LABRUNA, M. B. Characterization of Genetic Variability and Population Structure of the Tick *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 53, n. 4, p. 843-850, 2016.

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

PACHECO, R. C., MORAES-FILHO, J., NAVA, S., BRANDAO, P. E., RICHTZENHAIN, L. J., LABRUNA, M. B. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. *Exp. Appl. Acarol.*, v. 43, p. 63-71, 2007.

PADDOCK, C. D., FOURNIER, P. E., SUMNER, J. W., GODDARD, J., ELSHENAWY, Y., METCALFE, M. G., LOFTIS, A. D., VARELA-STOKES, A. Isolation of *Rickettsia parkeri* and identification of a novel spotted fever group *Rickettsia* sp. from Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) in the United States. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 76, p. 2689-2696, 2010.

PADDOCK, C. D., SUMNER, J. W., COMER, J. A., ZAKI, S. R., GOLSMITH, C. S., GODDARD, J., et al. *Rickettsia parkeri*: A newly reconized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clin. Infect. Dis.**, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004.

PAGEL VAN ZEE, J., GERACI, N. S., GUERRERO, F. D., WIKEL, S. K., STUART, J. J., NENE, V. M., HILL, C. A. Tick genomics: The Ixodes genome project and beyond. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, p. 1297 – 1305, 2007.

PAROLA P. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 996–1000, 2011.

PAROLA, P., LABRUNA, M. B., RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 11, n. 1, p. 40–50, 2009.

PAROLA, P., PADDOCK, C. D., SOCOLOVSCHI, C., LABRUNA, M. B., MEDIANNIKOV, O., KERNIF, T. et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 26, p. 657-702, 2013.

PAROLA, P., RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clin. Infect. Dis.**, v. 32, p. 897–928, 2001.

PAROLA, P., RAOULT, D. Tropical rickettsioses. **Clin. Dermatol.**, v. 24, p. 191-200, 2006.

PATTERSON, E. I., DERGOUSOFF, S. J., CHILTON, N. B. Genetic variation in the 16S mitochondrial DNA gene of two Canadian populations of *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 46, p. 475–481, 2009.

PESQUERA, C., PORTILLO, A., PALOMAR, A.M., OTEO, J. A. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. **Parasit. Vectors**, v. 8, n. 46, p. 1-10, 2015.

PETER, R. J., VAN DEN BOSSCHE, P., PENZHORN, B. L., SHARP, B. Tick, fly, and mosquito Control-Lessons from the past, solutions for the future. **Vet. Parasitol.**, v. 132, n. 3-4, p. 205-215, 2005.

PEREIRA, M. C., LABRUNA, M. B., SZABÓ, M. P. J., KLAFKE, G.M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biologia, controle e resistência***. São Paulo, 2008. 169p.

PIESMAN, J., EISEN, L. Prevention of Tick-Borne Diseases. **Annu. Rev. Entomol.** v. 53, p. 323-343, 2008.

PIESMAN, J., MATHER, T. N., SINSKY, R. J., SPIELMAN, A. Duration of tick attachment and *Borrelia burgdorferi* transmission. **J. Clin. Microbiol.**, v. 25, p. 557 – 558, 1987.

PETNEY, T. N., ROBBINS, R. G., GUGLIELMONE, A. A., APANASKEVICH, D. A., ESTRADA-PENA, A., HORAK, I. G., SHAO, R. **A look at the world of ticks**. In: Mehlhorn, H. (Ed.), *Progress in Parasitology*. Verlag, Berlin, Heidelberg (Chapter 2). 2011. 283-296p.

POHL, A., CABEZAS-CRUZ, A., RIBEIRO, M. F. B., SILVEIRA, J. A., SILAGHI, C., PFISTER, K., PASSOS, L. M. F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 22, n. 1, p. 129-135, 2013.

PROGRAMA NACIONAL DE SANIDADE EM EQUIDEOS (PNSE). Inquérito epidemiológico de anemia infecciosa equina no Estado do RS. Disponível em: <<http://slideplayer.com.br/slide/10263809/>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

QIU, W. G., DYKHUIZEN, D. E., ACOSTA, M. S., LUFT, B. J. Geographic uniformity of the Lyme disease spirochete (*Borrelia burgdorferi*) and its shared history with tick vector (*Ixodes scapularis*) in the northeastern United States. **Genetics**, v. 160, n. 3, p. 833-849, 2002.

RAOULT, D., LA SCOLA, B., ENEA, M., FORNIER, P. E., ROUX, V., FENOLLAR, F, GALVAO, M.A., DE LAMBALLERIE, X. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. **Emerg. Infect. Dis.**, v.7, p.73 - 81, 2001.

RAOULT, D., ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinic. Microbiol. Rev.**, v. 10, n. 4, p. 694 – 719, 1997.

REGNERY, R. L., SPRUILL, C. L., PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **J. Bacteriol.**, v. 173, p. 1576 -1 589, 1991.

REIF, K. E., MACALUSO, K. R. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. **J. Med. Entomol.**, v. 46, p. 723 – 736, 2009.

RIVERA-PÁEZA, F. A., LABRUNA, M. B., MARTINS, T. F., PEREZ, J. E., CASTAÑO-VILLAD, G. J., OSSA-LÓPEZE, P. A., GILE, C. A., SAMPIERIF, B. R., ARICAPA-GIRALDOG, H. J., CAMARGO-MATHIASA, M. I. Contributions to the knowledge of hard ticks (Acari: Ixodidae) in Colombia. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 9, n. 1, p. 57 - 66, 2018.

ROBY, T. O., ANTHONY, D. W. Transmission of equine piroplasmiasis by *Dermacentor nitens* Neumann. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v. 142, n. 7, p. 768 – 769, 1963.

RODRIGUES, V. S., GARCIA, M. V., CRUZ, B. C., MACIEL, W. G., ZIMMERMANN, N. P., KOLLER, W. W., BARROS, J. C., ANDREOTTI, R. Life cycle and parasitic competence of *Dermacentor nitens* Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae) on different animal species. **Ticks Tick-borne Dis.**, v. 8, n. 3, p. 379 - 384, 2017.

RODRIGUES, D. S., LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 65, n. 5, p. 1570-1572, 2013.

- ROTHSCHILD, C. M. Equine piroplasmiasis. **J. Equine Vet. Sci.**, v. 33, p. 497–508, 2013.
- ROUX, V., RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer membrane protein rOmpB (ompB). **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 50, p. 1449–1455. 2000.
- ROUX, V., RYDKINA, E., EREMEEVA, M., RAOULT, D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the Rickettsiae. **Intern. J. Syst. Bacteriol.**, v. 47, n. 2, p. 252-256, 1997.
- ROY, B. C., ESTRADA-PEÑA, A., KRÜCKENA, J., REHMAND, A., NIJHOF, A. M. Morphological and phylogenetic analyses of *Rhipicephalus microplus* ticks from Bangladesh, Pakistan and Myanmar. **Ticks Tick Borne Dis.**, v. 9, n. 5, p. 1069 – 1079, 2018.
- RUZIC-SABLJIC, E., CESAR, T. Borrelia genotyping in Lyme Disease. **Open Dermatol. J.**, v. 10, n. 4, p. 6-14, 2016.
- SANTOS, M., HADDAD, J. R. V, RIBEIRO-RODRIGUES, R., TLHARI, S. Lyme borreliosis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 85, p. 930 - 938, 2010.
- SANTOS, H. A., THOMÉ, S. M., BALDANI, C. D., SILVA, C. B., PEIXOTO, M. P., PIRES, M. S., et al. Molecular epidemiology of the emerging zoonosis agent *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) in dogs and ixodid ticks in Brazil. **Parasite Vector.**, v. 11, n. 6, p. 348, 2013.
- SAKAI, R. K., COSTA, F. B., UENO, T. E., RAMIREZ, D. G., SOARES, J. F., FONSECA, A. H., LABRUNA, M. B., BARROS-BATTESTI, D. M. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. **Ticks Tick-borne Dis.**, v. 5, p. 917 – 923, 2014.
- SATO, T., MOURA-MARTINIANO, N., VIZZONI, V., SILVA, A., DURÉ, A. Í, AMORIM, M., OLIVEIRA, S. GAZÊTA, G. Detection of a *rickettsia* genotype related to the old world infecting *Amblyomma sculptum* tick in an endemic area of Brazilian Spotted Fever. **J. Trop. Pathol.**, v. 48, n. 3, p. 161-169, 2019.

SATTLER, P. W., HILBURN, L. R., DAVEY, R. B., GEORGE, J. E., ROJAS AVALOS, J. B. Genetic similarity and variability between natural populations and laboratory colonies of North American *Boophilus* (Acari: Ixodidae). **J. Parasitol.**, v. 72, n. 1, p. 95-100, 1986.

SATTLER, P.W., HILBURN, L.R., DAVEY, R.B., GEORGE, J.E., ROJAS AVALOS, J.B. Genetic similarity and variability between natural populations and laboratory colonies of North American *Boophilus* (Acari: Ixodidae). **J. Parasitol.**, v. 72, p. 95 – 100, 1986.

SCHNITTGER, L., RODRIGUEZ, A. E., FLORIN-CHRISTENSEN, M., MORRISON, D. A. *Babesia*: a world emerging. **Infect. Genet. Evol.**, v. 12, p. 1788 – 1809, 2012.

SCOLES, G.A., UETI, M.V. Vector ecology of equine piroplasmosis. **Annu. Rev. Entomol.** v. 60, p. 561-580, 2015.

SEBASTIAN PS, BOTTERO MNS, CARVALHO L, MACKENSTEDT U, LARESCHI M, VENZAL JM, et al. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes cf. neuquenensis* and *Ixodes sigelos* ticks from the Patagonian region of Argentina. **Acta Trop.**, v. 162, p. 218-221, 2016.

SEKEYOVA, Z., ROUX, V., RAOULT, D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.**, v. 51, p. 1353-1360, 2001.

SERRA-FREIRE, N. M. S. Epidemiologia de *Amblyomma cajennense*: ocorrência estacional e comportamento dos estádios não parasitários em pastagens do Estado do Rio de Janeiro. **Arq. Univ. Fed. Rur. Rio de Janeiro**, v.5, n.2, p.187–193, 1982.

SERRA-FREIRE, N. M., SENA, L. M. M., BORSOI, A. B. P. Parasitismo Humano por Carrapatos na Mata Atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **EntomoBrasilis**, v. 4, n. 2, p. 67-72, 2011.

SHAO, R., BARKER, SC. Mitochondrial genomes of parasitic arthropods: implications for studies of population genetics and evolution. **Parasitol.**, v. 134, n. 2, p. 153-167, 2007.

SHKAP, V., COHEN, I., LEIBOVITZ, B., SAVITSKY, PIPANO, E., AVNI, G., et al. Seroprevalence of *Babesia equi* among horses in Israel using competitive ELISA and IFA assay. **Vet. Parasitol.**, v. 76, p. 251-259, 1998.

SIMON, C., FRATI, F., BECKENBACH, A., CRESPI, B., LIU, H., FLOOK, P. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. **Ann. Entomol. Soc. Am.**, v. 87, p. 651-701, 1994.

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

SILVA, A. B., DUARTE, M. M., CAVALCANTE, R. C., OLIVEIRA, S. V., VIZZONI, V. F., DURÉ, A. I. L., DE MELO, I. F. C., MACHADO-FERREIRA, E., GAZÊTA, G. S. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Latreille 1806), in high altitude Atlantic Forest fragments, Ceará State, Brazil. **Acta Trop.**, v. 73, p. 30-33, 2017b.

SILVA, A.B., VIZZONI, V.F., COSTA, A.P., COSTA, F.B., MORAES-FILHO, J., LABRUNA, M.B. et al. First report of a *Rickettsia assempbonensis* related infecting fleas in Brazil. **Acta Trop.**, v. 172, p.44-49, 2017a.

SILVA, N., EREMEEVA, M., ROZENTAL, T., RIBEIRO, G. S., PADDOCK, C. D., RAMOS, E. A. G, et al. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 17, p. 275–278, 2011.

SLOBODA, M., JIRKU, M., LUKESOVA, D., QABLAN, M., BATSUKH, Z., FIALA, I., HORIN, P., MODRY, D., LUKES, J. A survey for piroplasmids in horses and Bactrian camels in North-Eastern Mongolia. **Vet. Parasitol.**, v. 179, n. 1-3, p. 246–249, 2011.

SMITH, R. MIRANPURI, G. ADAMS, J. AHRENS, E. *Borrelia theileri*: isolation from ticks (*Boophilus microplus*) and tick-borne transmission between splenectomized calves, **Am. J. Vet. Res.**, v. 46, p. 1396–1398, 1985.

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

SOARES, C. O., ISHIKAWA, M. M., FONSECA, A. H., YOSHINARI, N. H. Borrelioses, agents and vectors: a review. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 20, n. 1, p. 1 – 19, 2000.

SOARES, J. F., SANGIONI, L. A., VOGEL, F. F., SILVA, C. F. B. Parasitismo em ser humano por *B. microplus* (Acari: Ixodidae) em Santa Maria, RS, Brasil, **Ciênc. Rural**, v.37, p.1495–1497, 2007.

SOCOLOVSCHI, C., HUYNH, T. P., DAVOUST, B., GOMEZ, J., RAOULT, D., PAROLA, P. Transovarial and trans-stadial transmission of *Rickettsiae africae* in *Amblyomma variegatum* ticks. **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 15, p. 317–318, 2009b.

SOCOLOVSCHI, C., MEDIANNIKOV, O., RAOULT, D., PAROLA, P. Update on tick-borne bacterial diseases in Europe. **Parasite**, v. 16, p. 259-273, 2009a.

SONENSHINE, D.E. **Biology of ticks**. V.1. 2 Ed. Oxford University, New York, 1993. 465p.

SONG, S., SHAO, R., ATWELL, R., BARKER, S., VANKAN, D. Phylogenetic and phylogeographic relationship in *Ixodes holocyclus* and *Ixodes cornuatur* (Acari: Ixodidae) inferred from COX-I and ITS2 sequences. **Int. J. Parasitol.**, v. 41, n. 8, p. 871-880, 2011.

SOUZA, F. A., BRAGA, J. F. V., PIRES, L. V., CARVALHO, C. J. S., COSTA, E. A., et al. Babesiosis and anaplasmosis in dairy cattle in Northeastern Brazil. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 33, n. 9, p. 1057-1061, 2013.

SOUZA, A. P., SERRA-FREIRE, N. M. Variação sazonal dos estádios adultos de *Amblyomma cajennense* e *Anocentor nitens*, como parasitas de cavalos, no município de Itaguaí, RJ, Brasil. **Rev. Brasil. Parasitol. Vet.**, v.1, 31-34, 1992.

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

SPOLIDORIO, M. G., LABRUNA, M. B., MANTOVANI, E., BRANDÃO, P. E., RICHTZENHAIN, L. J., YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 16, p. 521–513, 2010.

STANEK, G., REITER, M. The expanding Lyme Borrelia complex – clinical significance of genomic species? **Clin. Microbiol. Infect.**, v. 17, p. 487-493, 2011.

STEERE, A. C., COBURNE, J., GLICKSTEIN, L. **Lyme borreliosis**. In: GOODMAN, J. L., DENNIS, D. T., SONENSHINE, D.E. (editors). Tick-Borne diseases of humans. Washington, DC: **Am. Soc. Microbiol.** 2005. 176p.

STEINMAN, A., ZIMMERMAN, T., KLEMENT, E., LENSKY, I.M., BERLIN, D., GOTTLIEB, Y., BANETH G. Demographic and environmental risk factors for infection by *Theileria equi* in 590 horses in Israel. **Vet. Parasitol.**, v. 187, p. 555-562, 2012.

STILLER, D., COAN, M.E. Recent developments in elucidating tick vector relationships for anaplasmosis and equine piroplasmosis. **Vet. Parasitol.**, v.57, n.1-3, p.97–108, 1995.

STILLER D, GOFF WL, JOHNSON LW, KNOWLES DP. *Dermacentor variabilis* and *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): experimental vectors of *Babesia equi* to equids. **J. Med. Entomol.**, v. 39, p. 667-670, 2002.

STOTHARD, D. R., CLARK, J. B., FUERST, P. A. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. **Int. J. Syst. Bacteriol.**, v. 44, n. 4, p. 798-804, 1994.

SUAREZ, C. E., NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Vet. Parasitol.**, v. 180, p. 109-125, 2001.

SZABÓ, M. P., PINTER, A., LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Front. Cell Infect. Microbiol.**, v. 3: 27, 2013.

TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, p. 585 – 595, 1989.

TAMURA, K., STECHER, G., PETERSON, D., PETERSON, N., FILIPSKI, A., KUMAR, S. MEGA 6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. **Mol. Biol. Evol.**, v. 30, n. 12, p. 2731–2739, 2013.

TAMZALI, Y. Equine piroplasmosis: an updated review. **Equine Vet. Educ.**, v. 25, p. 590 – 598, 2013.

TAYLOR, M. F., MCKECHNIE, S. W., PIERCE, N., KREITMAN, M. The lepidopteran mitochondrial control region: structure and evolution. **Mol. Biol. Evol.**, v. 10, p. 1259-1272, 1993.

TEGLAS, M., MATERN, E., LEIN, S., FOLEY, P., MAHAN, S. M., FOLEY, J. Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses. **Vet. Parasitol.**, v. 131, p. 119–127, 2005.

THOMPSON, J., HIGGINS, D., GIBSON, T. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic. Acids Res.**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TOMASSONE, L., NUÑEZ, P., CEBALLOS, L. A., GÜRTLER, R. E., KITRON, U., FARBER, M. Detection of “*Candidatus Rickettsia* sp. strain Argentina” and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 52, p. 93-100, 2010.

TORRES, A. J., FINGER, I. S., FARIAS, N. A. R., NIZOLI, L. Q., SILVA, S. S. NOGUEIRA, C. E. W. Aspectos epidemiológicos da Theileriose equina e sua relação com o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em duas propriedades na região da campanha do Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev. Ibero-Latinoam. Parasitol.** v. 71, p. 70 – 77, 2012.

UETI, W. M., PALMER, G. H., KAPPMAYER, L. S., STATFIELD, M., SCOLES, G. A., KNOWLES, P. D. Ability of vector tick *Boophilus microplus* to acquire and transmit *Babesia equi* following feeding on chronically infected horses with low-level parasitemia. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, n. 8, p. 3755-3759, 2005.

UETI, W. M.; PALMER, G. H.; SCOLES, G. A.; KAPPMAYER, L. S.; KNOWLES, P. D. Persistently infected horses are reservoirs for intrastadial tick-borne transmission of the apicomplexan parasite *Babesia equi*. **Infect. Immun.**, v. 76, n. 8, p. 3525-3529, 2008.

UILENBERG, G. Babesia-A historical overview. **Vet. Parasitol.**, v. 138, p. 3–10, 2006.

VIZZONI, V. F., SILVA, A. B., CARDOSO, K. M., SANTOS, F. B., STENZEL, B., AMORIN, M., OLIVEIRA, S. V., GAZÊTA, G. S. Genetic identification of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in an endemic area of a mild Spotted Fever in Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Acta Trop.**, v. 162, p. 142-145, 2016.

WAAL, D. T. Equine piroplasmiasis: a review. **Br. Vet. J.**, v.148, p.6–14, 1992.

WALLIS, G. P., MILLER, B. R. Electrophoretic analysis of the ticks *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* and *O. (P.) sonrai* (Acari: Argasidae). **J. Med. Entomol.**, v. 20, p. 570–571, 1983.

WALKER, A. R., BOUATTOUR, A., CAMICAS, J.-L., ESTRADA-PEÑA, A., HORAK, I. G., LATIF, A. A., PEGRAM, R. G., PRESTON, P. M. **Ticks of Domestic Animals in Africa: A Guide to Identification of Species.** Bioscience reports Edinburgh. 2003, 227p.

WECK, B., DALL'AGNOL, B., SOUZA, U., WEBSTER, A., STENZEL, B., KLAFKE, G. et al. Spotted Fever Group Rickettsia in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. **Emerg. Infect. Dis.**, v.22, p.14-6. 2016.

WEINERT, L. A., WELCH, J. J., JIGGINS, F. M. Conjugation genes are common throughout the genus Rickettsia and are transmitted horizontally. **Proc. R. Soc. B**, v. 276, p. 3619-3627, 2009a.

WEINERT, L. A., WERREN, J. H., AEBI, A., STONE, G. N., JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biol.**, v. 7: 6, 2009b.

WIKSWO, M. E., HU, R., DASCH, G. A., KRUEGER, L., ARUGAY, A., JONES, K., HESS, B., BENNETT, S., KRAMER, V., EREMEEVA, M. E. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor* species from southern California. **J. Med. Entomol.**, v. 45, p. 509–516, 2008.

WISE, L. N., KAPPMAYER, L. S., MEALEY, R. I. I., KNOWLES, D. P. Review of Equine Piroplasmiasis. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 27, p. 1334–1346, 2013.

WITTER, R., MARTINS, T.F., CAMPOS, A.K., MELO, A.L. CORRÊA, S.H., MORGADO, T.O. et al. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brasil. **Ticks Tick-Borne Dis.**, v. 3, p. 415-423, 2016.

WITTER, R., VECCHI, S. N., PACHECO, T. A., MELO, A. L. T., BORSA, A., SINKOC, A. L., et al.; Prevalence of canine monocytic ehrlichiosis and canine thrombocytic anaplasmosis in dogs suspected of hemoparasitosis in Cuiabá Mato Grosso. **Semina: Ciên. Agrár.**, v. 34, n. 6, p. 3811-3822, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory diagnosis of Rickettsial diseases. **Bull. World Health Organ.**, v. 66, p. 283-420, 1988.

XU, G., FANG, Q. Q., KEIRANS, J. E., DURDEN, L. A. Molecular phylogenetic analyses indicate that the *Ixodes ricinus* complex is a paraphyletic group. **J. Parasitol.**, v. 89, p. 452-457, 2003.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Ann. Eugen.**, v. 15, p. 323 – 354, 1951.

YPARRAGUIRRE, L. A., MACHADO-FERREIRA, E., ULLMANN, A., J., PIESMAN, J., ZEIDNER, N. S., SOARES, C. A. G. A Hard Tick Relapsing Fever Group Spirochete in a

Brazilian *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Vector Borne Zoonotic Dis.**, v. 7, n. 4, p. 717-721, 2007.

YU, X. J., WALKER, D. H. **The Order Rickettsiales**. In: M Dworkin, the Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community, New York, Springer-Verlag, 3 ed., 2003.

ZAPF, F., SCHEIN, E. The development of *Babesia (Theileria) equi* (Laveran, 1901) in the gut and the haemolymph of the vector ticks, *Hyalomma* species. **Parasitol. Res.**, v. 80, p. 297–302, 1994.

ZAUGG, J.L. **Babesiose**. In: Smith, BP. Medicina Interna de Grandes animais, 3 ed. Barueri: Barueri, 2006. 1051 - 1055p.

ZEIDNER, N. S., BURKOT, T. R., MASSUNG, R., NICHOLSON, W. L., DOLAN, M. C., RUTHERFORD, J. S., BIGGERSTAFF, B. J., MAUPIN, G. O. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. **J. Infect. Dis.**, v. 182, p. 616 - 619, 2000.

ZERINGÓTA, V., MATURANO, R., LUZ, H. R., SENRA, T. O., DAEMON, E., FACCINI, J. L., MCINTOSH, D. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. **Ticks Tick - Borne Dis.**, v. 8, p. 81–89, 2016.

APÊNDICES

APÊNDICE A. Espécimes de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) coletados parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Estado	Bioma	Hospedeiro/Ambiente (n)	Espécimes	Amostras Testadas
Região Norte				
Roraima	Amazônia	<i>Bos taurus</i> (1)	4	2
		Subtotal	4	2
Rondônia	Amazônia	Ambiente - pasto (NA)	374	4
		<i>Bos taurus</i> (2)	18	2
		<i>Equus caballus</i> (1)	47	1
		Subtotal	439	7
Tocantins	Cerrado	<i>Bos taurus</i> (4)	26	12
		Subtotal	26	12
Região Nordeste				
Bahia	Mata Atlântica	<i>Equus caballus</i> (1)	56	5
		Subtotal	56	5
Ceará	Caatinga	<i>Bos taurus</i> (46)	458	103
		<i>Canis familiaris</i> (3)	12	4
		<i>Equus asinus</i> (1)	50	2
		<i>Equus caballus</i> (1)	21	4
		Subtotal	541	113
Pernambuco	Caatinga e Mata Atlântica	<i>Capra aegagrus hircus</i> (2)	4	4
		<i>Ovis aries</i> (1)	1	1
		Subtotal	5	5
Rio Grande do Norte	Caatinga	<i>Bos taurus</i> (5)	38	8
		<i>Equus asinus</i> (4)	58	8
		<i>Equus caballus</i> (2)	23	4
		Subtotal	119	20
Região Centro-Oeste				
Goiás	Cerrado	<i>Blastocerus dichotomus</i> (1)	6	4
		<i>Bos taurus</i> (7)	181	32
		Ambiente - pasto (NA)	411	9
		<i>Equus caballus</i> (1)	11	3
		<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (1)	1	1
		<i>Tapirus terrestris</i> (1)	13	6
		Subtotal	623	55
Mato Grosso	Cerrado	<i>Equus caballus</i> (1)	79	1
		Subtotal	79	1

Continua

Estado	Bioma	Hospedeiro/Ambiente (n)	Espécimes	Amostras Testadas
Região Sudeste				
Espírito Santo	Mata Atlântica	<i>Bos taurus</i> (1)	98	49
		Ambiente - pasto (NA)	3379	7
		<i>Ovis aries</i> (2)	12	7
		Subtotal	3489	63
Minas Gerais	Mata Atlântica e Cerrado	<i>Bos taurus</i> (33)	1005	160
		Ambiente - mata ciliar (NA)	309	5
		<i>Ovis aries</i> (2)	11	3
		Subtotal	1325	168
Rio de Janeiro	Mata Atlântica	<i>Bos taurus</i> (29)	429	90
		<i>Equus caballus</i> (3)	20	5
		<i>Canis familiaris</i> (1)	14	1
		Ambiente - pasto (NA)	151	3
		Ambiente - curral (NA)	12	2
		Subtotal	626	101
São Paulo	Mata Atlântica e Cerrado	<i>Bos taurus</i> (2)	74	10
		Subtotal	74	10
Região Sul				
Paraná	Mata Atlântica	<i>Bos taurus</i> (11)	129	23
		Ambiente - mata ciliar (NA)	18	2
		<i>Equus caballus</i> (4)	56	12
		Subtotal	203	37
		Ambiente - alojamento (NA)	7	1
Santa Catarina	Mata Atlântica	<i>Bos taurus</i> (1)	5	1
		Subtotal	12	2
Rio Grande do Sul	Mata Atlântica e Pampa	<i>Bos taurus</i> (2)	30	8
		<i>Equus caballus</i> (2)	27	11
		Subtotal	57	19
Total			7678	620

(n): número de espécimes; NA: não se aplica.

Conclusão

APÊNDICE B. Espécimes de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 coletados parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Estado	Bioma	Hospedeiro/Ambiente (n)	Espécimes	Amostras testadas
Região Norte				
Roraima	Amazônia	<i>Equus caballus</i> (1)	8	4
		Subtotal	8	4
Rondônia	Amazônia	<i>Equus asinus</i> (1)	43	5
		<i>Equus caballus</i> (4)	142	13
		Subtotal	185	18
Região Nordeste				
Bahia		<i>Equus caballus</i> (1)	66	4
		Subtotal	66	4
Ceará		<i>Equus asinus</i> (1)	8	4
		<i>Equus caballus</i> (10)	53	43
		Subtotal	61	47
Maranhão		<i>Equus caballus</i> (1)	11	2
		Subtotal	11	2
Rio Grande do Norte		<i>Equus asinus</i> (5)	33	14
		<i>Equus caballus</i> (7)	137	26
		Subtotal	170	40
Região Centro-Oeste				
Goiás		<i>Equus caballus</i> (4)	43	6
		<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (1)	1	1
		Subtotal	44	7
Mato Grosso		<i>Equus caballus</i> (1)	79	5
		Subtotal	79	5
Região Sudeste				
Espírito Santo		<i>Equus caballus</i> (2)	46	7
		Ambiente - campo de Futebol	14	1
		Subtotal	60	8
Minas Gerais		<i>Equus caballus</i> (1)	7	3
		Subtotal	7	3
		<i>Bos taurus</i> (1)	13	1
Rio de Janeiro		<i>Equus caballus</i> (10)	91	33
		Subtotal	104	34
Região Sul				
Paraná		<i>Equus caballus</i> (1)	4	1
		Subtotal	4	1
Santa Catarina		<i>Equus caballus</i> (1)	8	4
		Subtotal	8	4
Total			807	177

(n): número de espécimes; NA: não se aplica.

APÊNDICE C. Distribuição dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) identificados nas populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Haplótipo h1						
Amazônia	6103A	<i>Bos taurus</i>	2014	Boa Vista	RR	h1
					Subtotal	1
Caatinga	3705C	<i>Bos taurus</i>	2012	Caucaia	CE	h1
Caatinga	3713B	<i>Bos taurus</i>	2012	Caucaia	CE	h1
					Subtotal	2
Cerrado	6141B	<i>Equus caballus</i>	2014	Minaçu	GO	h1
Cerrado	7001E	<i>Bos taurus</i>	2015	Palmas	TO	h1
					Subtotal	2
Cerrado - Mata Atlântica	8767B	<i>Bos taurus</i>	2018	Santo Antônio do Monte Verde	MG	h1
					Subtotal	1
Mata Atântica	3526A	<i>Bos taurus</i>	2011	Baturité	CE	h1
Mata Atântica	3528A	<i>Bos taurus</i>	2011	Baturité	CE	h1
Mata Atântica	3528B	<i>Bos taurus</i>	2011	Baturité	CE	h1
Mata Atântica	3529B	<i>Bos taurus</i>	2011	Baturité	CE	h1
Mata Atântica	3529C	<i>Bos taurus</i>	2011	Baturité	CE	h1
Mata Atântica	3548A	<i>Bos taurus</i>	2011	Baturité	CE	h1
Mata Atântica	3654B	<i>Bos taurus</i>	2011	Capistrano	CE	h1
Mata Atântica	3655A	<i>Bos taurus</i>	2011	Capistrano	CE	h1
Mata Atântica	3709A	<i>Bos taurus</i>	2012	Capistrano	CE	h1
Mata Atântica	3710A	<i>Bos taurus</i>	2012	Aracoiaba	CE	h1
Mata Atântica	3716	<i>Bos taurus</i>	2012	Aracoiaba	CE	h1
Mata Atântica	3718	<i>Bos taurus</i>	2012	Aracoiaba	CE	h1
Mata Atântica	3720	<i>Bos taurus</i>	2012	Itapiúna	CE	h1
Mata Atântica	3758C	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	3764B	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	3767B	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	3768A	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	3768B	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	3770A	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	3770C	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	4523B	<i>Bos taurus</i>	2013	Baturité	CE	h1
Mata Atântica	4965B	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	4965D	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	4965E	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	4965F	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	4965G	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	4970A	<i>Bos taurus</i>	2014	Capistrano	CE	h1
Mata Atântica	4970B	<i>Bos taurus</i>	2014	Capistrano	CE	h1
Mata Atântica	4970C	<i>Bos taurus</i>	2014	Capistrano	CE	h1
Mata Atântica	4970E	<i>Bos taurus</i>	2014	Capistrano	CE	h1
Mata Atântica	5224A	<i>Canis familiaris</i>	2014	Mulungu	CE	h1
Mata Atântica	5224B	<i>Canis familiaris</i>	2014	Mulungu	CE	h1
Mata Atântica	5419B	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	5421C	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	5426A	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	5426B	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h1
Mata Atântica	6017A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h1
Mata Atântica	8771A	<i>Bos taurus</i>	2018	João Neiva	ES	h1

Continua

Continuação

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Mata Atlântica	8771E	<i>Bos taurus</i>	2018	João Neiva	ES	h1
					Subtotal	39
Mata Atlântica - Caatinga	6044D	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6049A	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6049B	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6050C	<i>Equus caballus</i>	2014	Natal	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6052A	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6052C	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6053A	<i>Equus asinus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6053B	<i>Equus asinus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6054A	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	h1
Mata Atlântica - Caatinga	6060B	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	h1
					Subtotal	10
					Total de Haplótipo h1	55
Haplótipo h2						
Amazônia	6103B	<i>Bos taurus</i>	2014	Boa Vista	RR	h2
					Subtotal	1
Caatinga	3705B	<i>Bos taurus</i>	2012	Caucaia	CE	h2
					Subtotal	1
Cerrado	4152A	<i>Ovis aries</i>	2012	Pedro Leopoldo	MG	h2
Cerrado	4154	<i>Ovis aries</i>	2012	Pedro Leopoldo	MG	h2
Cerrado	6116D	<i>Equus caballus</i>	2014	Cavalcante	GO	h2
Cerrado	6116F	<i>Equus caballus</i>	2014	Cavalcante	GO	h2
Cerrado	6138A	<i>Equus caballus</i>	2014	Joviânia	GO	h2
Cerrado	6139A	<i>Equus caballus</i>	2014	Minaçu	GO	h2
Cerrado	6139B	<i>Equus caballus</i>	2014	Minaçu	GO	h2
Cerrado	9090B	<i>Tapirus terrestris</i>	2017	Porangatu	GO	h2
Cerrado	7001B	<i>Bos taurus</i>	2015	Palmas	TO	h2
Cerrado	8770A	<i>Bos taurus</i>	2018	Unai	MG	h2
Cerrado	8770B	<i>Bos taurus</i>	2018	Unai	MG	h2
Cerrado	8770D	<i>Bos taurus</i>	2018	Unai	MG	h2
Cerrado	8770E	<i>Bos taurus</i>	2018	Unai	MG	h2
					Subtotal	13
Cerrado - Mata Atlântica	8767D	<i>Bos taurus</i>	2018	Santo Antônio do Monte Verde	MG	h2
Cerrado - Mata Atlântica	8789A	<i>Bos taurus</i>	2017	Uberaba	MG	h2
Cerrado - Mata Atlântica	8789B	<i>Bos taurus</i>	2017	Uberaba	MG	h2
Cerrado - Mata Atlântica	8789C	<i>Bos taurus</i>	2017	Uberaba	MG	h2
Cerrado - Mata Atlântica	8789D	<i>Bos taurus</i>	2017	Uberaba	MG	h2
Cerrado - Mata Atlântica	8792A	<i>Bos taurus</i>	2017	Uberaba	MG	h2
Cerrado - Mata Atlântica	8792B	<i>Bos taurus</i>	2017	Uberaba	MG	h2
Cerrado - Mata Atlântica	8792C	<i>Bos taurus</i>	2017	Uberaba	MG	h2
Cerrado - Mata Atlântica	8792E	<i>Bos taurus</i>	2017	Uberaba	MG	h2
					Subtotal	9
Mata Atlântica	3526B	<i>Bos taurus</i>	2011	Baturité	CE	h2
Mata Atlântica	3654C	<i>Bos taurus</i>	2011	Capistrano	CE	h2
Mata Atlântica	3710B	<i>Bos taurus</i>	2012	Aracoiaba	CE	h2
Mata Atlântica	3758A	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	h2
Mata Atlântica	4133A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	h2
Mata Atlântica	4133C	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	h2
Mata Atlântica	4142A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	h2
Mata Atlântica	4523A	<i>Bos taurus</i>	2013	Baturité	CE	h2
Mata Atlântica	4953A	<i>Bos taurus</i>	2014	Resende	RJ	h2
Mata Atlântica	5368B	<i>Bos taurus</i>	2014	Natividade	RJ	h2
Mata Atlântica	5419A	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h2
Mata Atlântica	5421D	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	h2
Mata Atlântica	5978B	<i>Equus caballus</i>	2014	Querência do Norte	PR	h2
Mata Atlântica	5981A	<i>Bos taurus</i>	2014	Querência do Norte	PR	h2
Mata Atlântica	5981B	<i>Bos taurus</i>	2014	Querência do Norte	PR	h2

Continua

Continuação

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Mata Atlântica	5983A	<i>Equus caballus</i>	2014	Querência do Norte	PR	h2
Mata Atlântica	5983B	<i>Equus caballus</i>	2014	Querência do Norte	PR	h2
Mata Atlântica	5983C	<i>Equus caballus</i>	2014	Querência do Norte	PR	h2
Mata Atlântica	5986A	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5987B	<i>Equus caballus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5987C	<i>Equus caballus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5990A	<i>Equus caballus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5990C	<i>Equus caballus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5991A	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5991C	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5993A	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5993B	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5993C	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Mônica	PR	h2
Mata Atlântica	5995A	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Isabel do Ivaí	PR	h2
Mata Atlântica	5995B	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Isabel do Ivaí	PR	h2
Mata Atlântica	5995C	<i>Bos taurus</i>	2014	Santa Isabel do Ivaí	PR	h2
Mata Atlântica	6004B	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6007A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6007B	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6007C	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6008C	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6009A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6009C	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6010C	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6011B	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6017D	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6018A	Ambiente	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6019B	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6019D	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6020A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	6021A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	h2
Mata Atlântica	8769C	<i>Bos taurus</i>	2018	Barra do Pirai	RJ	h2
Mata Atlântica	8769E	<i>Bos taurus</i>	2018	Barra do Pirai	RJ	h2
Mata Atlântica	8771B	<i>Bos taurus</i>	2018	João Neiva	ES	h2
Mata Atlântica	8771C	<i>Bos taurus</i>	2018	João Neiva	ES	h2
Mata Atlântica	8781A	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	h2
Mata Atlântica	8781C	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	h2
Mata Atlântica	8781E	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	h2
Mata Atlântica	8784A	<i>Bos taurus</i>	2017	Teixeiras	MG	h2
Mata Atlântica	8784B	<i>Bos taurus</i>	2017	Teixeiras	MG	h2
Mata Atlântica	8784C	<i>Bos taurus</i>	2017	Teixeiras	MG	h2
Mata Atlântica	8784D	<i>Bos taurus</i>	2017	Teixeiras	MG	h2
Mata Atlântica	8784E	<i>Bos taurus</i>	2017	Teixeiras	MG	h2
Mata Atlântica	8870B	Ambiente	2018	Cariacica	ES	h2
Mata Atlântica	8871B2	Ambiente	2018	Cariacica	ES	h2
Mata Atlântica	8891E	<i>Equus caballus</i>	2018	Valença	BA	h2
Mata Atlântica	8989E	<i>Bos taurus</i>	2018	Pato Bragado	PR	h2
					Subtotal	62
Mata Atlântica - Caatinga	6050A	<i>Equus caballus</i>	2014	Natal	RN	h2
Mata Atlântica - Caatinga	6052B	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	h2
Mata Atlântica - Caatinga	6060A	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	h2
					Subtotal	3
Mata Atlântica - Pampa	5544A	<i>Bos taurus</i>	2014	Pinhal Grande	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5544B	<i>Bos taurus</i>	2014	Pinhal Grande	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5544C	<i>Bos taurus</i>	2014	Pinhal Grande	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5547A	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5547B	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5547C	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5547D	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório	RS	h2

Continua

Continuação

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Mata Atlântica - Pampa	5547E	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório-RS	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5547F	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório-RS	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5552A	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório-RS	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5552B	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório-RS	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5552C	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório-RS	RS	h2
Mata Atlântica - Pampa	5552D	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório-RS	RS	h2
					Subtotal	13
					Total de Haplótipo h2	102
Haplótipo h3						
Cerrado	6141B	<i>Equus caballus</i>	2014	Minaçu	GO	h3
					Subtotal	1
					Total de Haplótipo h3	1
Haplótipo h4						
Mata Atlântica	6008B	<i>Bos taurus</i>	2014	Squarema	RJ	h4
Mata Atlântica	6019C	<i>Bos taurus</i>	2014	Squarema	RJ	h4
					Subtotal	2
					Total de Haplótipo h4	2
Haplótipo h5						
Mata Atlântica	6017C	<i>Bos taurus</i>	2014	Squarema	RJ	h5
					Subtotal	1
					Total de Haplótipo h5	1
Haplótipo h6						
Mata Atlântica	8769B	<i>Bos taurus</i>	2018	Barra do Pirai	RJ	h6
					Subtotal	1
					Total de Haplótipo h6	1
Haplótipo h7						
Mata Atlântica	8769D	<i>Bos taurus</i>	2018	Barra do Pirai	RJ	h7
					Subtotal	1
					Total de Haplótipo h7	1

*Ano da coleta; UF: Unidades Federativas; BA: Bahia; CE: Ceará; ES: Espírito Santo;

Conclusão

GO: Goiás; MG: Minas Gerais; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RR: Roraima;

RS: Rio Grande do Sul; TO: Tocantins.

APÊNDICE D. Distribuição dos haplótipos do gene 12S ribossomal DNA (12SrDNA) identificados nas populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo	
Haplótipo hI							
Amazônia	5760A	<i>Bos taurus</i>	2014	Porto Velho	RO	hI	
Amazônia	6103B	<i>Bos taurus</i>	2014	Boa Vista	RR	hI	
Amazônia	7826A	<i>Bos taurus</i>	2016	Alto Paraiso	RO	hI	
						Subtotal	3
Cerrado	4152A	<i>Ovis aries</i>	2012	Pedro Leopoldo	MG	hI	
Cerrado	4152B	<i>Ovis aries</i>	2012	Pedro Leopoldo	MG	hI	
						Subtotal	2
Mata Atântica	3530	<i>Bos taurus</i>	2011	Guaramiranga	CE	hI	
Mata Atântica	3573B	<i>Bos taurus</i>	2011	Baturité	CE	hI	
Mata Atântica	3648	<i>Canis familiaris</i>	2011	Capistrano	CE	hI	
Mata Atântica	3648B	<i>Canis familiaris</i>	2011	Capistrano	CE	hI	
Mata Atântica	3654C	<i>Bos taurus</i>	2011	Capistrano	CE	hI	
Mata Atântica	3655B	<i>Bos taurus</i>	2011	Capistrano	CE	hI	
Mata Atântica	3709B	<i>Bos taurus</i>	2012	Capistrano	CE	hI	
Mata Atântica	3758A	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hI	
Mata Atântica	3764A	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hI	
Mata Atântica	3767B	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hI	
Mata Atântica	3768A	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hI	
Mata Atântica	3770	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hI	
Mata Atântica	4003A	<i>Bos taurus</i>	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4003B	<i>Bos taurus</i>	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4004A	<i>Bos taurus</i>	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4004B	<i>Bos taurus</i>	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4004C	<i>Bos taurus</i>	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4008	Ambiente	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4009	Ambiente	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4010A	Ambiente	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4010B	Ambiente	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4010C	Ambiente	2012	Nova Venécia	ES	hI	
Mata Atântica	4107A	<i>Bos taurus</i>	2012	Mulungu	CE	hI	
Mata Atântica	4107B	<i>Bos taurus</i>	2012	Mulungu	CE	hI	
Mata Atântica	4143A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4143B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4135A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4135B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4136	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4137A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4139B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4140A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4140B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4142A	Ambiente	2012	Juiz de Fora	MG	hI	
Mata Atântica	4961A	<i>Canis familiaris</i>	2014	Porto Rico	PR	hI	
Mata Atântica	4962B	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	hI	
Mata Atântica	4965A	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	hI	
Mata Atântica	4970D	<i>Bos taurus</i>	2014	Capistrano	CE	hI	
Mata Atântica	4970E	<i>Bos taurus</i>	2014	Capistrano	CE	hI	
Mata Atântica	5371E	<i>Bos taurus</i>	2014	Natividade	RJ	hI	
Mata Atântica	5419	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	hI	

Continua

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Mata Atântica	5421D	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	hI
Mata Atântica	6017A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hI
Mata Atântica	6552K	Ambiente	2015	Guaçuí	ES	hI
Mata Atântica	6552T	Ambiente	2015	Guaçuí	ES	hI
Mata Atântica	7344A	<i>Bos taurus</i>	2015	Inajá	PR	hI
Mata Atântica	8772A	<i>Bos taurus</i>	2018	Caranaíba	MG	hI
Mata Atântica	8772C	<i>Bos taurus</i>	2018	Caranaíba	MG	hI
Mata Atântica	8774A	<i>Bos taurus</i>	2018	Leopoldina	MG	hI
Mata Atântica	8775A	<i>Bos taurus</i>	2018	São João Del Rey	MG	hI
Mata Atântica	8775B	<i>Bos taurus</i>	2018	São João Del Rey	MG	hI
Mata Atântica	8775C	<i>Bos taurus</i>	2018	São João Del Rey	MG	hI
Mata Atântica	8775D	<i>Bos taurus</i>	2018	São João Del Rey	MG	hI
Mata Atântica	8775E	<i>Bos taurus</i>	2018	São João Del Rey	MG	hI
Mata Atântica	8779A	<i>Bos taurus</i>	2018	Entre Rios de Minas	MG	hI
Mata Atântica	8779B	<i>Bos taurus</i>	2018	Entre Rios de Minas	MG	hI
Mata Atântica	8779E	<i>Bos taurus</i>	2018	Entre Rios de Minas	MG	hI
Mata Atântica	8780A	<i>Bos taurus</i>	2018	Ecoporanga	ES	hI
Mata Atântica	8780C	<i>Bos taurus</i>	2018	Ecoporanga	ES	hI
Mata Atântica	8780D	<i>Bos taurus</i>	2018	Ecoporanga	ES	hI
Mata Atântica	8780E	<i>Bos taurus</i>	2018	Ecoporanga	ES	hI
Mata Atântica	8781A	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	hI
Mata Atântica	8781C	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	hI
Mata Atântica	8781E	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	hI
Mata Atântica	8781G	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	hI
Mata Atântica	8781I	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	hI
Mata Atântica	8781J	<i>Bos taurus</i>	2018	Lavras	MG	hI
Subtotal						67
Mata Atântica - Caatinga	6046D	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hI
Mata Atântica - Caatinga	6046E	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hI
Mata Atântica - Caatinga	6049C	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hI
Mata Atântica - Caatinga	6053B	<i>Equus asinus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hI
Subtotal						4
Mata Atântica - Pampa	5544A	<i>Bos taurus</i>	2014	Pinhal Grande	RS	hI
Mata Atântica - Pampa	5547B	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório	RS	hI
Mata Atântica - Pampa	5552C	<i>Equus caballus</i>	2014	Osório	RS	hI
Subtotal						3
Pampa	8777	<i>Bos taurus</i>	2018	Arroio Grande	RS	hI
Subtotal						1
Total de Haplótipo hI						80
Haplótipo hII						
Mata Atântica	4141B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hII
Subtotal						1
Total de Haplótipo hII						1
Haplótipo hIII						
Mata Atântica - Caatinga	6048B	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hIII
Subtotal						1
Total de Haplótipo hIII						1

*Ano da coleta; UF: Unidades Federativas; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; MG: Minas Gerais; Conclusão
 PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RO: Rondônia; RR: Roraima; RS: Rio Grande do Sul.

APÊNDICE E. Distribuição do haplótipo da região *D-loop* identificados nas populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1888) coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Haplótipo hA						
Caatinga	4735E	<i>Bos taurus</i>	2012	Caucaia	CE	hA
					Subtotal	1
Cerrado	4152A	<i>Ovis aries</i>	2012	Pedro Leopoldo	MG	hA
Cerrado	4152B	<i>Ovis aries</i>	2012	Pedro Leopoldo	MG	hA
Cerrado	4900B	<i>Bos taurus</i>	2012	Gamaleira de Goiás	GO	hA
Cerrado	4900D	<i>Bos taurus</i>	2012	Gamaleira de Goiás	GO	hA
Cerrado	6139A	<i>Equus caballus</i>	2014	Minaçu	GO	hA
Cerrado	6139B	<i>Equus caballus</i>	2014	Minaçu	GO	hA
Cerrado	8764A	<i>Bos taurus</i>	2018	Bom Despacho	MG	hA
Cerrado	8764B	<i>Bos taurus</i>	2018	Bom Despacho	MG	hA
Cerrado	8790B	<i>Bos taurus</i>	2018	Altair	SP	hA
					Subtotal	9
Mata Atântica	3765A	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hA
Mata Atântica	3767B	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hA
Mata Atântica	3819C	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hA
Mata Atântica	4003	<i>Bos taurus</i>	2012	Nova Venécia	ES	hA
Mata Atântica	4004B	<i>Bos taurus</i>	2012	Nova Venécia	ES	hA
Mata Atântica	4008	Ambiente	2012	Nova Venécia	ES	hA
Mata Atântica	4009A	Ambiente	2012	Nova Venécia	ES	hA
Mata Atântica	4010B	Ambiente	2012	Nova Venécia	ES	hA
Mata Atântica	4107A	<i>Bos taurus</i>	2012	Mulungu	CE	hA
Mata Atântica	4108A	<i>Bos taurus</i>	2012	Mulungu	CE	hA
Mata Atântica	4118	<i>Bos taurus</i>	2012	Mulungu	CE	hA
Mata Atântica	4119A	<i>Bos taurus</i>	2012	Mulungu	CE	hA
Mata Atântica	4133B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4134A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4135A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4136	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4137A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4137B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4140A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4140B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4142A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4143A	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4143B	<i>Bos taurus</i>	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4149A	Ambiente	2012	Juiz de Fora	MG	hA
Mata Atântica	4580B	<i>Bos taurus</i>	2012	Rio de Janeiro	RJ	hA
Mata Atântica	4580C	<i>Bos taurus</i>	2012	Rio de Janeiro	RJ	hA
Mata Atântica	4585F	<i>Equus caballus</i>	2012	Rio de Janeiro	RJ	hA
Mata Atântica	4952B	<i>Bos taurus</i>	2012	Resende	RJ	hA
Mata Atântica	4961A	<i>Canis familiaris</i>	2014	Porto Rico	PR	hA
Mata Atântica	4965A	<i>Bos taurus</i>	2014	Aratuba	CE	hA
Mata Atântica	4970D	<i>Bos taurus</i>	2014	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	5847F	<i>Canis familiaris</i>	2014	Belford Roxo	RJ	hA
Mata Atântica	6017C	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6017D	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6018A	Ambiente	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6019B	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA

Continua

Continuação

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Mata Atlântica	6019C	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atlântica	6019D	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atlântica	6021A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
					Subtotal	39
Mata Atlântica - Caatinga	6050A	<i>Equus caballus</i>	2014	Natal	RN	hA
Mata Atlântica - Caatinga	6063A	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atlântica - Caatinga	6063B	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
					Subtotal	3
					Total de Haplótipo hA	52

*Ano da coleta; UF: Unidades Federativas; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; Conclusão
 MG: Minas Gerais; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; SP: São Paulo.

APÊNDICE F. Distribuição dos haplótipos do gene Citocromo Oxidase subunidade I (COX-I) identificados nas populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Haplótipo hI						
Amazônia	5464F	<i>Equus caballus</i>	2014	Porto velho	RO	hI
Amazônia	5759C	<i>Equus caballus</i>	2014	Porto velho	RO	hI
Amazônia	5763A	<i>Equus asinus</i>	2014	Porto velho	RO	hI
Amazônia	5764F	<i>Equus caballus</i>	2014	Porto velho	RO	hI
Amazônia	5764H	<i>Equus caballus</i>	2014	Porto velho	RO	hI
Amazônia	6091B	<i>Equus caballus</i>	2014	Cantá	RR	hI
Amazônia	6091C	<i>Equus caballus</i>	2014	Cantá	RR	hI
Amazônia	6091D	<i>Equus caballus</i>	2014	Cantá	RR	hI
					Subtotal	8
Cerrado	4163B	Ambiente - Mata ciliar	2012	Pedro Leopoldo	MG	hI
Cerrado	6116B	<i>Equus caballus</i>	2014	Cavalcante	GO	hI
Cerrado	6141B	<i>Equus caballus</i>	2014	Minaçu	GO	hI
					Subtotal	3
Mata Atântica	3755C	<i>Bos taurus</i>	2012	Aratuba	CE	hI
Mata Atântica	4410B	<i>Bos taurus</i>	2013	São José	SC	hI
Mata Atântica	4410C	<i>Bos taurus</i>	2013	São José	SC	hI
Mata Atântica	5792A	<i>Equus caballus</i>	2014	Paraíba do Sul	RJ	hI
Mata Atântica	5793A	<i>Equus caballus</i>	2014	Paraíba do Sul	RJ	hI
Mata Atântica	5793B	<i>Equus caballus</i>	2014	Paraíba do Sul	RJ	hI
Mata Atântica	5793C	<i>Equus caballus</i>	2014	Paraíba do Sul	RJ	hI
Mata Atântica	5793D	<i>Equus caballus</i>	2014	Paraíba do Sul	RJ	hI
Mata Atântica	6010B	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hI
Mata Atântica	6012C	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hI
Mata Atântica	6012D	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hI
Mata Atântica	6013A	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hI
Mata Atântica	6013C	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hI
Mata Atântica	6181F	<i>Equus caballus</i>	2014	Paracambi	RJ	hI
Mata Atântica	6420B	<i>Equus caballus</i>	2015	São Carlos do Avai	PR	hI
Mata Atântica	6558I2	<i>Equus caballus</i>	2015	Ibatiba	ES	hI
Mata Atântica	6558K2	<i>Equus caballus</i>	2015	Ibatiba	ES	hI
Mata Atântica	6558M2	<i>Equus caballus</i>	2015	Ibatiba	ES	hI
Mata Atântica	6561A	<i>Equus caballus</i>	2015	Ibatiba	ES	hI
Mata Atântica	6561B	<i>Equus caballus</i>	2015	Ibatiba	ES	hI
Mata Atântica	6561C	<i>Equus caballus</i>	2015	Ibatiba	ES	hI
Mata Atântica	8891P	<i>Equus caballus</i>	2018	Valença	BA	hI
Mata Atântica	8891Q	<i>Equus caballus</i>	2018	Valença	BA	hI
					Subtotal	23
					Total de Haplótipo hI	34
Haplótipo hII						
Amazônia	7627C	<i>Equus caballus</i>	2015	São Luís	MA	hII
					Subtotal	1
Mata Atântica	4977A	<i>Equus asinus</i>	2014	Aratuba	CE	hII
Mata Atântica	4977B	<i>Equus asinus</i>	2014	Aratuba	CE	hII
Mata Atântica	4977D	<i>Equus asinus</i>	2014	Aratuba	CE	hII
Mata Atântica	6010D	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hII
Mata Atântica	6011A	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hII

Continua

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Mata Atântica	8891R	<i>Equus caballus</i>	2018	Valença	BA	hII
Mata Atântica	8891S	<i>Equus caballus</i>	2018	Valença	BA	hII
Subtotal						7
Mata Atântica - Caatinga	6041	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6043A	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6043B	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6043C	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6044A	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6044B	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6044C	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6045A	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6045C	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6046A	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6046E	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6047A	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6047B	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6047C	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6048B	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6049C	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6049D	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6049E	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6050B	<i>Equus caballus</i>	2014	Natal	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6051A	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6051B	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6051C	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6051D	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6051E	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6053C	<i>Equus asinus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6053D	<i>Equus asinus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6056A	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6056B	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6056C	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6057A	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Mata Atântica - Caatinga	6057B	<i>Bos taurus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hII
Subtotal						31
Total de Haplótipo hII						39
Haplótipo hIII						
Mata Atântica	6013B	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hIII
Subtotal						1
Total de Haplótipo hIII						1

*Ano da coleta; UF: Unidades Federativas; BA: Bahia; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; Conclusão
GO: Goiás; MA: Maranhão; MG: Minas Gerais; PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte;
RO: Rondônia; RR: Roraima, SC: Santa Catarina.

APÊNDICE G. Distribuição dos haplótipos da região *D-loop* identificados nas populações de *Dermacentor (Anocentor) nitens* Neumann, 1897 coletadas parasitando hospedeiros vertebrados e livres no ambiente, durante investigação de foco e vigilância ambiental de Febre Maculosa no Brasil, no período de 2011 a 2019

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Haplótipo hA						
Amazônia	6091A	<i>Equus caballus</i>	2014	Cantá	RR	hA
Amazônia	6091B	<i>Equus caballus</i>	2014	Cantá	RR	hA
Amazônia	6091C	<i>Equus caballus</i>	2014	Cantá	RR	hA
Amazônia	6091D	<i>Equus caballus</i>	2014	Cantá	RR	hA
Subtotal						4
Cerrado	4442B	<i>Equus caballus</i>	2013	Goiania	GO	hA
Cerrado	6116B	<i>Equus caballus</i>	2014	Cavalcante	GO	hA
Cerrado	6116D	<i>Equus caballus</i>	2015	Cavalcante	GO	hA
Cerrado	6117A	<i>Equus caballus</i>	2015	Cavalcante	GO	hA
Cerrado	6138A	<i>Bos taurus</i>	2015	Joviânia	GO	hA
Cerrado	6141B	<i>Equus caballus</i>	2014	Minaçú	GO	hA
Cerrado	6141F	<i>Equus caballus</i>	2015	Minaçú	GO	hA
Cerrado	6141G	<i>Equus caballus</i>	2016	Minaçú	GO	hA
Subtotal						8
Mata Atântica	3531B	<i>Equus caballus</i>	2011	Guaramiranga	CE	hA
Mata Atântica	3539L	<i>Equus caballus</i>	2011	Guaramiranga	CE	hA
Mata Atântica	3639F	<i>Equus caballus</i>	2011	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3639H	<i>Equus caballus</i>	2011	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3639M	<i>Equus caballus</i>	2011	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3707B	<i>Equus caballus</i>	2012	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3707D	<i>Equus caballus</i>	2012	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3707E	<i>Equus caballus</i>	2012	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3707F	<i>Equus caballus</i>	2012	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3707G	<i>Equus caballus</i>	2012	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3707H	<i>Equus caballus</i>	2012	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3708C	<i>Equus caballus</i>	2012	Capistrano	CE	hA
Mata Atântica	3792A	<i>Equus caballus</i>	2012	Aratuba	CE	hA
Mata Atântica	3792B	<i>Equus caballus</i>	2012	Aratuba	CE	hA
Mata Atântica	3792C	<i>Equus caballus</i>	2012	Aratuba	CE	hA
Mata Atântica	4098A	<i>Equus caballus</i>	2013	Mulungu	CE	hA
Mata Atântica	6011A	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6011D	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6012C	<i>Equus caballus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6018A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6019B	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6019C	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6019D	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6020A	<i>Bos taurus</i>	2014	Saquarema	RJ	hA
Mata Atântica	6181F	<i>Equus caballus</i>	2014	Paracambi	RJ	hA
Mata Atântica	6420A	<i>Equus caballus</i>	2015	São Carlos do Avaí	PR	hA
Mata Atântica	6420B	<i>Equus caballus</i>	2015	São Carlos do Avaí	PR	hA
Mata Atântica	6430B	<i>Bos taurus</i>	2015	Querência do Norte	PR	hA
Mata Atântica	6552M	Ambiente	2014	Guaçuí	ES	hA
Mata Atântica	6552M_2	Ambiente	2014	Guaçuí	ES	hA
Mata Atântica	6552R	Ambiente	2014	Guaçuí	ES	hA
Mata Atântica	6552R_2	Ambiente	2014	Guaçuí	ES	hA
Mata Atântica	6558B2	<i>Equus caballus</i>	2014	Ibatiba	ES	hA
Mata Atântica	6558I2	<i>Equus caballus</i>	2014	Ibatiba	ES	hA

Continua

Bioma	Amostra	Hospedeiro	Ano*	Município	UF	Haplótipo
Mata Atântica	6558K2	<i>Equus caballus</i>	2014	Ibatiba	ES	hA
Mata Atântica	6558K2_2	<i>Equus caballus</i>	2014	Ibatiba	ES	hA
Mata Atântica	6558M2	<i>Equus caballus</i>	2014	Ibatiba	ES	hA
Mata Atântica	6558M2_2	<i>Equus caballus</i>	2014	Ibatiba	ES	hA
Mata Atântica	6561B	<i>Equus caballus</i>	2014	Ibatiba	ES	hA
Mata Atântica	6561B_2	<i>Equus caballus</i>	2014	Ibatiba	ES	hA
Subtotal						40
Mata Atântica - Caatinga	6043A	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6049E	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6051D	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6053A	<i>Equus asinus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6056A	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6056A_2	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6057A	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6057A_2	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6057B	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6057B_2	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6057C	<i>Equus caballus</i>	2014	São Gonçalo do Amarante	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6061B	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6061C	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6061C_2	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hA
Mata Atântica - Caatinga	6061D	<i>Equus asinus</i>	2014	Natal	RN	hA
Subtotal						15
Total de Haplótipo hA						67
Haplótipo hB						
Mata Atântica	4349A	<i>Equus caballus</i>	2013	Porto Real	RJ	hB
Mata Atântica	4349B	<i>Equus caballus</i>	2013	Porto Real	RJ	hB
Mata Atântica	4349C	<i>Equus caballus</i>	2013	Porto Real	RJ	hB
Mata Atântica	4349D	<i>Equus caballus</i>	2013	Porto Real	RJ	hB
Mata Atântica	4349E	<i>Equus caballus</i>	2013	Porto Real	RJ	hB
Subtotal						5
Total de Haplótipo hB						5

*Ano da coleta; UF: Unidades Federativas; CE: Ceará; ES: Espírito Santo; GO: Goiás; Conclusão

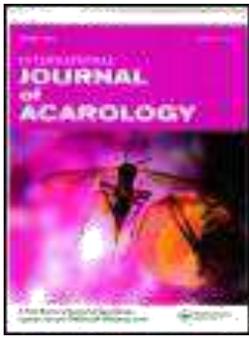
PR: Paraná; RJ: Rio de Janeiro; RN: Rio Grande do Norte; RR: Roraima.

ANEXOS

ANEXO A. ARTIGO PUBLICADO

Tayra P. Sato, Nicole O. Moura-Martiniano, Vinicius F. Vizzoni, Arannadia B. Silva, Stefan V. Oliveira, Marinete Amorim, Gilberto S. Gazêta. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: *Rickettsiae* infection in Brazil. *International Journal of Acarology*, DOI: 10.1080/01647954.2020.1720289.

Neste estudo, analisamos a infecção de *Rickettsia* sp. em *Rhipicephalus microplus* e os possíveis papéis dessa espécie de carrapato na manutenção e circulação de *Rickettsia* sp. em áreas endêmicas do FM. Amostras de carrapatos foram naturalmente infectadas com *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *R. tamurae*, *R. rhipicephali* e *R. bellii*. Os dados deste estudo demonstram que *R. microplus* adquire infecção por *Rickettsia*, incluindo espécies patogênicas, e indica esse carrapato como marcador sugerido de presença ou circulação potencial de riquetsia.



Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Rickettsiae infection in Brazil

Tayra P. Sato, Nicole O. Moura-Martinião, Vinicius F. Vizzoni, Arannadia B. Silva, Stefan V. Oliveira, Marinete Amorim & Gilberto S. Gazêta

To cite this article: Tayra P. Sato, Nicole O. Moura-Martinião, Vinicius F. Vizzoni, Arannadia B. Silva, Stefan V. Oliveira, Marinete Amorim & Gilberto S. Gazêta (2020): *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Rickettsiae infection in Brazil, International Journal of Acarology, DOI: [10.1080/01647954.2020.1720289](https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1720289)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/01647954.2020.1720289>

 View supplementary material 

 Published online: 02 Feb 2020.

 Submit your article to this journal 

 View related articles 

 View Crossmark data 



Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Rickettsiae infection in Brazil

Tayra P. Sato^{a,b}, Nicole O. Moura-Martiniano^a, Vinicius F. Vizzoni^a, Arannadia B. Silva^c, Stefan V. Oliveira^d, Marinete Amorim^a and Gilberto S. Gazêta^a

^aLaboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil; ^bPrograma de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Brazil; ^cDepartamento de Enfermagem, Universidade Ceuma, Imperatriz, Brazil; ^dFaculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Brazil

ABSTRACT

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* has been considered a major pest of cattle in tropical regions of the world, inducing significant economic impact on livestock activity. In Brazil, the scenarios of Spotted Fever (SF) epidemic cycles involve *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum*, transmitting *Rickettsia rickettsii*, as well as *Amblyomma ovale*, transmitting *R. parkeri* strain Atlantic Rainforest. However, other potentially pathogenic species of *Rickettsia*, as well as new species of ticks with vector potential, have been reported for Brazil. Thus, during SF focus investigation and environmental surveillance performed by Brazilian National Network of Environment Surveillance for Tick-borne Diseases between 2011 to 2017, ectoparasites were collected from vertebrate hosts and the environment in rural and urban areas of different Brazilian biomes. Here we analysed Rickettsiae infection in *Rh. microplus* and possible roles of this tick species in the maintenance and circulation of *Rickettsia* sp. in SF endemic areas. Cattle tick samples were naturally infected with *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. felis*, *R. tamurae*, *R. rhipicephali* and *R. bellii*. The data in this study demonstrate that *Rh. microplus* acquires *Rickettsia* infection, including pathogenic species, and indicates this tick as suggested marker of Rickettsiae potential presence or circulation.

ARTICLE HISTORY

Received 17 September
2019 Accepted 14 January
2020 Published online 3
February 2020

KEYWORDS

Tick-borne pathogen; cattle tick; enzootic cycle; rickettsiosis; Brazil

Introduction

Rhipicephalus (Boophilus) microplus, also known as the cattle tick, has a broad geographic distribution, being found mainly in tropical and subtropical regions (Estrada-Peña et al. 2006). Although *Rh. microplus* demonstrates a high degree of host-specificity and requires only one host to complete its lifecycle (on which it performs all the blood meals), *Rh. microplus* can parasitize alternative hosts, including humans (Soares et al. 2007).

The main importance of *Rh. microplus* is related to its significant economic impact on livestock. In Brazil, the cattle tick is distributed throughout the country and it is estimated that 80% of the national cattle herd is infested, causing an economic loss of three billion dollars a year. Under such circumstances, direct spillover and the participation in the epizootic cycle of different pathogens (e.g. *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *Anaplasma marginale*) are the main ways in which these ticks interact with disease development and deleterious influence on domestic bovines (Peter et al. 2005; de la Fuente et al. 2008; Grisi et al. 2014).

Due to its wide distribution in the country, *Rh. microplus* is found in Spotted Fever (SF) endemic regions. However, even though it has been reported as being infected by different species of Spotted Fever Group Rickettsiae (SFGR) (Bermúdez et al. 2009; Moura-Martiniano et al. 2014; Pesquera et al. 2015), the involvement of this tick in transmitting these bacteria remains incipient (Cordeiro et al. 2018).

In Brazil, known SF epidemic cycle scenarios involve *Amblyomma sculptum* and *A. aureolatum* transmitting *R. rickettsii*, and *A. ovale* transmitting *R. parkeri* strain Atlantic Rainforest (Szabó et al. 2013; Oliveira et al. 2016a; Nieri-Bastos et al. 2018). However, SF human cases recorded in new outbreaks in Brazil indicate clinical profiles that differ from those already established. Without already recognized vectors or detection of *Rickettsia* in these vectors, it is difficult to characterize the bioagent circulation mechanism involved in such

outbreaks (e.g. Oliveira et al. 2016a, 2016b, 2017, 2018). In addition, in recent decades, other potentially pathogenic species of Rickettsia, as well as new species of ticks with vector potential, have been reported from Brazil (e.g. Labruna et al. 2011; Nieri-Bastos et al. 2014; Nunes et al. 2015; Moerbeck et al. 2016; Weck et al. 2016; Silva et al. 2017a, 2018), indicating SF cycle complexity and the existence of various distinct ecoepidemiological scenarios within the national territory. Furthermore, doubts still remain concerning the role of *Rh. microplus* in Rickettsiae circulation.

Here, we aim to investigate and molecularly characterize the presence of *Rickettsia* sp. in *Rh. microplus* specimens from areas of different ecological features in Brazil.

Materials and methods

During SF focus investigation and environmental surveillance performed between 2011 to 2017, State and Municipal Health Secretaries collected ectoparasites from vertebrate hosts and the environment (Figure 1) in rural and urban areas (pasture, farms and river bank) across a variety of Brazilian regions (Supplementary Table 1).

After morphological identification of 7,418 specimens of *Rh. microplus* (Aragão and Fonseca 1961; Marquez et al. 1992; Barros-Battesti et al. 2006), a total of 801 specimens were analysed individually (nymph and adults ticks) or by pools of 10 larvae, comprising 620 samples.

These samples were initially snap-frozen in liquid nitrogen for genomic DNA (DNAg) extraction, performed following the saturated saline solution protocol (Aljanabi and Martinez 1997), quantified by spectrophotometry (NanoDrop™ 2000, Thermo Scientific™) and used as template for PCR screenings for rickettsial genes *gltA* (CS-78/CS-323, Labruna et al. 2004a), *ompA* (Rr19O.70p/Rr19O.602n, Regnery et al. 1991), *sca4* (D1738F/D2482R, Sekeyova et al. 2001).

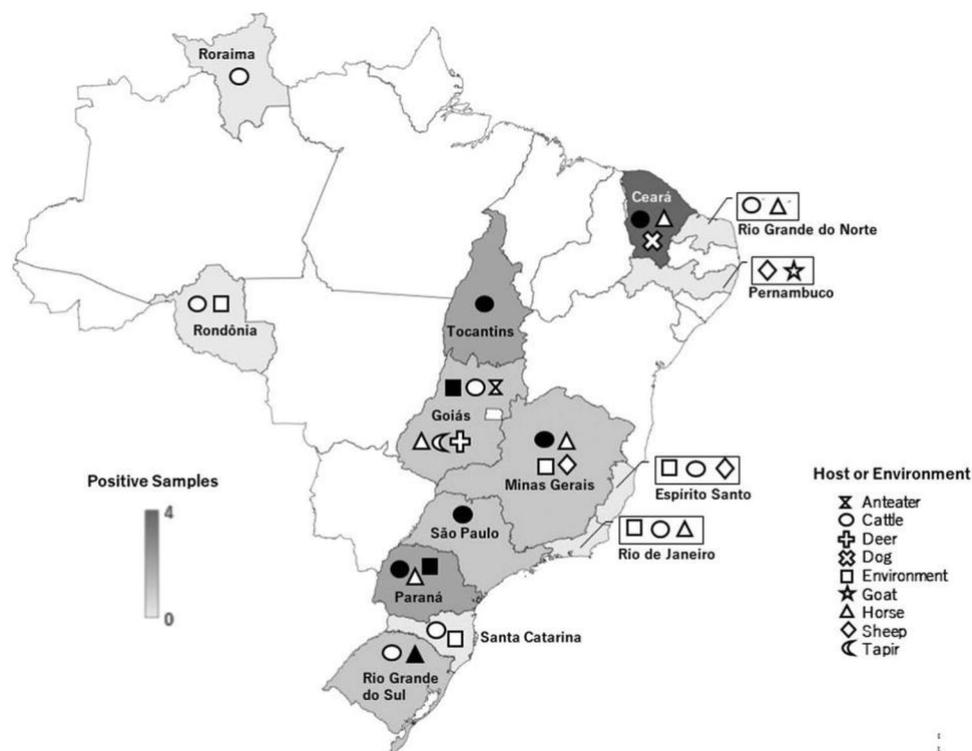


Figure 1. Geographical distribution and host/environment of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* specimens collected by federative unit and Rickettsiae-positive samples, during Spotted Fever focus investigation and environmental surveillance performed in Brazil from 2011 to 2017. White filled forms indicate host or environment from tick collected and black filled forms indicate host or environment from PCR-positive tick samples.

htrA (17k-3/17k-5, Labruna et al. 2004b) and *ompB* (120.M59/ 120.807, Roux and Raoult 2000), as well as mitochondrial cytochrome oxidase I (COI) gene (COX-1.2F/COX-1.2R, Csordas et al. 2016) and 12S ribosomal DNA (T1B/T2A, Beati and Keirans 2001) tick molecular markers. Analyses included DNA-free reactions as negative controls and 300 ng of *R. rickettsii* DNAg as positive controls of rickettsial amplification reactions. Amplified DNA products were electrophoresed through a 2% agarose gel, stained with ethidium bromide, and examined by UV transillumination.

PCR products of the expected size were purified using Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega™), sequenced applying the BigDye™ Terminator–Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Applied Biosystems™) and analysed in an automated ABI 3730xl DNA analy-ser (Applied Biosystems™). DNA sequences were edited with ChromasPro 1.5 software (Technelysium Pty Ltd), with identity values obtained by BLAST analysis (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>). A Maximum-Likelihood tree was inferred using PhyML 3.0 online software (Guindon et al. 2010) with GTR+G correction model, selected by Smart Model Selection (Lefor et al. 2017). The reliability of the tree topology was evaluated via bootstrap support (1000 repeats).

Results

A total of 12 *Rh. microplus* samples collected from horses, cattle and the environment were positive for rickettsial genes (Figure 1). BLAST analysis of the obtained sequences revealed high nucleotide-identity rates with *R. rickettsii* (MH194350, MH194352), *R. belli* (MH194351), *R. parkeri* strain Atlantic rainforest (MK720994, MK720995, MH194354, MH194355, MH194358), *R. felis* (MK720997, MH194353, MH194356, MH194360), *R. rhipicephali* (MK720996, MK720998) and *R. tamurae* (MK720993), totalling 15 obtained sequences (Table 1).

To confirm tick identification, we analysed the sequences of 12S rDNA (MN081899) and COI genes (MN088852) amplified from randomly chosen adult (sample code LIC 3764A) and pooled larval samples (sample code LIC 7156), and BLAST analysis revealed 100% identity sequences (380/380 for 12S and 645/645 for COI)

with sequences of *Rh. microplus* (KP143546 and KC503261) deposited in GenBank.

In addition, phylogenetic inferences were performed with concatenated sequences of *gltA*, *ompA*, *ompB*, *htrA* and *sca4* genes, using sequences corresponding to a sample of each Rickettsiae identity, and the resulting tree grouped: sequences from Ceará State with *R. rickettsia*, *R. tamurae* and *R. belli* clusters; sequences from São Paulo State with *R. rhipicephali* cluster; sequences from Paraná State with *R. parkeri* strain Atlantic rainforest (identified in Barbieri et al. 2014 as strain Aa46) cluster; and sequences from Rio Grande do Sul State with *R. felis* cluster (Figure 2).

Due to the obtained sequence sizes, bootstrap values were low in some tree clusters, indicating similar portions in analysed species fragments. However, the observed BLAST values mostly showed 100% overlap with the respective Rickettsiae sequence, and of the total sequences, one *ompB* sequence showed 98% similarity with *R. felis* and two *gltA* sequences showed 99% similarity with *R. rhipicephali* and with *R. bellii* (Table 1).

Discussion

Studies to date have detected *Rh. microplus* infected with *R. amblyommatidis* in Panama (Eremeeva et al. 2009), *Rickettsia* sp. strain Columbianense in Colombia (Miranda et al. 2012), *Rickettsia* sp. strain 12G1 in Ecuador (Pesquera et al. 2015), and *R. rickettsii* in Brazil (Moura-Martinião et al. 2014). Our results show for the first time, sequences genetically related to *R. tamurae*, *R. rhipicephali*, *R. parkeri*, *R. felis* and *R. bellii* in *Rh. microplus* and also sequences closely related to *R. rickettsii* in *Rh. microplus* for the first time in Ceará state, northeastern Brazil.

The Columbianense and 12G1 Rickettsiae strains are genetically related to *R. tamurae*, as well as other strains recorded in Brazil: e.g. strain Pampulha from Minas Gerais state (Guedes et al. 2011; Szabó et al. 2013), strain Serra dos Órgãos from Rio de Janeiro state (Spolidorio et al. 2012), and strain Aragoi from Paraná State (Blanco et al. 2016). Although there is evidence of this *Rickettsia* occurring in different areas of Brazil and in different vector species,

Table 1. Species of Rickettsiae detected by analysis of *gltA*, *ompA*, *ompB*, *htrA* and *sca4* nucleotide sequences in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected in hosts and environment, during Spotted Fever focus investigation and environment surveillance performed in Brazil from 2011 to 2017.

Region	State	Municipality	Host/ environment	Sample code/ specimen	Gene	Accession number	Identities ^a Identical residues/aligned residues – acces- sion Number
North	Tocantins	Palmas	<i>Bos taurus</i>	LIC7001B/1F	<i>gltA</i>	MK720994	<i>Rickettsia parkeri</i> , 350/350 (100%) – MH160728
		Palmas	<i>Bos taurus</i>	LIC7001E/1F	<i>gltA</i>	MK720995	<i>Rickettsia parkeri</i> , 350/350 (100%) – MH160728
Northeast	Ceará	Aratuba	<i>Bos taurus</i>	LIC3764A/1M	<i>gltA</i>	MH194351	<i>Rickettsia bellii</i> , 349/350 (99%) – MG550957
		Baturité	<i>Bos taurus</i>	LIC3528B/1F	<i>gltA</i>	MH194350	<i>Rickettsia rickettsii</i> , 350/350 (100%) – MF988097
		Baturité	<i>Bos taurus</i>	LIC4523A/1M	<i>gltA</i>	MH194352	<i>Rickettsia rickettsii</i> , 350/350 (100%) – JN252696
		Capistrano	<i>Bos taurus</i>	LIC4970B/1F	<i>gltA</i>	MK720993	<i>Rickettsia tamurae</i> 786/786 (100%) – MH158234
Central-West	Goiás	Itumbiara	Environment	LIC8928G/10L	<i>gltA</i>	MK720997	<i>Rickettsia felis</i> , 350/350(100%) – MG952933
Southeast	Minas Gerais	Tiros	<i>Bos taurus</i>	LIC8786E/1F	<i>gltA</i>	MK720996	<i>Rickettsia rhipicephali</i> 349/350 (99%) – KX434745
	São Paulo	Altair	<i>Bos taurus</i>	LIC8790D/1F	<i>gltA</i>	MK720998	<i>Rickettsia rhipicephali</i> 350/350 (100%) – KX434745
South	Paraná	Senges	Environment	LIC7156/10L	<i>ompB</i>	MH194360	<i>Rickettsia felis</i> , 619/630 (98%) – KX090276
		Pato	<i>Bos taurus</i>	LIC8514C/1N	<i>gltA</i>	MH194354	<i>Rickettsia parkeri</i> , 350/350 (100%) – MF536974
		Bragado	<i>Bos taurus</i>	LIC8514C/1N	<i>ompA</i>	MH194358	<i>Rickettsia parkeri</i> , 491/491 (100%) – MF536975
	Rio Grande do Sul	Osório	<i>Equus caballus</i>	LIC5552C/1M	<i>gltA</i>	MH194353	<i>Rickettsia felis</i> , 350/350 (100%) – KY172878
					<i>htrA</i>	MH194356	<i>Rickettsia felis</i> , 499/499 (100%) – CP000053

M = male, F = female, N = nymph, L = larvae. ^aIdentities with *Rickettsia* sequences of GenBank.

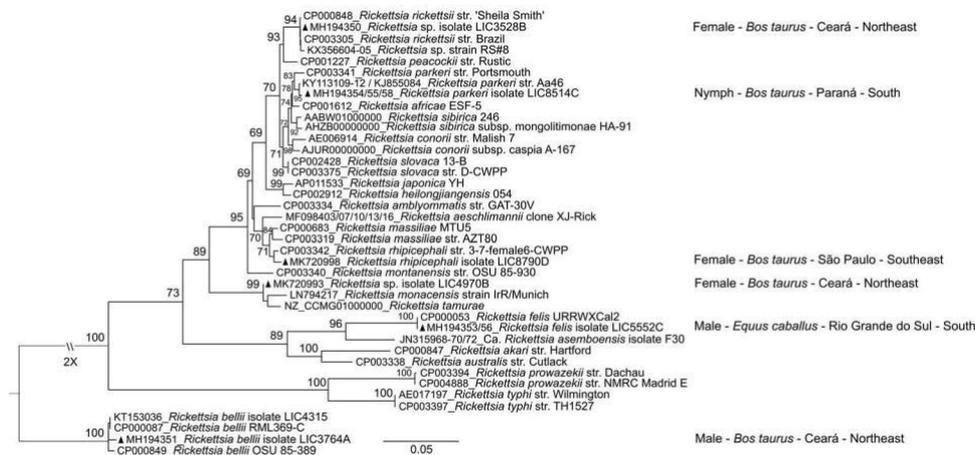


Figure 2. Phylogenetic inferences by Maximum-Likelihood method from 1,000 replicated trees based on concatenated nucleotide sequence of rickettsiae *gltA*, *ompA*, *ompB*, *htrA* and *sca4* genes. Evolutionary distances were estimated by GTR+G model. Bootstrap values >70% are shown. GenBank accession numbers precede the sequence names, sequences obtained from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* samples are highlighted with black triangle with developmental stage, host and State. Scale bar indicates nucleotide substitutions per site.

the mechanism by which cattle ticks are infected by this bacterium is still unknown.

R. rhipicephali is commonly reported in *Rhipicephalus sanguineus*, with sporadic encounters in species of *Dermacentor* in the United States (Wiksw et al. 2008). In Brazil, it was detected in the tick *Amblyomma* sp. from Minas Gerais state (Zeringóta et al. 2016), and also in *Haemaphysalis juxtakochi* from Rondônia, São Paulo and Mato Grosso states (Labruna et al. 2005, 2007; Soares et al. 2015). Although *H. juxtakochi* displays an affinity for cervid hosts, it has been reported parasitizing a variety of other vertebrate species (Guimarães et al. 2001; Guglielmone et al. 2014), including domestic dogs and humans (Labruna et al. 2005). Demonstrating the proximity of *H. juxtakochi* to anthropic areas, allowing a possible *Rh. microplus* acquisition of *Rickettsia* by co-feeding on the vertebrate hosts. Therefore, *Rh. microplus* infection by *R. rhipicephali* may not be as random depending on the area.

Another possibility for introduction of *R. rhipicephali* into a local tick population is by migrating birds, which serve as hosts for a variety of tick species (Ogrzewalska et al. 2010; Luz et al. 2017) and potential vectors for pathogens, including *Rickettsia* (Ogrzewalska and Pinter 2016). It is known that birds play an

important role as carriers of parasites over long distances, including across geographic barriers. An infected tick inserted by birds in a population of otherwise uninfected ticks can transmit pathogens by co-feeding on a new host. However, further studies are needed to understand this form of *Rickettsia* circulation within Brazil and throughout its host range.

As discussed for *R. rhipicephali*, bird ticks represent a valuable resource for understanding the bioecology of these tick-borne pathogens. In Brazil, the potential role of birds in dispersing of *A. ovale* infected with *R. parkeri* was suggested (Luz et al. 2017), and results obtained here show a novel occurrence area for this bacterium. The samples LIC7001B and LIC7001E (Table 1) are *Rh. microplus* ticks collected feeding on cattle from a Cerrado biome area of Tocantins state, Northern region of the country, evidencing different eco-epidemiological characteristics of the pattern usually observed for *R. parkeri* in the country.

In several regions of the Americas, *R. parkeri* is reported as an inducer of a mild SF clinical form (Parola et al. 2013). In Brazil, *R. parkeri* occurs in multiple regions, being involved in SF human cases in southern, southeastern and northeastern states (Szabó et al. 2013; Oliveira et al. 2016a; Faccini-Martínez et al. 2018), and

in an enzootic cycle associated with *A. ovale* and dogs (Szabó et al. 2013; Moerbeck et al. 2016; Vizzoni et al. 2016; Acosta et al. 2018). The capacity of *Rh. microplus* to transmit *R. parkeri* is experimentally inconclusive (Cordeiro et al. 2018) and, considering the ecological scenario of this bioagent's cycle, may have no epidemiological importance.

Cattle tick acquisition of pathogenic *Rickettsia* may also occur by a co-feeding process, already established for Rickettsiae (Socolovschi et al. 2009). *Rickettsia parkeri* has been reported from *Amblyomma triste*, an Ixodid tick with the capacity to parasitize several vertebrates, including cervids and bovines (Labruna et al. 2003; Mertins et al. 2010), host species that share the same environments, allowing infection of *Rh. microplus* by *R. parkeri*.

Additionally, here we also report for the first time *R. felis* in cattle ticks, a bacterium with wide geographical distribution, including all Brazilian regions (Horta et al. 2014). However, besides being detected in various species of blood-feeding arthropods, the majority of reports are associated with the flea genus *Ctenocephalides* (Reif and Macaluso 2009; Parola 2011; Mediannikov et al. 2012), common worldwide as ectoparasites of various carnivores, especially dogs. Thus, this Rickettsiae detection in other species of dog ectoparasites seems not to be uncommon (Gehrke et al. 2009; Parola et al. 2013). However, reports, from various states of Brazil of its presence in *Rh. microplus* (Table 1) are important, especially considering that cattle ticks do not commonly parasitize carnivores. The specimens found in this study infected with *R. felis* were collected from cattle, horses and the environment (pasture), without evidence of the infection mechanisms.

Other sequences from Ceará state, northeastern Brazilian, were identified as *R. rickettsii* and *R. bellii*. The samples infected by *R. rickettsii* were collected in Maciço do Baturité, an SF endemic area (Moerbeck et al. 2016), with high-altitude forest, with conditions of high humidity and mild temperature conditions within the otherwise semiarid climate of the Caatinga biome. Although SF cases reported in the region were associated with *R. parkeri* (= *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest) transmitted by *A. ovale* (Moerbeck et al. 2016), and despite having no reports of SF cases clinically associated with *R. rickettsii*, this species was also isolated from *Rh. sanguineus* collected on a dog from Maciço do Baturité (Silva et al. 2017b). Together with the results here obtained, this detection indicates the circulation of *R. rickettsii* in the region, and in a variety of tick species. Thus, due to the public health importance of *R. rickettsii*, it is necessary to understand the enzootic cycle throughout the region, in order to understand the potential epi-demiological scenario and take preventive measures to prevent new occurrences of *R. rickettsii* SF in Brazil. In this context, *Rh. microplus* becomes even more important as an object of study, since its potential for *R. rickettsii* transmission has been experimentally demonstrated (Monteiro and Fonseca 1932).

Besides pathogenic Rickettsiae, the generally considered non-pathogenic *R. bellii* is a widely distributed species, having been detected from a great variety of hosts, indicating a broad circulation capacity (Labruna et al. 2004a; Tomassone et al. 2010; Parola et al. 2013) and possibly playing an important role in the ecology and epidemiology of other Rickettsiae species (Macaluso et al. 2002). The first record of this species in Maciço do Baturité was in an *A. nodosum* tick collected from a wild animal (Moerbeck et al. 2016). Here we presented the first report for Brazil of *R. bellii* detected in *Rh. microplus*, indicating the circulation of this bacterium throughout the studied region.

It is known that a primary infection with one species of *Rickettsia* would prevent transovarian transmission of a second *Rickettsia* species (Burgdorfer 1988; Macaluso et al. 2002). This was recently corroborated by an experimental study conducted with *A. dubitatum*, where primary *R. bellii* infection appeared to decrease the effectiveness of subsequent *R. rickettsii* transovarian transmission (Sakai et al. 2014).

Conclusion

In spite of the wide distribution of *R. microplus* throughout Brazil, because this species has rarely been reported on humans, the participation of the cattle tick in Rickettsiae enzootic and epidemic cycles remains unknown. The data from the current study demonstrate that *Rh. microplus* can naturally acquire *Rickettsia* infection, including infection with pathogenic species, and suggests that this tick could serve as an indicator of Rickettsiae presence or circulation.

Acknowledgments

The authors would like to thank to Brazilian Municipal and State Health Secretaries and Dr Márcia Prata (Embrapa Dairy Cattle) for helping with tick sampling; to Genomic Platform DNA Sequencing (PDTIS/Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil) for sequencing support; and to Dr Adrian Paul Ashton Barnett for the English review and comments on the manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Brazilian Ministry of Health [TC 149/2011].

References

- Acosta IC, Luz HR, Faccini-Martínez AA, Muñoz-Leal S, Cerutti C Jr, Labruna MB. 2018. First molecular detection of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in *Amblyomma ovale* ticks from Espírito Santo state, Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology*. 27:420–422.
- Aljanabi SM, Martinez I. 1997. Universal andrapidsalt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucleic Acids Research*. 15:4692–4693.
- Aragão HB, Fonseca F. 1961. Notas de Ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 59:115–129.
- Barbieri ARM, Moraes-Filho J, Nieri-Bastos FA, Souza Junior JC, SzaboMPJ, Labruna MB. 2014. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Dis*. 5:848–853.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. 2006. Carrapatos de importância médica veterinário da região Neotropical. Um guia ilustrado para identificação de espécies. *Modelos Biológicos*. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan.
- Beati L, Keirans JE. 2001. Analysis of the systematic relationships among ticks of the genera *Rhipicephalus* and *Boophilus* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 12S ribosomal DNA gene sequences and morphological characters. *Journal of Parasitology*. 87:32–48.
- Bermúdez SE, Eremeeva ME, Karpathy SE, Samudio F, Zambrano ML, Zaldivar Y, Motta JA, Dasch GA. 2009. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in eastern Panama. *Journal of Medical Entomology*. 46:856–861.
- Blanco CM, Teixeira BR, Silva AG, Oliveira RC, Strecht L, Ogrzewalska M. 2016. Microorganisms in ticks (Acari: Ixodidae) collected on marsupials and rodents from Santa Catarina, Paraná and Mato Grosso do Sul States, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 8:90–98.
- Burgdorfer W. 1988. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: Walker DH, editor. *Biology of rickettsial diseases*. Boca Raton (FL): CRC; p. 33–50.

- Cordeiro MD, Baêta BA, Cepeda PB, Teixeira RC, Ribeiro CCDU, de Almeida Valim JR, Pinter A, da Fonseca AH. 2018. Experimental infection of *Rickettsia parkeri* in the *Rhipicephalus microplus* tick. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 9:93–96.
- Csordas BG, Garcia MV, Cunha RC, Giachetto PF, Blecha IMZ, Andreotti R. 2016. New insight from molecular characterization of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in Brazil. *Revista Brasileira De Parasitologia Veterinária*. 25:317–326.
- de la Fuente J, Estrada-Peña A, Venzal JM, Kocan KM, Sonenshine DE. 2008. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in Bioscience : a Journal and Virtual Library*. 13:6938–6946.
- Eremeeva ME, Karpathy SE, Levin ML, Caballero CM, Bermudez S, Dasch GA, Motta JA. 2009. Spotted fever rickettsiae, Ehrlichia and Anaplasma, in ticks from peridomestic environments in Panama. *Clinical Microbiology and Infection*. 15:12–14.
- Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Guglielmone A, Horak I, Jongejan F, Latif A, Pegram R, Walker AR. 2006. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental & Applied Acarology*. 38:219–235.
- Faccini-Martínez AA, Oliveira SV, Junior CC, Labruna MB. 2018. *Rickettsia parkeri* spotted fever in Brazil: epidemiological surveillance, diagnosis and treatment. *Journal of Health & Biological Sciences*. 6:299–312.
- Gehrke FS, Gazeta GS, Souza ER, Ribeiro A, Marrelli MTT, Schumaker TTS. 2009. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro/Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*. 15:267–268.
- Grisi L, Leite RC, Martins JR, Barros AT, Andreotti R, Cançado PHD, Léon AAP, Pereira JB, Villela HS. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 23:150–156.
- Guedes E, Leite RC, Pacheco RC, Silveira I, Labruna MB. 2011. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 20:308–311.
- Guglielmone AA, Robbins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG. 2014. *The hard ticks of the world: (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. New York (NY): Springer.
- Guimarães JH, Tucci EC, Barros-Battesti DM. 2001. *Ectoparasitos de importância veterinária*. São Paulo: Plêiade.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. 59:307–321.
- Horta MC, Ogrzewalska M, Azevedo MC, Costa FB, Ferreira F, Labruna MB. 2014. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* from five geographic regions of Brasil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 91:96–100.
- Labruna MB, Camargo LM, Camargo EP, Walker DH. 2005. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia. *Revista Brasileiro De Parasitologia Veterinária*. 127:169–174.
- Labruna MB, Fugisaki EY, Pinter A, Duarte JMB, Szabó MJP. 2003. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Experimental & Applied Acarology*. 30:305–316.
- Labruna MB, Mattar VS, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G, Abarca K, Romero L, Sousa R, Oteo J, et al. 2011. *Rickettsioses* in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*. 16:2435–2457.
- Labruna MB, McBride JW, Bouyer DH, Camargo LMA, Camargo EP, Walker DH. 2004b. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 41:533–537.
- Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabó MP. 2007. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of Sao Paulo, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. 73:869–873.
- Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, Popov V, Gennari SM, Walker DH. 2004a. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*. 42:90–98.
- Lefort V, Longueville JE, Gascuel O. 2017. SMS: smart model selection in PhyML. *Molecular Biology and Evolution*. 34:2422–2424.
- Luz HR, Faccini JL, McIntosh D. 2017. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 8:657–665.
- Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF. 2002. *Rickettsial* infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *Journal of Medical Entomology*. 39:809–813.
- Marquez FJ, Morel PC, Guiguen C, Beaucournu JC. 1992. Clé Dichotomique des Ixodidae D'Europe. I. Les larves du genre *Ixodes*. *Acarol*. 33:325–330.
- Mediannikov O, Abdissa A, Diatta G, Trape JF, Raoult D. 2012. *Rickettsia felis* in fleas, southern Ethiopia. *Emerging Infectious Diseases*. 18:1385–1386.
- Mertins JW, Moorhouse AS, Alfred JT, Hutcheson HJ. 2010. *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae): new North American collection records, including the first from the United States. *Journal of Medical Entomology*. 47:536–542.
- Miranda J, Portillo A, Oteo JA, Mattar S. 2012. *Rickettsia* sp. Strain Colombianensi (Rickettsiales: Rickettsiaceae): a new proposed rickettsia detected in *Amblyomma dissimile* (Acari: Ixodidae) from iguanas and free-living larvae ticks from vegetation. *Journal of Medical Entomology*. 49:960–965.
- Moerbeck L, Vizzoni VF, Machado-Ferreira E, Cavalcante RC, Oliveira SV, Soares CA, Amorim M, Gazêta GS. 2016. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) vector biodiversity in high altitude atlantic forest fragments within a semiarid climate: a new endemic area of spotted-fever in Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 53:1458–1466.
- Monteiro JL, Fonseca F. 1932. Typho endêmico de São Paulo. Novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos *Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*. *Memorias Do Instituto Butantan*. 10:33–50.
- Moura-Martinião NO, Machado-Ferreira E, Cardoso KM, Gehrke FS, Amorim M, Fogaca AC, Soares CAG, Gazêta GS, Schumaker TTS. 2014. *Rickettsia* and vector biodiversity of spotted fever focus Atlantic rain forest biome, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 20:498–500.
- Nieri-Bastos FA, Lopes MG, Cançado PHD, Rossa GAR, Faccini JLH, Gennari SM. 2014. *Candidatus Rickettsia andeanae*, a spotted fever group agent infecting *Amblyomma parvum* ticks in two Brazilian biomes. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 109:259–261.
- Nieri-Bastos FA, Marcili A, De Sousa R, Paddock CD, Labruna MB. 2018. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. *Applied and Environmental Microbiology*. 2:84.
- Nunes EDC, Vizzoni VF, Navarro DL, Iani FCDM, Durães LS, Daemon E, Soares CAG, Gazêta GS. 2015. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*. 110:1058–1061.
- Ogrzewalska M, Pinter A. 2016. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 53:1–31.

- Ogrzewalska M, Uezu A, Labruna MB. 2010. Ticks (Acari Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitology Research*. 106:809–816.
- Oliveira SV, Costa RF, Ferreira G, Pereira SVC, Amorim M, Monteiro MFM, Alves LC, Gazêta GS. 2018. Fatal case of spotted fever in a patient from Northeastern Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 60:e21.
- Oliveira SV, Guimaraes JN, Reckziegel GC, Neves BMC, Araújo-Vilges KM, Fonseca LX, Pinna FV, Pereira SVC, Caldas EP, Gazêta FS, et al. 2016a. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 22:22.
- Oliveira SV, Pereira SVC, Pinna FV, Fonseca LX, Serra-Freire NM, Cardoso KM, Borsoi ABP, Amorim M, Caldas EP, Gazêta GS. 2016b. Vigilância de ambientes da febre maculosa: explorando as áreas silenciosas do Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*. 7:65–72.
- Oliveira SV, Willemann MCA, Gazêta GS, Angerami RN, Gurgel-Goncalves R. 2017. Predictive factors for fatal tick-borne spotted fever in Brazil. *Zoonoses and Public Health*. 64:44–50.
- Parola P. 2011. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in sub-Saharan Africa. *Clinical Microbiology and Infection*. 17:996–1000.
- Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, et al. 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical Microbiology Reviews*. 26:657–702.
- Pesquera C, Portillo A, Palomar AM, Oteo JA. 2015. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. and *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. *Parasites & Vectors*. 8:1–10.
- Peter RJ, Van den Bossche P, Penzhorn BL, Sharp B. 2005. Tick, fly, and mosquito control-lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary Parasitology*. 132:205–215.
- Regnery RL, Spruill CL, Plikaytis BD. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*. 173:1576–1589.
- Reif KE, Macaluso KR. 2009. Ecology of *Rickettsia felis*: a review. *Journal of Medical Entomology*. 46:723–736.
- Roux V, Raoult D. 2000. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (OmpB). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50:1449–1455.
- Sakai RK, Costa FB, Ueno TE, Ramirez DG, Soares JF, Fonseca AH, Labruna MB, Barros-Battesti DM. 2014. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. *Ticks and Tick-borne Dis*. 5:917–923.
- Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. 2001. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of ‘geneD’, which encodes an intracytoplasmic protein. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 51:1353–1360.
- Silva AB, Cardoso KM, Oliveira SV, Costa RMF, Oliveira G, Amorim M, Alves LC, Monteiro MFM, Gazêta GS. 2018. *Rickettsia amblyom-matis* infecting *Amblyomma pseudoconcolor* in area of new focus of spotted fever in northeast Brazil. *Acta Tropica*. 182:305–308.
- Silva AB, Duarte MM, Cavalcante RC, Oliveira SV, Vizzoni VF, Duré AIL, de Melo IFC, Machado-Ferreira E, Gazêta GS. 2017b. *Rickettsia rickettsii* infecting *Rhipicephalus sanguineus sensu lato* (Latreille 1806), in high altitude Atlantic Forest fragments, Ceará State, Brazil. *Acta Tropica*. 73:30–33.
- Silva AB, Vizzoni VF, Costa AP, Costa FB, Moraes-Filho J, Labruna MB, Gazêta GS, Nogueira RMS. 2017a. First report of a *Rickettsia asembonensis* related infecting fleas in Brazil. *Acta Tropica*. 172:44–49.
- Soares HS, Barbieri ARM, Martins TF, Minervino AHH, Lima JTR, Marcili A, Gennari SM, Labruna MB. 2015. Ticks and rickettsial infection in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Experimental & Applied Acarology*. 65:125–140.
- Soares JF, Sangioni LA, Vogel FF, Silva CFB. 2007. Parasitismo em ser humano por *B. microplus* (Acari: Ixodidae) em Santa Maria, RS, Brasil. *Ciência Rural*. 37:1495–1497.
- Socolovschi C, Huynh TP, Davoust B, Gomez J, Raoult D, Parola P. 2009. Transovarial and trans-stadial transmission of *Rickettsia africae* in *Amblyomma variegatum* ticks. *Clinical Microbiology and Infection*. 15:317–318.
- Spolidorio MG, Andreoli GS, Martins TF, Brandão PE, Labruna MB. 2012. Rickettsial infection in ticks collected from road-killed wild animals in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 49:1510–1514.
- Szabó MP, Pinter A, Labruna MB. 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 3:27.
- Tomassone L, Nunez P, Ceballos LA, Gurtler RE, Kitron U, Farber M. 2010. Detection of “*Candidatus Rickettsia* sp. strain Argentina” and *Rickettsia bellii* in *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) from Northern Argentina. *Experimental & Applied Acarology*. 52:93–100.
- Vizzoni VF, Silva AB, Cardoso KM, Santos FB, Stenzel B, Amorim M, Oliveira SV, Gazêta GS. 2016. Genetic identification of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in an endemic area of a mild spotted fever in Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Acta Tropica*. 162:142–145.
- Weck B, Dall’Agnol B, Souza U, Webster A, Stenzel B, Klafke G, Martins JR, Reck J. 2016. Spotted fever group rickettsia in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. *Emerging Infectious Diseases*. 22:14–16.
- Wikswø ME, Hu R, Dasch GA, Krueger L, Arugay A, Jones K, Hess B, Bennett S, Kramer V, Eremeeva ME. 2008. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor* species from southern California. *Journal of Medical Entomology*. 45:509–516.
- Zeringóta V, Maturano R, Luz HR, Senra TO, Daemon E, Faccini JL, McIntosh D. 2016. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 8:81–

Supplementary Table 1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* specimens collected in hosts and environment, during Spotted Fever focus investigation and environment surveillance performed in Brazil from 2011 to 2017

Region	State	Biome	Host/Environment (n)	Specimens	Sample tested	Sample positive
North	Roraima	Amazon Forest	<i>Bos taurus</i> (1)	4	2	0
			Subtotal	4	2	0
	Rondônia	Amazon Forest	Environment-pasture	374	4	0
			<i>Bos taurus</i> (2)	18	2	0
			Subtotal	392	6	0
	Tocantins	Cerrado	<i>Bos taurus</i> (4)	19	11	2
Subtotal			19	11	0	
Northeast	Ceará	Caatinga	<i>Bos taurus</i> (45)	432	101	4
			<i>Canis familiaris</i> (2)	10	3	0
			<i>Equus asinus</i> (1)	50	2	0
			<i>Equus caballus</i> (1)	21	4	0
			Subtotal	513	110	4
	Pernambuco	Caatinga and Atlantic Rainforest	<i>Capra aegagrus hircus</i> (2)	4	4	0
			<i>Ovis aries</i> (1)	1	1	0
			Subtotal	5	5	0
	Rio Grande do Norte	Caatinga	<i>Bos taurus</i> (5)	50	8	0

			<i>Equus asinus</i> (2)	9	5	0
			<i>Equus caballus</i> (2)	23	4	0
			Subtotal	82	17	0
Central-West	Goiás	Cerrado	<i>Blastocerus dichotomus</i> (1)	6	4	0
			<i>Bos taurus</i> (6)	175	28	0
			Environment-pasture	411	9	1
			<i>Equus caballus</i> (3)	38	6	0
			<i>Myrmecophaga tridactyla</i> (1)	1	1	0
			<i>Tapirus terrestris</i> (1)	13	6	0
			Subtotal	644	54	1
Southeast	Espírito Santo	Atlantic Rainforest	<i>Bos taurus</i> (1)	98	49	0
			Environment-pasture	3365	13	0
			<i>Ovis aries</i> (2)	12	7	0
			Subtotal	3475	69	0
	Minas Gerais	Atlantic Rainforest and Cerrado	<i>Bos taurus</i> (33)	1040	171	1
			Environment-river bank	306	5	0
			<i>Ovis aries</i> (2)	11	7	0
			Subtotal	1357	183	1
	Rio de Janeiro	Atlantic Rainforest	<i>Bos taurus</i> (29)	429	92	0
			<i>Equus caballus</i> (20)	4	2	0

			Environment-farm	163	5	0
			Subtotal	596	99	0
	São Paulo	Atlantic Rainforest and Cerrado	<i>Bos taurus</i> (2)	74	10	1
			Subtotal	74	10	0
South	Paraná	Atlantic Rainforest	<i>Bos taurus</i> (11)	114	21	1
			Environment-river bank	18	2	1
			<i>Equus caballus</i> (4)	56	10	0
			Subtotal	188	33	2
	Santa Catarina	Atlantic Rainforest	Environment-farm	7	1	0
			<i>Bos taurus</i> (1)	5	1	0
			Subtotal	12	2	0
	Rio Grande do Sul	Atlantic Rainforest and Pampa	<i>Bos taurus</i> (4)	57	19	1
			Subtotal	57	19	1
Total				7418	620	12