

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR
DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

BRUNO DALL'AGNOL

**MICROBIOTA DE CARRAPATOS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE HUMANA E VETERINÁRIA
NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

Bruno Dall'Agnol

MICROBIOTA DE CARRAPATOS DE IMPORTÂNCIA EM SAÚDE HUMANA E
VETERINÁRIA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Escola de Ciências
da Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira

Coorientador: Prof. Dr. José Reck

Porto Alegre

2019

BRUNO DALL'AGNOL

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular da Escola de Ciências
da Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.

Aprovado em: _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Eduardo Eizirik – PUCRS

Prof. Dr. Jorge Guimarães – EMBRAPII

Prof. Dr. Santiago Nava – INTA - Argentina

Porto Alegre

2019

Ficha Catalográfica

D144m Dall Agnol, Bruno

Microbiota de carrapatos de importância em saúde humana e veterinária no estado do Rio Grande do Sul / Bruno Dall Agnol . – 2019.

161 f.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, PUCRS.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira.

Co-orientador: Prof. Dr. José Reck Júnior.

1. *Amblyomma aureolatum*. 2. *Ornithodoros brasiliensis*. 3. *Coxiella*. 4. *Francisella*. 5. *Bacterioma*. I. Ferreira, Carlos Alexandre Sanchez. II. Reck Júnior, José. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da PUCRS
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecária responsável: Clarissa Jesinska Selbach CRB-10/2051

“Os únicos derrotados são os que cruzam os braços”

Pepe Mujica

Este trabalho é dedicado...

À minha mãe, Cerli...

... por me fazer acreditar que a educação é o único caminho!

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial, meus pais (Cerli e Mário), meu irmão (Cleber) e minha tia (Maria). Agradeço todo o incentivo, apoio emocional e compreensão pelas ausências em momentos importantes. Sem vocês nada valeria a pena.

Ao Prof. Dr. José Reck, que me orienta há sete anos, desde a iniciação científica. Agradeço por todos os ensinamentos e por despertar minha consciência quanto à importância da ciência e do pensamento crítico.

Ao Prof. Dr. Carlos Alexandre Sanchez Ferreira, por todas as lições, pelo exemplo de ser humano e pela paciência que teve comigo nesses seis anos em que fui seu orientado.

Aos pesquisadores, funcionários, colegas e amigos do Laboratório de Parasitologia do IPVDF, pelos agradabilíssimos momentos em que passei nesse laboratório e todos os ensinamentos e experiências compartilhados.

Aos professores e colegas do Laboratório de Imunologia e Microbiologia PUCRS, meu agradecimento por toda a ajuda e troca de experiências durante o doutorado. Em especial a Dra. Bruna Ferreira Leal e as professoras Dra. Sílvia Dias de Oliveira, Dra. Marjo Cado Bessa e Dra. Renata Medina da Silva por todos os ensinamentos sobre microbiologia.

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias FMVZ USP, em especial ao Dr. Marcelo Bahia Labruna e ao Dr. Francisco Borges Costa por toda ajuda na realização das técnicas sorológicas.

À Dra. Samara Paula Mattiello Drescher, grande amiga e colega, pela indispensável ajuda na elaboração desta tese, por todos os ensinamentos sobre bacteriologia e por todos os momentos alegres durante as aulas do doutorado e laboratório.

À Dra. Anelise Webster, pela amizade e colaboração no desenvolvimento dos trabalhos desta tese. Um sincero agradecimento por todos os ensinamentos e incentivo.

Ao Ugo Araújo Souza, DVM, MSc., pela amizade e apoio na elaboração desta tese. Meu agradecimento por toda a ajuda, especialmente nos trabalhos de campo.

Ao Clairton Júlio de Lima (Lobão) da empresa “Lobão Trilhas e Aventuras” por todo o apoio prestado nos trabalhos de campo em Caxias do Sul.

Aos pesquisadores e funcionários da Fundação Zoobotânica do Estado do Rio Grande do Sul (FZB), em especial à Dra. Márcia Maria de Assis Jardim, à Dra. Tatiane Campos Trigo e ao Técnico Mariano Cordeiro Pairet Júnior por todos os ensinamentos sobre Mastozoologia e indispensável ajuda nos trabalhos de campo.

Ao Dr. John Anthony McCulloch, pela colaboração na análise do bacterioma dos carrapatos.

Aos funcionários da Inspetoria de Defesa Agropecuária de Nova Araçá, Marilene Frasson e Renato Frasson pelo incentivo no doutorado e por compreenderem minhas ausências para concluí-lo.

Aos colegas da Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural, (SEAPDR), em especial à Melissa Brum Ries e Marinês Lazzari, pelo apoio e suporte na conclusão do doutorado.

Aos meus amigos (não vou citar nomes com medo de esquecer alguém), que tornam meus dias mais alegres.

À todas as pessoas que acreditam em um mundo melhor e fazem a sua parte todos os dias para transformá-lo em um lugar com menos intolerância, injustiça, ódio e ignorância e com mais respeito, justiça, amor e educação. O meu “Muito obrigado!”

RESUMO

Carrapatos são artrópodes hematófagos parasitos de vertebrados que causam prejuízo à seus hospedeiros pelos danos diretos causados pela espoliação sanguínea, além de facilitarem a ocorrência de miíase e infecções bacterianas secundárias. No entanto, o problema mais importante associado à infestação por carrapatos é a competência para transmitir agentes patogênicos como vírus, bactérias, protozoários e nematóides. Dentre as espécies de carrapatos presentes no estado do Rio Grande do Sul (RS) com importância para a saúde humana e veterinária estão as espécies *Amblyomma aureolatum* e *Ornithodoros brasiliensis*. A espécie *A. aureolatum* pertence à família Ixodidae e seus hospedeiros naturais são aves e roedores silvestres nos estágios imaturos e carnívoros silvestres na forma adulta, podendo também parasitar os animais domésticos e o homem. O carrapato *A. aureolatum* é o principal vetor de *Rickettsia rickettsii* na região metropolitana do Estado de São Paulo no bioma Mata Atlântica e também foi encontrado infectado por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica no mesmo bioma. Também é vetor do protozoário patogênico para cães *Rangelia vitalii*. O carrapato *O. brasiliensis* pertence à família Argasidae e até então só existem registros dessa espécie na região conhecida como Campos de Cima da Serra no estado do RS. Os hospedeiros parasitados por essa espécie de carrapato podem sofrer um quadro de toxicose causado por componentes da saliva do parasito. Também existem relatos da presença de bactérias do gênero *Borrelia* presentes nesse carrapato. Além de bactérias patogênicas, assim como em outros metazoários, existe uma interação dos carrapatos com outros microrganismos trazendo benefícios mutuos às espécies envolvidas. Diante disso os objetivos do estudo foram i) caracterizar o bacterioma de *A. aureolatum* e *O. brasiliensis*; ii) caracterizar o parasitismo e ampliar o conhecimento sobre a distribuição de *O. brasiliensis* e iii) pesquisar bactérias patogênicas do gênero *Rickettsia* em carrapatos e hospedeiros carnívoros silvestres. Em *A. aureolatum*, os filos bacterianos predominantes foram Proteobacteria (98,68%), Tenericutes (0,70%), Bacteroidetes (0,14%), Actinobacteria (0,13%) e Acidobacteria (0,05%). Os gêneros predominantes foram *Francisella* (97,01%), *Spiroplasma* (0,70%), *Wolbachia* (0,51%), *Candidatus* Midichloria (0,25%) e *Alkanindiges* (0,13%). Os filos predominantes em *O. brasiliensis* foram Proteobacteria (90,27%), Actinobacteria (7,38%), Firmicutes (0,77%), Bacteroidetes (0,44%) e Planctomycetes (0,22%). Os gêneros bacterianos

predominantes foram *Coxiella* (87,71%), *Nocardioides* (1,73%), *Saccharopolyspora* (0,54%), *Marmoricola* (0,42%) e *Staphylococcus* (0,40%). Considerando os gêneros com potencial importância em saúde humana e animal que podem ser transmitidos por carrapatos destacam-se: (i) *Coxiella* sp., encontrada em todos os estádios de *O. brasiliensis*; (ii) *Francisella* sp., encontrada em todos os espécimes de *A. aureolatum* e em ninfas não alimentadas de *O. brasiliensis*; (iii) *Rickettsia* sp., encontrada em fêmeas de *A. aureolatum* e fêmeas e ninfas de *O. brasiliensis*. Com relação a *O. brasiliensis*, aqui relatamos uma série de casos clínicos associados ao parasitismo por esta espécie de carrapato em um grupo de turistas no município de Caxias do Sul, RS. Esses casos chamam a atenção para síndromes não infecciosas subdiagnosticadas causadas por carrapatos com distribuição local restrita. Esses resultados ampliam a distribuição conhecida de *O. brasiliensis*, além de ser o primeiro registro dessa espécie em cavernas. Quanto a pesquisa de *Rickettsia* spp. em carrapatos de carnívoros silvestres, dos 292 carrapatos coletados, 22 (7,5%) foram positivos pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para a presença do DNA de *Rickettsia parkeri* sensu stricto (s.s.). Além disso, 20 (62%) dos canídeos silvestres apresentaram anticorpos contra *R. parkeri*. Os resultados sugerem que canídeos silvestres estão envolvidos no ciclo enzoótico de *R. parkeri* s.s. no bioma Pampa, participando de sua dispersão e de seus vetores. Por fim, os resultados encontrados aqui contribuem para o entendimento da eco-epidemiologia das relações entre bactérias e carrapatos de interesse em saúde pública no RS. Espera-se que a caracterização da microbiota dessas espécies de carrapatos aliada à pesquisa adicional de patógenos nesses vetores possa auxiliar na prevenção de doenças no Brasil e a entender a história natural desses parasitos.

Palavras-chave: *Amblyomma aureolatum*; *Ornithodoros brasiliensis*; *Coxiella*; *Francisella*; *Rickettsia*; bacterioma; doenças transmitidas por carrapatos.

ABSTRACT

Ticks are arthropods ectoparasites that feed on vertebrate bloods causing damage to the health of their hosts by direct damage caused by blood spoliation, while facilitating the occurrence of myiasis and secondary bacterial infections. However, the most important problem associated with tick infestation is the ability to transmit pathogens such as viruses, bacteria, protozoa and nematodes. Among the species of ticks present in the state of Rio Grande do Sul (RS) with importance for human and veterinary health are the species *Amblyomma aureolatum* and *Ornithodoros brasiliensis*. The species *A. aureolatum* belongs to the Ixodidae family and its natural hosts are wild birds and rodents in the immature stages and wild carnivores in the adult form, and can also parasitize domestic animals and humans. The tick *A. aureolatum* is the main vector of *Rickettsia rickettsii* in the metropolitan region of São Paulo state in the Atlantic Rainforest biome and was also found infected by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic Rainforest in the same biome. It is also vector of a protozoan pathogenic for dogs, *Rangelia vitalii*. The tick *O. brasiliensis* belongs to the Argasidae family and until then there are only records of this species in the region known as Campos de Cima da Serra in the RS state. The hosts parasitized by this species of tick may suffer from a toxicose caused by components of the parasite's saliva. There are also reports of the presence of bacteria of the genus *Borrelia* present in this tick. In addition to pathogenic bacteria, as in other metazoans, there is an interaction of ticks with other microorganisms and this relationship brings mutual benefits to the species involved. Therefore, the objectives of the study were i) to characterize the bacteriome of *A. aureolatum* and *O. brasiliensis*; ii) to characterize the parasitism and increase the known distribution of *O. brasiliensis*; and iii) to investigate pathogenic bacteria of the genus *Rickettsia* in ticks and wild carnivorous hosts. In *A. aureolatum*, the predominant bacterial phyla were Proteobacteria (98.68%), Tenericutes (0.70%), Bacteroidetes (0.14%), Actinobacteria (0.13%) and Acidobacteria (0.05%). The predominant genera were *Francisella* (97.01%), *Spiroplasma* (0.70%), *Wolbachia* (0.51%), *Candidatus* Midichloria (0.25%) and *Alkanindiges* (0.13%). The predominant phyla in *O. brasiliensis* were Proteobacteria (90.27%), Actinobacteria (7.38%), Firmicutes (0.77%), Bacteroidetes (0.44%) and Planctomycetes (0.22%). The predominant bacterial genera were *Coxiella* (87.71%), *Nocardioidea* (1.73%), *Saccharopolyspora*

(0.54%), *Marmoricola* (0.42%) and *Staphylococcus* (0.40%). Considering the genera with importance in human and animal health that can be transmitted by ticks: (i) *Coxiella* sp. was found in all stages of *O. brasiliensis*; (ii) *Francisella* sp. in all specimens of *A. aureolatum* and in non-fed nymphs of *O. brasiliensis*; (iii) *Rickettsia* sp. in females of *A. aureolatum* and females and nymphs of *O. brasiliensis*. With regard to *O. brasiliensis*, we report here a series of clinical cases associated with *O. brasiliensis* parasitism in a group of tourists in Caxias do Sul municipality, RS state. These cases call attention to undiagnosed noninfectious syndromes caused by locally restricted ticks. These results amplify the known distribution of *O. brasiliensis*, besides being the first record of this species in caves. Regarding the research of *Rickettsia* spp. in wild carnivorous ticks, of the 292 ticks collected, 22 (7.5%) were positive by PCR for the presence of *Rickettsia parkeri* sensu stricto (s.s) DNA. In addition, 20 (62%) wild canids showed antibodies against *R. parkeri*. The results suggest that wild canids are involved in the enzootic cycle of *R. parkeri* s.s. in the Pampa biome and could be responsible for the dispersion of pathogens and their vectors. Finally, the results found here contribute to the understanding of the eco-epidemiology of the relationships between bacteria and ticks of interest in public health in RS State. It is expected that the characterization of the microbiota of these tick species together with the pathogen research in these vectors can help in the prevention of vector-borne diseases in Brazil and to understand the natural history of these parasites.

Keywords: *Amblyomma aureolatum*; *Ornithodoros brasiliensis*; *Coxiella*; *Francisella*; *Rickettsia*; bacteriome; tick-borne diseases.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

" - Segundos

% - Por cento

' - Minutos

< - Menor

= - Igual

> - Maior

μL – Microlitro

16S rRNA – gene que codifica a porção 16S do Ácido Ribonucleico Ribossomal

A – Adenina

a.C. – Antes de Cristo

AHFV – Alkhurma Haemorrhagic Fever Virus

APA Ibirapuitã – Área de Proteção Ambiental do Ibirapuitã

BLAST – Basic Local Alignment Search Tool

bp – base pair (pares de base)

BP – Refúgio da Vida Silvestre Banhado dos Pachecos

C – Citosina

CCHFV – Crimean Congo Haemorrhagic Fever Virus

CE – *Coxiella* endossimbionte

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CEVS – Centro Estadual de Vigilância em Saúde

cf. – *conferatum* (necessita confirmação)

CI – (Intervalo de Confiança)

CLE - *Coxiella*-like endosymbionts

CPK – Creatinina fosfoquinase

CTFV – Colorado Tick Fever Virus

DNA – Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucleico)

DTV – Deer Tick Virus

EDTA - Ethylenediamine tetraacetic acid (ácido etilenodiamino tetra-acético)

et al. – *et alii* (e outros)

EUA – Estados Unidos da América

FBA - Flux Balance Metabolic Analysis

FE – *Francisella* endossimbionte

FLE - *Francisella*-like endosymbionts

FMB – Febre Maculosa Brasileira

G – Guanina

g/dl – Gramas por decilitro

gen. et – gênero extinto

gltA gene – Citrate synthase gene

GRF – Grupo da Febre Recorrente

Hb – Haemoglobin (Hemoglobina)

HRTV – Heartland Virus

HTBRF – Hard Tick-Borne Relapsing Fevers

htrA gene – 17 kDa outer membrane antigen gene

IFA – Indirect Immunofluorescence Assay

IgG - Immunoglobulin G (Imunoglobulina G)

IM – Intra-muscular

IPVDF – Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor

KFDV – Kyasanur Forest Disease Virus

LDH – Lactato Desidrogenase

mg/Kg – miligrama por Kilograma

mg/mL – Miligrama por mililitro

mL – Mililitro

N – Nífa

no. – number (número)

NR – Not reactive at a sérum dilution of 1:64 (Não reagente a soro-diluição de 1:64)

° - Graus

°C – Graus Celsius

OHFV – Omsk Hemorrhagic Fever Virus

ompA gene - Outer membrane protein A gene

OTU - Operational Taxonomic Unit (Unidades Taxonômicas Operacionais)

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PCV – Packed Cell Volume (Hematócrito)

POWV – Powassan Virus

RBC – Red Blood Cells

RNA - Ribonucleic acid (Ácido Ribonucleico)

RS – Rio Grande do Sul

S – South (Sul)

SEAPDR – Secretaria da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento Rural do Estado do

Rio Grande do Sul

s.l. - *sensu lato*

s.s. - *sensu stricto*

S/A – Sociedade Anônima

SFG – Spotted Fever Group

SFTSV – Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus

SID – Uma vez ao dia

sp. - Espécie

sp. nov. – Espécie nova

spp. – Espécies

T – Timina

TBEV – Tick-Borne Encephalitis Virus

TBRF – Tick-Borne Relapsing Fevers

TPB – Tristeza Parasitária Bovina

USA – United States of America (Estados Unidos da América)

W – West (Oeste)

WBC – White Blood Cells (Leucócitos)

APÊNDICE

Apêndice 1. “ <i>Candidatus Rickettsia asemboensis</i> ” in <i>Rhipicephalus sanguineus</i> ticks Brazil.....	152
Apêndice 2. <i>Borrelia burgdorferi</i> sensu lato in <i>Ixodes longiscutatus</i> ticks from Brazilian Pampa	156

SUMÁRIO

Capítulo 1	20
Prólogo	21
1.1 Introdução	25
1.1.1 Carrapatos	25
1.1.1.1 Aspectos paleontológicos e históricos.....	25
1.1.1.2 Taxonomia.....	29
1.1.1.3 Espécies presentes no Brasil.....	30
1.1.1.4 Espécies presentes no Rio Grande do Sul	33
1.1.1.5 O gênero <i>Amblyomma</i>	34
1.1.1.5.1 <i>Amblyomma aureolatum</i>	34
1.1.1.6 O gênero <i>Ornithodoros</i>	37
1.1.1.6.1 <i>Ornithodoros brasiliensis</i>	37
1.1.2 Bactérias associadas a carrapatos	41
1.1.2.1 Simbiontes	45
1.1.2.2 Patógenos	56
1.2 Justificativa	63

1.3 Objetivos	65
1.3.1 Objetivo Geral	65
1.3.2 Objetivos Específicos	65
Capítulo 2	66
2.1 Artigo científico 1: Molecular characterization of bacterial communities of two Neotropical tick species (<i>Amblyomma aureolatum</i> and <i>Ornithodoros brasiliensis</i>) using rDNA 16S sequencing	67
2.2 Artigo científico 2: Clinical findings associated to <i>Ornithodoros brasiliensis</i> tick parasitism in travelers, Southern Brazil	112
2.3 Artigo científico 3: <i>Rickettsia parkeri</i> in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa.....	124
Capítulo 3	133
3.1 Considerações finais.....	134
Referências Bibliográficas	138
Apêndices	152

Capítulo 1

Prólogo

Introdução

Justificativa

Objetivos

Prólogo

“A principal causa da Revolução Farroupilha foram os carrapatos. O surto de 1834 abalou o gado dos estancieiros do Rio Grande e provocou uma crise sem precedentes. Esse infortúnio tomaria, a partir de 1835, um tom político e de confronto com o poder central, provocando uma guerra civil, a proclamação de uma república e dez anos de mortandade.”

História regional da infâmia, Juremir Machado da Silva, 2010.

“At Casa Vieja de Gastoya, road from Guatemala to Zacopa (Central America) 15 leagues from Guatemala, May 5, 1847, I was awakened several times in the midst of very profound sleep, by some excruciating bites on my hands and body, and my companion, M. Jules, complained even more than I. At 3 o'clock, irritated by these painful bites, I lighted a candle, and found my hands covered with blood and some spots resembling large lice-bites, which I believed must belong to a particularly large species. My companion told me that we might have been bitten by some wasps lodged in the wall of the house. Having awakened the “arriero” (muletter) who conducted us, and having told him what we had found, he informed us that we were victims of an animal named “Talaje” which was regarded as a large bug. I then relighted my candle in order to look for this insect, and soon I found this Argas, which was nauseating to me. Some were filled with blood, and others had a wrinkled skin. I then recalled having found some on my body during the night and rolling them between my fingers, taking them for some of the ticks with which my mule was covered (au point que) several persons told me that it might die of it.

I took a certain number of these Argas, which I put in a tube in order to study them in Paris.

These Talajes inhabit cracks in the walls of old houses. These walls were made of rough bamboo and plugging-mortar. They bite in the manner of bugs, and return to their holes during the day for they are nocturnal."

**Notas de M. Nicolet citadas por Guérin-Méneville (1849) na descrição de
Ornithodoros talaje.**

"Tive oportunidade de constatar grande infestação do Ornithodoros brasiliensis Aragão, 1923 nas matas primitivas, nos extensos pinheirais, nas construções peridomiciliarias das fazendas esparsas no município e em diversas casas da cidade de São Francisco de Paula...

...Eu tive a oportunidade de observar, em um grande ôco de pinheiro Araucaria angustifolia (Bert.) O. Ktq., ao nível da terra, um animal silvestre, Mus sp., vítima dêsses carrapatos. "

**Raul F. di Primio, Nosologia e insetos transmissores de doenças no Rio
Grande do Sul, Anais da Faculdade de Medicina de Porto Alegre, (1970).**

Esses relatos ilustram a importância dos carrapatos tanto na questão econômica causando prejuízos capazes de iniciar uma revolução, quanto pela sua importância na saúde pública pelo dano direto causado pelo hematofagismo e inoculação de toxinas ou pela transmissão de patógenos aos humanos e outros animais.

De fato, o carrapato bovino *Rhipicephalus microplus* ainda causa um prejuízo de mais de três bilhões de dólares ao ano no Brasil (1). Também é um dos vetores do

complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB) causada pelos protozoários *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* e pela bactéria *Anaplasma marginale*, que é a doença infecciosa que mais mata bovinos no estado do Rio Grande do Sul (SEAPDR, dados não publicados) mas, atualmente, esses prejuízos não são a causa de nenhuma revolução.

Não é só no campo da agropecuária que os carrapatos causam prejuízos. Vários patógenos zoonóticos são transmitidos por carrapatos como bactérias dos gêneros *Rickettsia*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Francisella*, *Bartonella*, *Anaplasma*, *Ehrlichia*; protozoários do gênero *Babesia*; e os vírus Colorado Tick Fever Virus (CTFV), Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV), Omsk Hemorrhagic Fever Virus (OHFV), Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus (SFTSV), Heartland Virus (HRTV), Crimean Congo Haemorrhagic Fever Virus (CCHFV), Kyasanur Forest Disease Virus (KFDV), Alkhurma Haemorrhagic Fever Virus (AHFV), Powassan Virus (POWV) and Deer Tick Virus (DTV). Várias das doenças causadas por esses microrganismos são emergentes e negligenciadas e devem ser abordadas dentro do conceito de “One Health” que abrange saúde humana, animal e ambiental, visto o grau de complexidade das interações entre patógenos, hospedeiros vertebrados, ambientes e vetores envolvidos.

Outros fatores a serem levados em consideração em relação às doenças vetoriais são o aumento da degradação ambiental e consequentes mudanças climáticas, como o aquecimento global. Essas alterações levam ao aumento do contato entre humanos e os artrópodes vetores, ao mesmo tempo em que causam a expansão da distribuição dos carrapatos e doenças transmitidas possibilitando a emergência de novos patógenos ou a reemergência em novos locais de patógenos já conhecidos (2).

No entanto, nem todos os microrganismos presentes em carrapatos são patógenos. Existe um diverso grupo de microrganismos comensais e simbioses presentes nos carrapatos, sendo sua biologia e seu efeito sobre os carrapatos ainda desconhecidos e até mesmo negligenciados. Exemplos desses microrganismos são as bactérias dos gêneros *Coxiella*, *Rickettsiella*, *Arsenophonus*, *Francisella*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Lariskella*, *Midichloria*, *Rickettsia* e *Wolbachia*. Essa tese trata sobre as bactérias presentes nos carrapatos não focando somente em patógenos, mas na totalidade de seu bacterioma, proporcionando tanto conhecimentos básicos como aplicados levando em conta toda a sua complexidade, podendo servir para o desenvolvimento de estratégias de controle e prevenção do parasitismo por carrapatos e as doenças que eles transmitem e que há muito tempo afligem a humanidade.

1.1 Introdução

1.1.1 Carrapatos

1.1.1.1 Aspectos paleontológicos e históricos

Carrapatos são ectoparasitos que se alimentam de sangue de vertebrados, e são reconhecidos como um problema mundial por sua capacidade de causar dermatoses, anemia, toxemia, incluindo paralisia, redução do ganho de peso em animais de produção, e ainda facilitam a ocorrência de miíases e infecções bacterianas secundárias. No entanto, o problema mais importante associado à infestação por carrapatos é a capacidade para transmitir agentes patogênicos como vírus, bactérias, protozoários e nematóides a animais e seres humanos, sendo juntamente com os mosquitos os vetores artrópodes mais importantes de doenças infecciosas (3,4).

O mais antigo registro da presença de carrapatos data de 99 milhões de anos atrás, de espécimes encontrados em âmbar do período Cretáceo. Carrapatos das espécies *Cornupalpatum burmanicum* da Família Ixodidae (Figura 1) e carrapatos da extinta família Deinocrotonidae descritos como *Deinocroton draculi* gen. et sp. nov. (Figura 2) provavelmente se alimentavam de dinossauros emplumados (5). Na família Argasidae, um dos fósseis mais bem conservados encontrados até hoje é de uma larva de *Carios jerseyi* com data estimada de fossilização em 90-94 milhões de anos atrás (6).

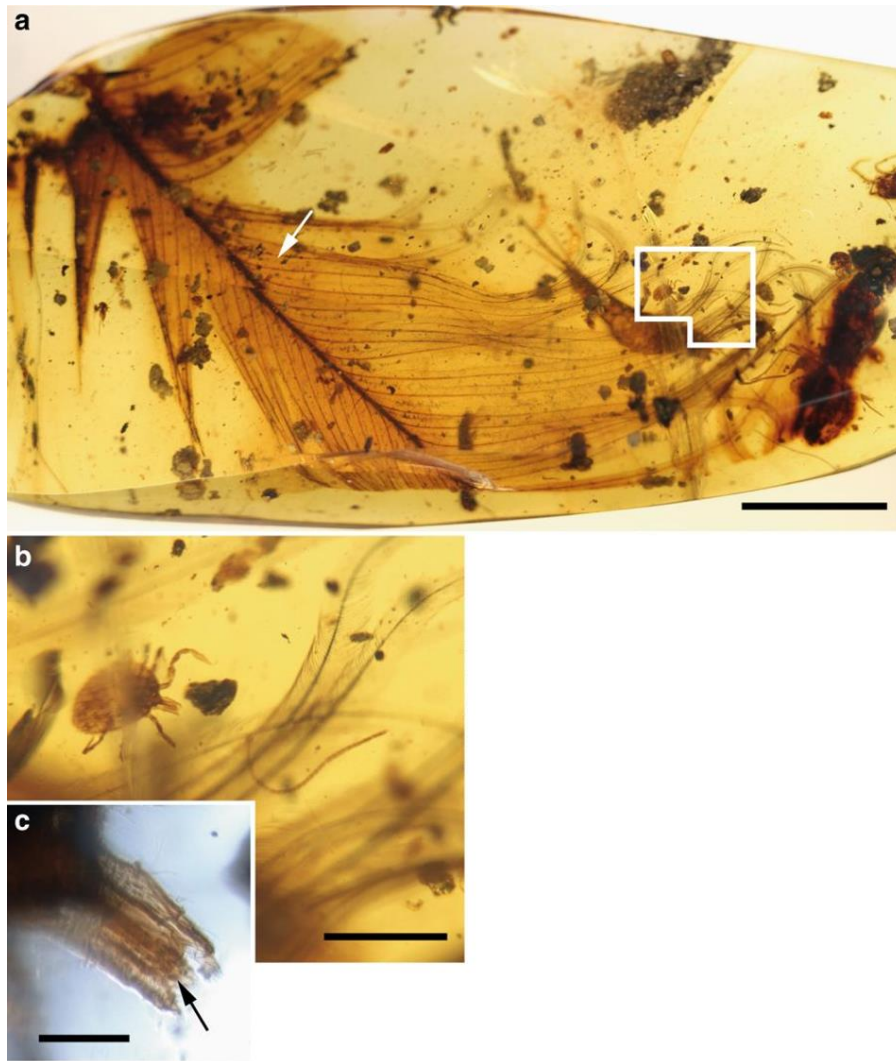


Figura 1: Carrapato *Cornupalpatum burmanicum* enredado em uma pena. (a) Fotografia do pedaço de âmbar birmanês mostrando uma pena semicompleta. Barra de escala, 5 mm. (b) Detalhe da ninfa de carrapato em vista dorsal e farpas (inserção em (a)). Barra de escala, 1 mm. (c) Detalhe do capítulo do carrapato (partes bucais), mostrando palpos e hipostômio com dentes (seta). Barra de escala, 0,1 mm. Fonte: (5).



Figura 2: Reconstrução do habitus de *Deinocroton draculi* em um dinossauro de penas. A reconstrução mostra dois machos (à esquerda) e uma fêmea ingurgitada alimentando-se (à direita). As cores dos carrapatos são conjecturais, mas baseadas na coloração observada nos carrapatos da Família Nuttalliellidae relacionados Fonte: (5).

Registros arqueológicos indicam que os carrapatos representam um problema enfrentado pela humanidade desde os primórdios das civilizações. Estudos em uma múmia de cão do Antigo Egito datada do Período Romano sugerem uma significativa infestação pelo carrapato marrom do cão *Rhipicephalus sanguineus* (Figura 3) (7).

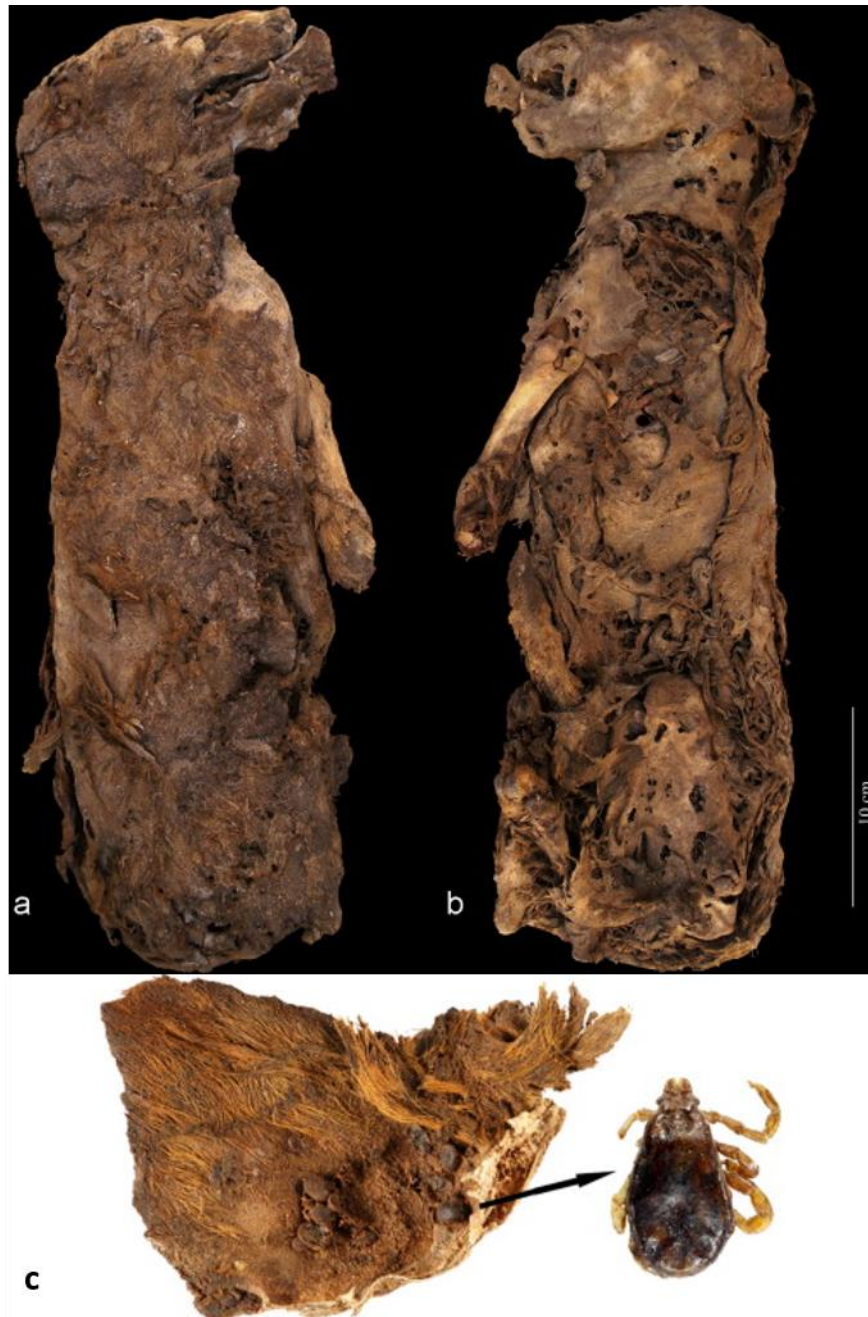


Figura 3: A múmia do cão. Vista de perfil do lado direito (a) e lado esquerdo (b) bem preservados da múmia. (c) Orelha esquerda do cão com alta infestação pelo carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. Fonte: (7).

No Antigo Egito, uma representação de um animal "semelhante a uma hiena" de um Tebano, datado do século XV a.C., mostra três formas semelhantes a carrapatos no

pavilhão auricular interno (Figura 4), sendo provavelmente a mais antiga representação conhecida de carrapatos (7). Também, uma referência ao que poderia ser “febre do carrapato” foi registrada em um rolo de papiro datado do século XVI a.C. (8). Esta descrição sugere que os antigos egípcios estavam perfeitamente conscientes dos carrapatos e de seus efeitos nocivos sobre a saúde humana ou animal (7).

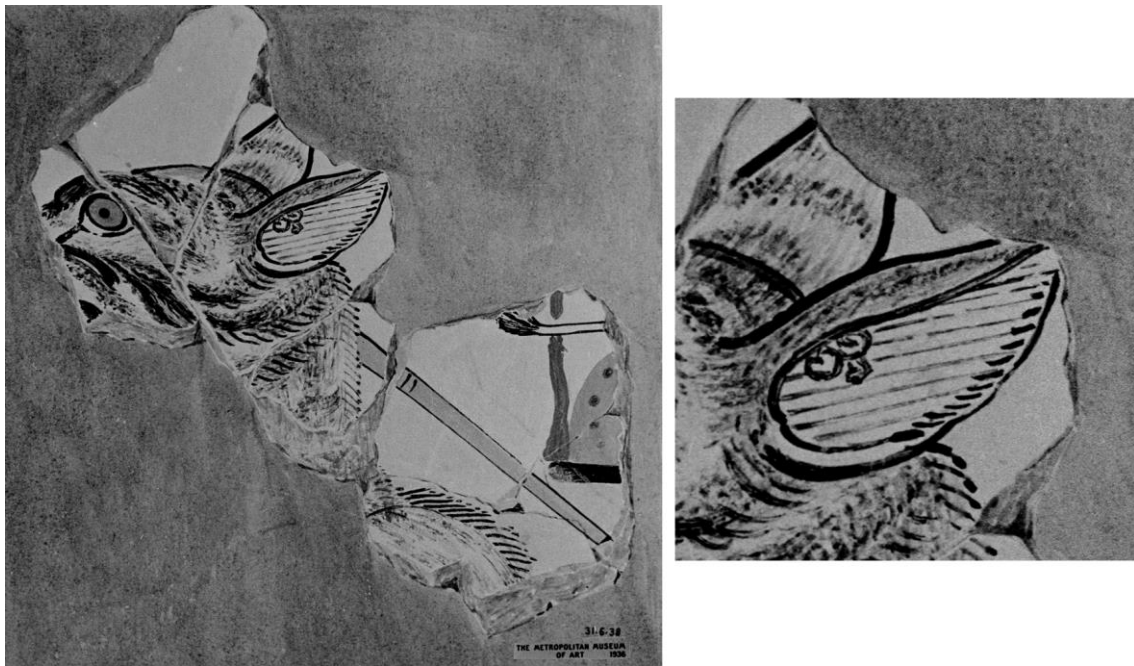


Figura 4: Representação de um animal mostrando o que parecem ser carrapatos no conduto auditivo. Túmulo de Intef, Novo Reino, Tebas, Alto Egito (Dra Abou el-Naga, ca. 1473–1458 a.C.). Fonte: (7).

1.1.1.2 Taxonomia

Os carrapatos são enquadrados no reino Metazoa, filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, classe Arachnida, subclasse Acari, superordem Parasitiformes, ordem

Ixodida, superfamília Ixodoidea. A superfamília Ixodoidea é composta por quatro famílias: Ixodidae, Argasidae, Nuttalliellidae e Deinocrotonidae (5,9).

A família Ixodidae é composta pelos gêneros *Amblyomma* Koch, 1844; *Anomalohimalaya* Hoogstraal, Kaiser and Mitchell, 1970; *Bothriocroton* Keirans, King and Sharrad, 1994; *Compluriscutula* Poinar and Buckley, 2008; *Cornupalpatum* Poinar and Brown, 2003; *Cosmiomma* Schulze, 1920; *Dermacentor* Koch, 1844; *Haemaphysalis* Koch, 1844; *Hyalomma* Koch, 1844; *Ixodes* Latreille, 1795; *Margaropus* Karsch, 1879; *Nosomma* Schulze, 1920; *Rhipicentor* Nuttall and Warburton, 1908; e *Rhipicephalus* Koch, 1844. A família Argasidae é composta pelos gêneros *Argas* Latreille, 1795; *Ornithodoros* Koch, 1844; *Otobius* Banks, 1912; *Antricola* Cooley & Kohls, 1942; e *Nothoaspis* Keirans & Clifford, 1975. A família Nuttalliellidae é composta por um único gênero *Nuttalliella* Bedford, 1931 (3) e a família Deinocrotonidae é composta pelo gênero extinto *Deinocroton* Peñalver, Arillo, Anderson and Pérez-de la Fuente, 2017 (5). Existem em torno de 932 espécies de carrapatos descritas no mundo, sendo que 722 pertencem à família Ixodidae, 208 à família Argasidae, 1 à família Nuttalliellidae e 1 à família Deinocrotonidae (3,5).

1.1.1.3 Espécies presentes no Brasil

A fauna de carrapatos do Brasil é atualmente composta por 73 espécies, 47 da família Ixodidae e 26 da família Argasidae (10,11). A Tabela 1 apresenta as espécies de carrapatos com registros no Brasil.

Tabela 1: Espécies de carrapato com registro no Brasil

Ixodida (73 espécies)**Argasidae (26 espécies)****Argas (1 espécie)***Argas miniatus***Antricola (3 espécies)***Antricola delacruzi**Antricola guglielmonei**Antricola inexpectata***Ornithodoros (21 espécies)***Ornithodoros brasiliensis**Ornithodoros capensis**Ornithodoros cavernicolous**Ornithodoros cf. clarki**Ornithodoros faccinii**Ornithodoros fonsecai**Ornithodoros guaporensis**Ornithodoros hasei**Ornithodoros jul**Ornithodoros kohlsi**Ornithodoros marinkellei**Ornithodoros mimon**Ornithodoros nattereri**Ornithodoros rietcorreai**Ornithodoros rondoniensis**Ornithodoros rostratus**Ornithodoros rudis**Ornithodoros saraivai**Ornithodoros setosus**Ornithodoros stageri**Ornithodoros talaje***Nothoaspis (1 espécie)***Nothoaspis amazoniensis***Ixodidae (47 espécies)****Amblyomma (32 espécies)***Amblyomma aureolatum**Amblyomma auricularium**Amblyomma brasiliense**Amblyomma cajennense**Amblyomma calcaratum*

Amblyomma coelebs
Amblyomma dissimile
Amblyomma dubitatum
Amblyomma fuscum
Amblyomma geayi
Amblyomma goeldii
Amblyomma humerale
Amblyomma incisum
Amblyomma latepunctatum
Amblyomma longirostre
Amblyomma naponense
Amblyomma nodosum
Amblyomma oblongoguttatum
Amblyomma ovale
Amblyomma pacae
Amblyomma parkeri
Amblyomma parvum
Amblyomma pictum
Amblyomma pseudoconcolor
Amblyomma romitii
Amblyomma rotundatum
Amblyomma scalpturatum
Amblyomma sculptum
Amblyomma tigrinum
Amblyomma triste
Amblyomma varium
Amblyomma yucumense

***Haemaphysalis* (3 espécies)**

Haemaphysalis cinnabarina
Haemaphysalis juxtakochi
Haemaphysalis leporispalustris

***Ixodes* (9 espécies)**

Ixodes amarali
Ixodes aragaoi
Ixodes auritulus
Ixodes fuscipes
Ixodes longiscutatus
Ixodes loricatus
Ixodes luciae
Ixodes paranaensis

Ixodes schulzei
Dermacentor (1 espécie)
Dermacentor nitens
Rhipicephalus (2 espécies)
Rhipicephalus microplus
Rhipicephalus sanguineus

Fontes: (11-23).

1.1.1.4 Espécies presentes no Rio Grande do Sul

Até a data, 21 espécies de carrapatos da Família Ixodidae e duas espécies da Família Argasidae têm sido registradas no estado do Rio Grande do Sul: IXODIDAE, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma calcaratum*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma fuscum*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma parkeri*, *Amblyomma rotundatum*, *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma triste*, *Amblyomma yucumense*, *Haemaphysalis juxtakochi*, *Ixodes aragaoi*, *Ixodes auritulus*, *Ixodes fuscipes*, *Ixodes longiscutatus*, *Ixodes loricatus*, *Rhipicephalus microplus*, e *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato; e ARGASIDAE, *Argas miniatus* e *Ornithodoros brasiliensis* (24). Entre 2004 e 2017 foram registrados 70 casos de parasitismo humano por carrapatos no estado do Rio Grande do Sul, com um total de 81 amostras de carrapatos coletadas. Estas incluíram 11 espécies pertencentes a três gêneros de Ixodidae, *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Rhipicephalus*; e um gênero de Argasidae, *Ornithodoros*. As espécies de carrapatos mais prevalentes associadas aos casos de parasitismo humano foram *Amblyomma parkeri* (24%), *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (22%), *Amblyomma aureolatum* (15%) e *Amblyomma ovale* (12%) (24).

1.1.1.5 O gênero *Amblyomma*

Existem 137 espécies de *Amblyomma* no mundo, o que representa 19% dos Ixodidae e todos eles são caracterizados por um ciclo parasitário de três hospedeiros (3). A região Neotropical contém o maior número de espécies. Carrapatos do gênero *Amblyomma* são mais propensos a se alimentar de répteis do que outros ixodídeos, e as duas únicas espécies de carrapatos duros comumente encontrados em anfíbios são *A. dissimile* e *A. rotundatum*. Várias espécies dependem de aves para a manutenção de larvas e ninfas (3).

1.1.1.5.1 *Amblyomma aureolatum*

A espécie *A. aureolatum* (Figura 5) foi encontrada restrita à região Neotropical. Sua distribuição abrange Argentina, Brasil, Guiana Francesa, Paraguai, Suriname e Uruguai (3,25). Os hospedeiros principais para os estágios imaturos e adultos de *A. aureolatum* são, respectivamente, aves passeriformes e membros da Ordem Carnivora, mas a variedade de hospedeiros é ampla, especialmente para carrapatos adultos (3). Guglielmone e colaboradores (25) analisaram espécimes depositados em coleções de referência oriundos de vários países das Américas. A maioria dos espécimes adultos de *A. aureolatum* foram obtidos de indivíduos da ordem Carnivora (96,1%), especialmente de cães (53,1%). Uma proporção elevada (23,3%) foi coletada em canídeos silvestres, enquanto que 9,2% estavam parasitando felídeos silvestres. A contribuição de outras ordens de mamíferos como hospedeiros para adultos de *A. aureolatum* foi irrelevante. Adultos foram encontrados ocasionalmente em hospedeiros domésticos (além do cão) e

humanos. A maioria dos estágios imaturos de *A. aureolatum* foi encontrada em aves Passeriformes (25).

A espécie *Amblyomma aureolatum* é um dos carrapatos do gênero *Amblyomma* mais comuns para parasitar o cão doméstico em áreas rurais do sul e sudeste do Brasil (26). No Rio Grande do Sul, adultos dessa espécie tem sido relatados em cães e gatos domésticos, em graxaim-do-mato (*Cerdocyon thous*) e mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) (27). Uma fêmea de *Amblyomma aureolatum* foi encontrada em um bugio (*Alouatta guariba*), em Cachoeira do Sul (28), e um macho foi encontrado parasitando um gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), na localidade de Gravataí, ambos no estado do Rio Grande do Sul (29).

Sobreira Rodrigues e colaboradores (30) estudaram o ciclo de vida de *A. aureolatum* em laboratório. O período de incubação dos ovos variou de 31 a 34 dias; o período parasitário das larvas variou de 4 a 6 dias e a ecdise das ninfas ocorreu do 19º ao 22º dia. O período parasitário das ninfas variou de 5 a 8 dias e o período de ecdise aos adultos de 31 a 33 dias. O período parasitário dos adultos variou de 11 a 15 dias, o período pré-oviposição de 6 a 12 dias e o período de oviposição de 9 a 38 dias. A duração total do ciclo de vida variou de 116 a 168 dias.

Adultos de *A. aureolatum* foram registrados parasitando humanos (25). Este fato tem relevância, pois esta espécie de carrapato é vetor dos patógenos humanos *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (3). De 2004 a 2014 foram registrados 11 casos de parasitismo humano por *A. aureolatum* no Rio Grande do Sul (24).

Labruna e colaboradores (31) infectaram experimentalmente carrapatos *A. aureolatum* com a bactéria *Rickettsia rickettsii*, o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (FMB). A bactéria *R. rickettsii* foi eficientemente conservada tanto pela

manutenção transestadial como pela transmissão vertical (transovariana) para 100% dos carrapatos através de quatro gerações em laboratório. Entretanto, um menor desempenho reprodutivo e sobrevivência de fêmeas infectadas foi atribuído à infecção por *R. rickettsii*. Esses autores afirmam que devido à alta suscetibilidade de *A. aureolatum* à infecção por *R. rickettsii*, o efeito deletério que a bactéria causa nesses carrapatos pode contribuir para as baixas taxas de infecção (<1%) geralmente relatadas entre as populações de *A. aureolatum* nas áreas endêmicas para FMB. Ogrzewalska e colaboradores (32) encontraram uma taxa de infecção por *R. rickettsii* de 11,1% em *A. aureolatum* adultos colhidos em cães de uma área de Mata Atlântica endêmica para Febre Maculosa. Saraiva e colaboradores (33) demonstraram que ninfas e adultos de *A. aureolatum* não alimentados precisavam fixar-se ao hospedeiro por mais de 10 horas para transmitir *R. rickettsii*. Em contraste, carrapatos alimentados previamente necessitaram de um mínimo de 10 minutos de fixação para transmitir *R. rickettsii* aos hospedeiros.

Carrapatos da espécie *A. aureolatum* também foram encontrados infectados com *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica no município de Blumenau, Santa Catarina (34). No mesmo município, Barbieri e colaboradores (35) encontraram 9,3% (4/43) dos carrapatos *A. aureolatum* infectados por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica.

O carrapato *A. aureolatum* também é um parasito comum de cães em áreas rurais e periurbanas, com capacidade de transmitir o patógeno *Rangelia vitalii* para os cães no Brasil, Argentina e Uruguai (3). A espécie *A. aureolatum* foi capaz de adquirir e perpetuar *R. vitalii* por passagens transestadial e transovariana, como demonstrado por taxas de infecção de carrapatos maiores do que 5% após a eclosão ou muda. Quando expostos à transmissão alimentar, apenas os carrapatos *A. aureolatum* foram capazes de transmitir *R. vitalii* aos cães, que ficaram gravemente doentes, em comparação as

espécies *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (espécies tropical e temperada), *Amblyomma ovale*, *Amblyomma tigrinum* e *Amblyomma sculptum* que não foram vetores competentes de *R. Vitalii* (36).



Figura 5: Fêmea de *Amblyomma aureolatum*. Fonte: Arquivo pessoal.

1.1.1.6 O gênero *Ornithodoros*

Existem 126 espécies de *Ornithodoros* em todo o mundo, o que representa 61% dos Argasidae. O ciclo de vida de muitas espécies é caracterizado por um ciclo parasitário multi-hospedeiro, mas isso deve ser considerado com cautela, porque o ciclo de várias espécies permanece desconhecido (3).

1.1.1.6.1 *Ornithodoros brasiliensis*

A espécie *Ornithodoros brasiliensis*, conhecida como “carrapato mouro”, foi descrita no ano de 1923, pelo professor Henrique de Beaurepaire Aragão, com

espécimes oriundos do município de São Francisco de Paula, RS (37). Desde então, sua distribuição conhecida tem sido restrita à região dos Campos de Cima da Serra, nos municípios de São Francisco de Paula e Jaquirana (38). Este carrapato é conhecido por ser muito agressivo ao ser humano e por causar um quadro de toxicose e severas lesões no local da picada. Essa espécie de carrapato possui hábitos nidícolas, ou seja, vivem enterrados na toca do seu hospedeiro ou nas suas proximidades, geralmente em grande quantidade em um mesmo local. Seu ciclo de vida é constituído por várias fases de ninfa e os adultos realizam várias alimentações durante a vida. A alimentação é rápida em comparação aos Ixodídeos, podendo durar de minutos à horas. A cópula é realizada após as alimentações (Figura 6) e as fêmeas não morrem após a oviposição. A expectativa de vida dos espécimes pode chegar a décadas em condições de laboratório (38).

Evans e colaboradores (27) revisaram os registros presentes na literatura dessa espécie de carrapato, onde descrevem espécimes coletados de vários tipos de habitações humanas em condições precárias e arredores e em buracos e tocas de zorrilho (*Conepatus* sp.) e queixada (*Tayassu tajacu*), em São Francisco de Paula (39-42). Essa espécie é bem documentada como abundante apenas nesta única e característica localização climática (Campos de Cima da Serra). Suas picadas causam irritação grave aos seres humanos. Os focos deste carrapato incluem porões de casas rústicas abandonadas, onde os porcos domésticos e selvagens às vezes se abrigam (27).

Em 2011, Martins e colaboradores (43) relataram, depois de mais de 50 anos sem registros científicos, a presença de *O. brasiliensis* em São Francisco de Paula, RS. Após esse registro, novos casos de parasitismo foram relatados, com a descrição da toxicose causada pela picada de *O. brasiliensis* em animais e humanos (38,44).

Sabe-se que o homogenato da glândula salivar de *O. brasiliensis* inibe a proliferação endotelial, um passo crucial na cicatrização de feridas (45). Além disso, em ratos experimentalmente parasitados por *O. brasiliensis*, uma grande lesão hemorrágica foi observada nos locais de fixação (Figura 7), juntamente com uma tendência de sangramento aumentada 6 horas após a picada. Amostras de sangue de ratos infestados apresentaram alterações significativas na contagem de eosinófilos, basófilos, na creatina fosfoquinase (CPK), na fração CPK MB, na atividade da lactato desidrogenase (LDH) e no nível de fibrinogênio. A análise histopatológica revelou acentuada hemorragia subcutânea, edema e leve degeneração muscular no local da picada. Além disso, degeneração muscular e necrose foram observados no miocárdio de ratos 72 h após as picadas (46).

Em relação ao ciclo de *O. brasiliensis*, as larvas não se alimentam e cinco estágios ninfais (N1, N2, N3, N4 e N5) foram observados, sendo que a emergência de adultos começou a partir do estágio ninfal 3 (N3). A proporção de fêmeas em relação aos machos aumenta com o desenvolvimento dos estágios ninfais sendo que o estágio ninfal 5 (N5) produz apenas fêmeas. O período pré-ecdise das ninfas varia de 31,1 a 38,6 dias. A duração média do ciclo de vida (ovo a ovo) de *O. brasiliensis* foi de 215,4 dias para a primeira geração e 195 dias para a segunda (47).



Figura 6: *Ornithodoros brasiliensis* copulando. Fonte: Arquivo pessoal.



Figura 7: Lesões em ratos Wistar provocadas pela alimentação experimental de *O. brasiliensis*. Fonte: Arquivo pessoal.

1.1.2 Bactérias associadas a carrapatos

A coleção de microrganismos comensais, simbióticos e patogênicos que ocupam diversos nichos do nosso corpo é chamada microbioma, um termo cunhado originalmente por Joshua Lederberg (48,49). Ao longo da história evolutiva dos seres vivos, estabeleceram-se relações entre os metazoários e pequenos ou grandes consórcios de microrganismos, que proporcionaram uma melhora na saúde e favoreceram a sobrevivência neste planeta (49). Os artrópodes não são exceção e a literatura é rica em exemplos de várias associações artrópodes-microbiota que modulam os aspectos essenciais do ciclo de vida dos artrópodes, incluindo aptidão reprodutiva, sobrevivência e competência vetorial (50-52). Estima-se que a compreensão do microbioma de artrópodes no contexto de sua sobrevivência e transmissão de patógenos pode estimular uma nova geração de estratégias de controle de vetores e patógenos por eles transmitidos (49).

A ecologia das doenças transmitidas por vetores motiva muitos estudos microbiológicos a partir de carrapatos, que frequentemente usam ensaios específicos para o levantamento da presença de patógenos conhecidos de vertebrados. No entanto, muitos patógenos não são nem prevalentes na população do vetor (53), nem abundantes dentro dos carrapatos (54), podendo representar apenas uma minoria no microbioma do parasito. Isto sugere que as interações entre agentes patogênicos de vertebrados e outras bactérias mais comuns e abundantes encontradas nos carrapatos podem ser importantes para a prevalência e distribuição de carrapatos infectados com agentes patogênicos no ambiente. Além dos agentes patogênicos, outros microrganismos coexistem em carrapatos, como endossimbiontes, comensais ou microrganismos adquiridos a partir do sangue de animais hospedeiros (55,56).

A disponibilidade de técnicas de genética molecular, tais como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e a PCR em tempo real têm aumentado o número de relatos sobre a ocorrência de uma variedade de microrganismos em carrapatos (55,57,58), no entanto, suas interações biológicas e potencial de causar doença em mamíferos continuam a ser pouco compreendidas. As investigações sobre as comunidades microbianas completas associadas com carrapatos até agora têm contado principalmente com técnicas tradicionais ou moleculares de baixo rendimento, tais como a cultura ou métodos baseados em apenas uma fração do microbioma (58-61). Com o advento de técnicas como DNA *metabarcoding*, as limitações destes métodos foram superadas, permitindo a identificação de comunidades microbianas inteiras associadas com o hospedeiro. Segundo Bacci e colaboradores (62), o bacterioma pode ser definido como a coleção de todos os táxons bacterianos presentes em determinada amostra ambiental. Como resultado do rápido desenvolvimento do sequenciamento de alto rendimento, a análise de DNA *metabarcoding* tornou-se uma estratégia experimental viável para explorar a estrutura e função de comunidades microbianas.

DNA *metabarcoding* é um método rápido de análise da biodiversidade que combina duas tecnologias: taxonomia molecular e sequenciamento de DNA de alto rendimento (63). Sendo assim, esta técnica utiliza *primers* de PCR universais para amplificação em massa de um gene taxonomicamente informativo a partir de coleções de massa de organismos ou de DNA ambiental. O produto de PCR é analisado em um sequenciador de alto rendimento e a saída é uma longa lista de sequências de DNA. Em seguida, o conjunto de sequências é agrupado em “Unidades Taxonômicas Operacionais”, ou OTUs, cada uma das quais idealmente deve conter apenas as sequências de uma espécie. Por fim, uma sequência representativa é tomada a partir de

cada OTU e é atribuída uma taxonomia utilizando uma ou mais bases de dados para comparação das sequências (Figura 8) (63).

A análise de sequências de DNA codificadoras de RNA ribossômico da subunidade 16S (rRNA 16S) é uma abordagem que pode ser usada para detectar bactérias não cultiváveis (64), podendo revelar populações inteiras contidas em vetores, como os carrapatos. A combinação dos métodos acima, juntamente com o aumento do número de dados genômicos de agentes patogênicos transmitidos por carrapatos, permite explorar a diversidade taxonômica de sistemas biológicos complexos, como os carrapatos-hospedeiros-doenças vetoriais (65).

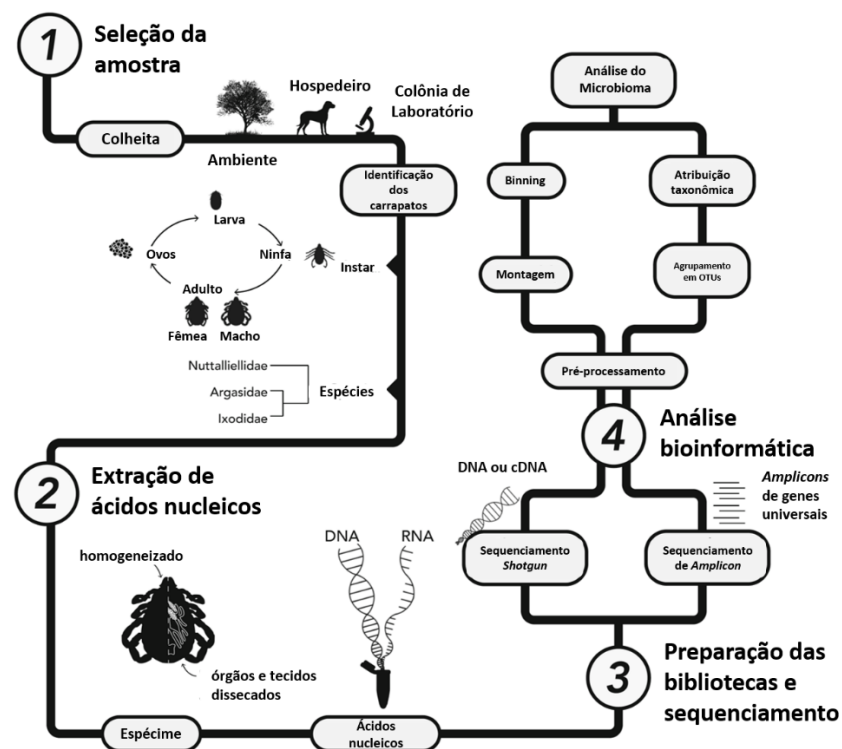


Figura 8: Esquema do fluxo de trabalho do Sequenciamento de Nova Geração para estudar o microbioma de carrapatos. Fonte: (66).

Microrganismos que habitam carrapatos não são apenas diversos taxonomicamente, eles também são ecologicamente diversos (67). Essa diversidade é

claramente ilustrada pelo grande painel de estratégias, selecionadas naturalmente ao longo da evolução, que os microrganismos usam para infectar e persistir nas populações de carrapatos. Como patógenos de vertebrados, os patógenos transmitidos por carrapatos normalmente se disseminam através da transmissão infecciosa (horizontal) através da picada do carrapato e da alimentação sanguínea. Alguns patógenos transmitidos por carrapato também podem ser transmitidos verticalmente em carrapatos e, assim, mantidos em cada geração, como observado para as espécies de *Babesia* (68), *Rickettsia rickettsii* (31) ou alguns vírus (69).

Outros microrganismos de carrapatos são simbioses intracelulares altamente especializados, dependendo quase exclusivamente da transmissão materna (transovariana) para sua persistência nas populações de carrapatos (67). A diversidade de microrganismos em carrapatos é ainda aumentada devido ao fato de que microrganismos ambientais também podem colonizar carrapatos: microrganismos presentes nas superfícies de pele de vertebrados podem colonizar carrapatos durante o repasto sanguíneo, enquanto aqueles presentes no solo ou vegetação podem colonizar carrapatos no chão, fora de seus hospedeiros vertebrados (49). Em geral, a diversidade de interações entre microrganismos e seus hospedeiros cria uma complexa rede que oferece excelentes oportunidades para abordar questões sobre o impacto de comunidades microbianas inteiras na biologia de carrapatos e, conseqüentemente, no seu potencial para a transmissão de patógenos (Figura 9) (67).

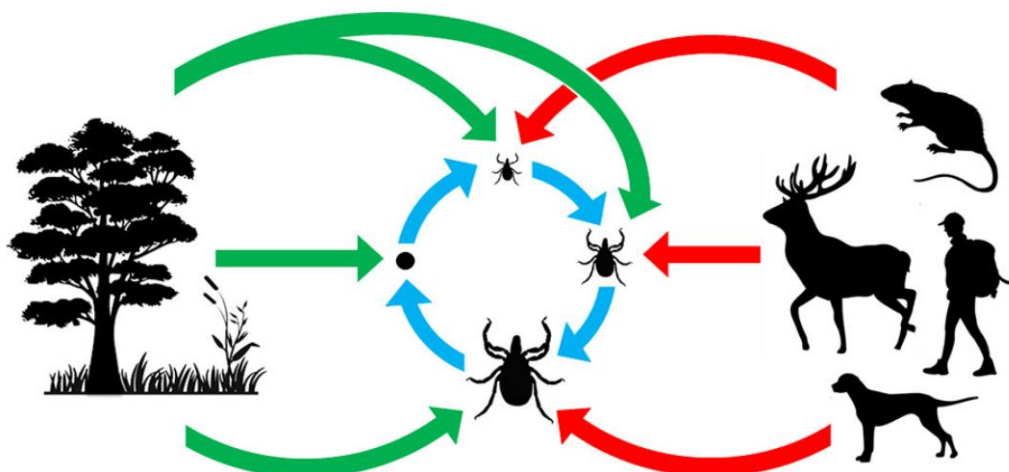


Figura 9: Origem e aquisição de microrganismos em carrapatos. Setas vermelhas: patógenos de vertebrados adquiridos através de picadas de carrapatos; setas azuis: simbiontes de carrapatos herdados pela mãe adquiridos via transmissão transovariana e transestadial; setas verdes: microrganismos adquiridos do meio ambiente. Fonte: (67).

1.1.2.1 Simbiontes

Chamamos de "simbiose" qualquer interação de longo prazo entre dois organismos de diferentes espécies, sendo essa interação evolutivamente benéfica para uma espécie e benéfica ou neutra para a outra espécie. No primeiro caso, a interação simbiótica pode ser chamada de “mutualismo”, enquanto no segundo caso é chamada de “comensalismo” (70). No entanto, não há barreiras claras entre essas possíveis interações, podendo ser modificadas com o passar do tempo. Na natureza, as espécies não vivem sozinhas, mas interagem com outras, e suas interações podem ter um forte impacto em suas histórias evolutivas. A simbiose, amplamente definida como “viver junto”, é hoje reconhecida como uma das principais forças que moldam a vida em nosso planeta, pois o destino evolutivo dos membros de uma associação estável é

mutuamente dependente, levando em alguns casos a cocladogênese (71), ou seja, especiação concomitante.

Considera-se que endossimbiontes riquetsiais alterem a fisiologia do carrapato e a transmissão de patógenos riquetsiais, como visto pela relação inversa entre a prevalência de infecção por *R. rickettsii* (patogênica) e *Rickettsia peacockii* (simbionte) em *Dermacentor andersoni* (72,73). Estas observações colaboram com a hipótese de que a presença de endossimbiontes específicos pode modular a capacidade vetorial do carrapato (49). Noda e colaboradores (55) mostraram, usando sequenciamento de 16S rDNA, que em *Ornithodoros moubata*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Haemaphysalis longicornis*, o simbionte bacteriano encontrado em ovários e túbulos de Malpighi estava intimamente relacionado com *Coxiella burnetii*, um patógeno de mamíferos. Além disso, ovários e túbulos de Malpighi de *O. moubata* também abrigam um endossimbionte intimamente relacionado com *Francisella tularensis*, outro patógeno de mamíferos (49,74). Endossimbiontes *Francisella*-like também foram identificados em vários carrapatos do gênero *Dermacentor* (49,75).

Zhong e colaboradores (76) demonstraram, usando antimicrobianos para eliminar endossimbiontes dos carrapatos, que *Coxiella* spp. de *Amblyomma americanum* era provavelmente crucial para a sobrevivência do carrapato. Além disso, a presença dos endossimbiontes *Coxiella* spp. nas glândulas salivares de *A. americanum* prejudicou a transmissão de patógenos horizontalmente adquiridos tais como *Ehrlichia chaffeensis* (77). A análise filogenética de *Coxiella* spp. isoladas de diferentes carrapatos mostrou clados filogenéticos distintos, sendo que cada clado foi específico para as espécies de carrapatos, independentemente da localização geográfica (49,73).

Em *Ixodes ricinus*, bactérias foram observadas nas mitocôndrias de ovários (78). Bactérias da classe α -Proteobacteria nomeadas *Midichloria mitochondrii* (79)

colonizam a mitocôndria das células que revestem os oócitos, se propagam dentro das membranas interna e externa da mitocôndria e aparentemente consomem a organela (49,80). Cerca de 94 a 100% das fêmeas adultas de *I. ricinus* coletadas em campo estavam infectadas com esta bactéria (78,81) e a taxa de transmissão transovariana foi de 100%. Apesar do aparente parasitismo, os oócitos se desenvolveram normalmente em carrapatos infectados com *M. mitochondrii*. A distribuição, prevalência e transmissão transovariana deste endossimbionte em *I. ricinus* sugeriu que essa associação pode ser obrigatória e têm um potencial papel no *fitness* do vetor. Curiosamente, em colônias de *I. ricinus* desenvolvidas em laboratório, a prevalência deste endossimbionte mitocondrial diminuiu consideravelmente (81), sugerindo que a vantagem para o carrapato vetor pode ser revelada apenas em um ambiente de campo (49). Carrapatos do gênero *Ixodes*, *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, e *Dermacentor* também abrigam bactérias endossimbióticas relacionadas que infectam as mitocôndrias ovarianas (56). Mais importante ainda, o endossimbionte previamente pensado como restrito aos ovários foi também observado nas glândulas salivares de alguns carrapatos *I. ricinus*. Além disso, os seres humanos e animais picados por estes carrapatos foram soropositivos para os antígenos bacterianos endossimbiontes (49,82,83).

Outro endossimbionte frequentemente identificado em ixodídeos, incluindo *I. ricinus*, *Amblyomma* spp. e *Dermacentor* spp. é *Arsenophonus*-like (84-86). *Arsenophonus* spp. pertence à classe γ -Proteobacteria, está amplamente distribuído em insetos (87) e se presume estar envolvido em distorção de proporção sexual (88). Estudos recentes também demonstram a presença de *Wolbachia* spp. em *I. ricinus* (89), *I. scapularis* (57) e *A. americanum* (90).

Muitos endossimbiontes de carrapatos transmissíveis verticalmente, potencialmente por via transovariana, são semelhantes a patógenos transmitidos por

carrapatos (*Coxiella*-like, *Rickettsia*-like ou *Francisella*-like), sugerindo que a origem ancestral desses endossimbiontes poderia ter sido patógenos de vertebrados adquiridos pelo carrapato enquanto alimentava-se de um hospedeiro infectado. Sugere-se que estes patógenos tenham evoluído ao longo de duas linhas: uma adaptada especificamente ao ambiente do carrapato, tornando-os confinados aos tecidos do artrópode e uma segunda em que o microrganismo se adaptou a ambos, carrapato e hospedeiro vertebrado (49,55).

Devemos também considerar a possibilidade de que endossimbiontes podem ter evoluído tornando-se patógenos virulentos de mamíferos (91). Sob condições que continuam a ser não compreendidas, endossimbiontes comensais podem emergir como patógenos de vertebrados. Isto sugere que estes endossimbiontes aparentemente benignos devem realmente ser considerados como potenciais patobiontes aguardando um gatilho molecular, propiciando o desenvolvimento do seu potencial patogênico (49). A presença de endossimbiontes comensais estreitamente relacionados com bactérias patogênicas também tem sido proposta para servir como uma barreira no hospedeiro invertebrado contra infecções por estas bactérias patogênicas (73,92,93). Compreender os mecanismos pelos quais endossimbiontes podem oferecer essa vantagem seletiva para hospedeiros invertebrados pode revelar novas estratégias para controlar patógenos transmitidos por carrapatos (49).

Em todas as espécies de ixodídeos, as bactérias do filo Proteobacteria predominam seguido por Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Representantes bacterianos dos filos Acidobacteria, Cyanobacteria, Fusobacteria e TM7 também são observados em proporções menores em alguns estudos (94,95). Tanto bactérias aeróbias como anaeróbias foram observadas, e bactérias Gram-negativas predominaram no bacterioma de carrapatos (57). Em nível de gênero, alguns membros são

representativos de espécies de carrapatos, independentemente das suas localizações geográficas, incluindo *Rickettsia* sp. e *Coxiella* sp. em *A. americanum* (86,96,97) e *Rhipicephalus* spp. (98); *Rickettsia* sp. em quase todas as espécies de *Ixodes* spp. (57,58,95,99-103); e *Wolbachia* sp. em *I. ricinus* (58,100), *A. maculatum* e *R. microplus* (94,104). Desta forma, possivelmente estas bactérias sejam endossimbiontes obrigatórios destas espécies de carrapatos (49). No geral, além de endossimbiontes intracelulares obrigatórios, vários gêneros de bactérias são observados com maior frequência em várias espécies de ixodídeos e incluem *Pseudomonas*, *Sphingobacterium*, *Acinetobacter*, *Enterobacter* e *Stenotrophomonas*, podendo representar microorganismos com uma maior capacidade para colonizar espécies de carrapatos (49).

Em um estudo do microbioma de *Ixodes persulcatus* de áreas de floresta da China (105), foram observados mais de 200 gêneros de bactérias em adultos não alimentados e alimentados. Quando o sangue de ratos em que estes carrapatos foram alimentados foi avaliado, vários gêneros bacterianos encontrados em carrapatos também foram encontrados no sangue dos hospedeiros, indicando que pelo menos alguns desses componentes do microbioma dos carrapatos também foram provavelmente transmitidos para o hospedeiro mamífero (105).

Zhong e colaboradores (76) demonstraram que eliminando os endossimbiontes de carrapatos *Amblyomma* sp. foi observado um prolongamento do tempo para oviposição, diminuição da eclosão dos ovos e diminuição da sobrevivência das larvas. Além disso, existem bactérias que podem suplementar deficiências nutricionais não supridas pelo sangue de mamíferos, tais como o endossimbionte *Wigglesworthia* spp., que fornece vitamina B para a mosca tsé-tsé (*Glossina* spp.) (106). Entender como o carrapato adquire a sua microbiota e como a composição do microbioma é formada a partir dos

vários fatores ambientais e genéticos é essencial para começar a explorar a microbiota do carrapato, assim como para controlar a população de carrapatos e inviabilizar a transmissão de patógenos (49).

Um dos principais endossimbiontes de carrapatos é *Coxiella* spp. O gênero *Coxiella* é composto pela espécie patogênica *Coxiella burnetii* e por *Coxiella* endossimbionte (CE). Várias espécies de carrapatos abrigam bactérias patogênicas e não patogênicas que estão intimamente relacionadas ao gênero *Coxiella* (107). CE é encontrada apenas em carrapatos e infecta pelo menos dois terços das espécies (67). CE foi identificada em carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Ornithodoros*, *Argas* e *Carios*, sendo o mais comum simbiote maternalmente transmitido (transmissão vertical) em carrapatos (107). CE tem sido relatada como essencial para a sobrevivência e reprodução de carrapatos em *A. americanum* (76). Como um simbiote obrigatório, CE está, por definição, presente na maioria dos indivíduos de uma dada espécie de carrapato (86,108-111): assim, sua relação mutualística é necessária para a sobrevivência de ambos os organismos (111). Essas associações tipicamente exibem cocladogênese estrita, resultando em filogenias simbiote-hospedeiro congruentes, como observado recentemente entre membros do gênero *Rhipicephalus* e suas bactérias CE associadas (111). A descoberta de CE em numerosos outros grupos de carrapatos (86,96,108,109,111-114) indica que é o simbiote de carrapato mais difundido e biologicamente relevante. Um exame da localização intra-hospedeiro de CE revelou um pronunciado tropismo tecidual em todas as espécies de carrapatos examinados. Esse simbiote normalmente infecta os ovários e a parte distal dos túbulos de Malpighi, sugerindo um possível papel na nutrição, osmorregulação ou excreção (77,98,108). A análise de ovos de várias espécies de carrapatos confirmou que CE é transmitida para mais de 99% da progênie dos

carrapatos, demonstrando transmissão materna altamente eficiente (98,108,114). Notavelmente, o genoma de CE codifica moléculas envolvidas nas vias principais de síntese de vitamina B, como biotina (vitamina B7), ácido fólico (B9), riboflavina (B2) e seus cofatores, que não são usualmente obtidos em quantidades suficientes a partir de uma dieta exclusivamente sanguínea (115,116). Ao proporcionar a suplementação nutricional da dieta sanguínea, as bactérias CE permitiram que os carrapatos utilizassem um recurso alimentar desbalanceado, os quais tornaram-se assim, especialistas em hematofagia (67).

Sugere-se que os simbioses de artrópodes de herança materna não possam invadir os hospedeiros *naïve* e evoluíram para serem dependentes de mecanismos de transmissão baseados através da herança transovariana (117,118). No entanto, alguns simbioses de carrapatos, como certas cepas de *Coxiella* sp., *Midichloria* sp. e *Arsenophonus* sp. não são totalmente dependentes de carrapatos. Em vez de estritamente materna, sua transmissão pode ser parcialmente horizontal, ou seja, infecciosa, apresentando assim um risco substancial de infecção para vertebrados (67). Entre estes simbioses, CE são os microrganismos mais comumente encontrados em vertebrados. De fato, relatou-se, recentemente, que CE transmitida por carrapatos causa sintomas infecciosos leves em humanos na Europa (119). Estes microrganismos foram detectados em amostras de biópsia de pele humana e podem ser um agente causador comum de escaras no couro cabeludo e de linfadenopatia cervical. Infecções por CE também foram ocasionalmente relatadas em aves de estimação, como psitacídeos e tucanos criados na América do Norte (120-122). Nestes últimos CE pode causar doença fatal: aves infectadas exibiram letargia, fraqueza, emaciação e sinais neurológicos progressivos por vários dias antes da morte. Por outro lado, outra CE foi identificada

em várias amostras de sangue de cavalos sul-coreanos mas nenhum dos equinos apresentou sintomas aparentes de infecção (67,123).

A capacidade de CE de infectar vertebrados através da picada de carrapatos é explicada, pelo menos parcialmente, pelo tropismo tecidual no corpo do carrapato. Além dos ovários de carrapato e dos túbulos de Malpighi, o exame dos órgãos internos também revelou concentrações substanciais de CE nas glândulas salivares de algumas espécies de carrapatos (77,103,108) mas não em outros (98,124). Este tropismo de tecido pode permitir a liberação de CE no vertebrado durante a picada do carrapato, favorecendo infecções oportunistas (114). A probabilidade geral de tais transferências de CE de carrapatos para vertebrados parece alta, pois: (i) os carrapatos são encontrados em todo o mundo e se alimentam de muitas espécies de vertebrados diferentes; (ii) pelo menos dois terços das espécies de carrapatos são infectados por CE; e (iii) quando presentes em uma determinada espécie de carrapato, a CE geralmente está presente em quase todos os espécimes (114). No geral, estas observações sugerem que, através do parasitismo por carrapatos, os vertebrados são frequentemente expostos a CE e, provavelmente, em uma taxa mais elevada do que a de patógenos transmitidos por carrapatos. No entanto, apesar disso, as infecções por CE são muito raras em vertebrados, e a maioria das cepas descritas até o momento só foram identificadas a partir de carrapatos (114). Assim, sugere-se que estas bactérias representam um baixo risco de infecção para os vertebrados porque o seu genoma parece ser extremamente reduzido e é desprovido de genes de virulência conhecidos (115,116). No entanto, embora raras, CE tem o potencial de causar infecções em vertebrados e deve ser sempre considerada em estudos futuros (67).

O gênero *Francisella* é composto por bactérias patógenos de mamíferos e peixes e por simbiontes de carrapatos. Nos últimos anos, uma série de trabalhos têm mostrado

que *Francisella* endossimbionte (FE) tem importantes funções para a manutenção de funções vitais nos carrapatos. Em um experimento, Duron e colaboradores (125) trataram espécimes do carrapato africano *Ornithodoros moubata* com antibióticos para eliminar FE. Os antibióticos suprimiram drasticamente populações de FE em carrapatos tratados e dificultaram o surgimento de fêmeas adultas e diminuíram drasticamente o surgimento de machos. As ninfas exibiram anormalidades físicas com corpos escuros e inflados. Este efeito do antibiótico não foi observado quando vitaminas do complexo B foram adicionadas à refeição de sangue, demonstrando que simbiontes do gênero *Francisella* são importantes fornecedores de vitaminas do complexo B para carrapatos da espécie *O. moubata*. Exames posteriores de machos tratados com antibióticos e não suplementados com vitaminas do complexo B mostraram que eles eram mais leves que os machos não tratados. A taxa de mortalidade observada para os carrapatos tratados apenas com antibióticos foi de 15,8%, enquanto, nos outros grupos que não foram tratados com antibióticos ou tratados com antibióticos, mas suplementados com vitamina B, foi menor do que 5,1%.

Bactérias FE são raras em carrapatos e não são encontradas em outros artrópodes (67). Os genomas de *Francisella* sp. do carrapato *Argas persicus* e de *A. maculatum* contêm vias genéticas completas para biossíntese de biotina, ácido fólico e riboflavina (67,126,127). Cabe ressaltar que, em *Francisella* sp., o padrão evolutivo é substancialmente diferente, uma vez que a maior parte da diversidade encontrada neste gênero é devida às espécies patogênicas ou oportunistas (126). Muito pouco se sabe sobre a evolução e origem de FE (111,127,128), no entanto, as poucas espécies de FE identificadas até o momento delineiam um único clado monofilético que claramente se originou de formas patogênicas (111). Curiosamente, o genoma de FE é semelhante em tamanho aos genomas das espécies de *Francisella* patogênicas, mas cerca de um terço

dos genes codificadores de proteínas são pseudogenes e provavelmente não-funcionais (127). Isto sugere que a bactéria FE está passando por um processo global de redução do genoma, um desenvolvimento evolutivo tipicamente observado em simbioses de herança materna (117). Curiosamente, FE conservou intactos a maioria de seus genes envolvidos na biossíntese da vitamina B, destacando o papel fundamental que esses genes desempenham na adaptação à vida como endossimbionte (67,127).

Gerhart e colaboradores (127), analisaram o microbioma de *A. maculatum* e descobriram que FE domina o microbioma dessa espécie de carrapato. A bactéria FE compartilha um ancestral comum recente com espécies de *Francisella* que são patogênicas para mamíferos, com a exclusão de espécies de *Francisella* aquáticas que são patogênicas para peixes. A bactéria FE contém versões pseudogenizadas de vários genes de virulência, incluindo genes para um Sistema de Secreção Tipo VI presente em uma ilha de patogenicidade em *F. tularensis* e para pili Tipo 4, que são críticos para infecção de mamíferos. Esses dados indicam que o ancestral de FE foi provavelmente um patógeno de mamíferos que continha versões funcionais de genes de virulência (Figura 10) (127).

O genoma de FE tem aproximadamente 80% do tamanho do genoma do patógeno mamífero *F. tularensis*, e uma porção significativa (33%) de seus genes codificadores de proteínas contém mutações inativadoras. O grau de evolução do genoma redutor em FE é muito menor do que o que é usualmente observado em endossimbiontes de longo prazo, como CE em *A. americanum*, e a presença de grande número de pseudogenes implica que a bactéria está nos estágios iniciais da evolução reductiva, à medida que os genes supérfluos são primeiro convertidos em pseudogenes e, em última análise, excluídos do genoma quando uma bactéria passa de um estilo de vida livre para um estilo de vida associado ao hospedeiro (Figura 10). Além disso, os genomas

endossimbiontes tendem a apresentar uma proporção maior de A+T em seu genoma do que patógenos intimamente relacionados ou bactérias ambientais; no entanto, a composição nucleotídica (G + C%) de FE é muito semelhante à de *F. tularensis* (32,3% e 31,8%, respectivamente). Essas características indicam coletivamente que FE se transformou recentemente em um endossimbionte (127).

Apesar desta significativa quantidade de informações sobre a microbiota de carrapatos, elas são oriundas principalmente de espécies que ocorrem na América do Norte, Europa e Ásia, sendo que, até o momento, existem poucas informações sobre microbiomas de espécies de carrapatos que ocorrem no Brasil, um país com 73 espécies de carrapatos descritas, ou mesmo qualquer área da região Neotropical.

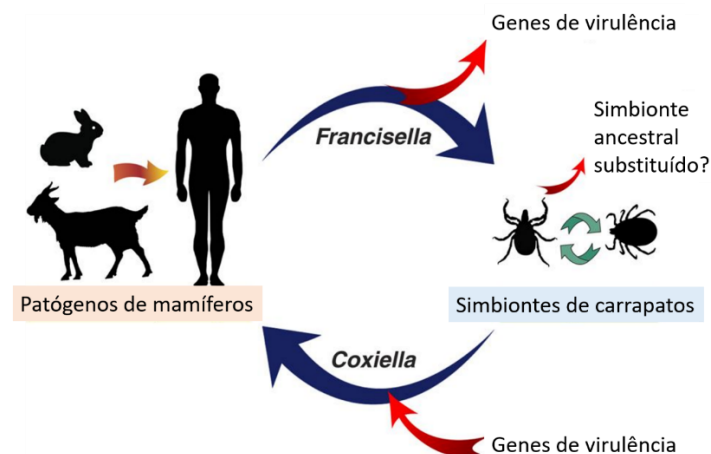


Figura 10. Evolução dos patógenos de mamíferos e simbioses de carrapatos. Patógenos de mamíferos podem evoluir a partir de bactérias associadas a carrapatos, adquirindo genes de virulência (por exemplo, *Coxiella burnetii*). Por outro lado, a evolução de endossimbiontes de carrapatos a partir de patógenos de mamíferos está associada à perda de genes de virulência. Fonte: (127).

1.1.2.2 Patógenos

As espécies de *Rickettsia* são, tradicionalmente, divididas nos seguintes grupos: Febre Maculosa, Tifo, Transicional e Ancestral (129). O Grupo causador da Febre Maculosa é composto pelas espécies geralmente transmitidas por carrapatos como *R. rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira. Os principais representantes do Grupo Tifo são *R. typhi*, causadora do Tifo murino e transmitida principalmente por pulgas, e *R. prowazekii*, agente etiológico do Tifo epidêmico e transmitida por pulgas e piolhos. Fazem parte do Grupo Transicional, *R. felis* transmitida por pulgas e *R. akari* transmitida por ácaros. O grupo ancestral tem como principais representantes as espécies não patogênicas ou de patogenicidade desconhecida como *R. bellii* e *R. canadenses* (129).

No Grupo Febre Maculosa, *R. rickettsii* é a espécie mais patogênica para o ser humano, sendo o agente causador da doença conhecida como *Rocky Mountain Spotted Fever* nos Estados Unidos da América (EUA) e Febre Maculosa Brasileira no Brasil. Os principais vetores de *R. rickettsii* nos EUA são *Dermacentor variabilis* e *Dermacentor andersoni*, mas também pode ser transmitida por *Rhipicephalus sanguineus* (130). No Brasil, o carrapato *Amblyomma sculptum* é vetor de *R. rickettsii* no bioma Cerrado, enquanto que nas áreas pertencentes à Mata Atlântica da região metropolitana de São Paulo, *A. aureolatum* atua como o principal vetor (131).

Dentro do Grupo Febre Maculosa e com importância para o Brasil, existe ainda a espécie *Rickettsia parkeri*. A bactéria *R. parkeri* é responsável por causar uma doença com sintomatologia mais branda em comparação a rickettsiose causada por *R. rickettsii*, no entanto, não menos importante. Trabalhos recentes comprovam que existem várias

cepas de *R. parkeri* no Novo Mundo (132). A espécie *R. parkeri* sensu stricto (s.s.) ocorre nos EUA, Uruguai, Argentina, Brasil, Bolívia e Peru e é transmitida por carrapatos do complexo *Amblyomma maculatum* (*Amblyomma maculatum*, *Amblyomma triste* e *Amblyomma tigrinum*). Já a espécie *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica ocorre no Brasil, Colômbia e Belize e seus vetores são carrapatos do complexo *Amblyomma ovale* (*Amblyomma ovale* e *Amblyomma aureolatum*). Essas duas cepas são patogênicas para humanos. Outras duas cepas foram descritas, porém com patogenicidade desconhecida: *Rickettsia parkeri* cepa NOD em *Amblyomma nodosum* no Brasil e *Rickettsia parkeri* cepa Parvitarsum em *Amblyomma parvitarsum* na Argentina e no Chile (132).

No Rio Grande do Sul, casos clínicos estão relacionados com *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica transmitida por *A. ovale* na área do bioma Mata Atlântica (133,134) e com *Rickettsia parkeri* s.s. potencialmente associada a *A. tigrinum* e *Amblyomma dubitatum* no bioma Pampa (135,136). A espécie *R. parkeri* s.s. também foi encontrada em carrapatos *Haemaphysalis juxtakochi* no Rio Grande do Sul (137).

Outro gênero bacteriano transmitido por carrapatos de grande importância como patógeno humano é *Borrelia* spp. As espécies patogênicas são divididas em dois grupos: o grupo da Doença de Lyme e o grupo da Febre Recorrente. A doença de Lyme é causada por bactérias do complexo *Borrelia burgdorferi* sensu lato e ocorre predominantemente em regiões temperadas do hemisfério norte, sendo causada principalmente pela bactéria *Borrelia burgdorferi* sensu stricto na América do Norte e *Borrelia afzelii* ou *Borrelia garinii* na Europa e Ásia (138). As bactérias *Borrelia burgdorferi* s.l. são transmitidas por carrapatos do complexo *Ixodes ricinus*. Na Europa, o principal vetor é *I. ricinus*, que transmite as três principais genoespécies patogênicas de *B. burgdorferi* s.l. O carrapato *Ixodes persulcatus*, é encontrado no oeste da Rússia,

nos países bálticos, partes da Finlândia, regiões centrais da Rússia oriental, norte da Mongólia, China e Japão. Este carrapato transmite *Borrelia afzelii* e *Borrelia garinii*. Na Europa oriental, *I. ricinus* e *I. persulcatus* se sobrepõem. Na América do Norte, os principais vetores são *Ixodes scapularis* no leste e centro-oeste dos Estados Unidos e em algumas áreas no centro-sul e sudeste do Canadá e *Ixodes pacificus* no oeste dos Estados Unidos. Ambos os carrapatos transmitem *B. burgdorferi* s.s. Dentro dessas áreas amplas, a abundância de carrapatos e a prevalência de infecção variam amplamente e são influenciadas pelo microclima, a vegetação, a abundância de hospedeiros e de vertebrados reservatórios (138).

Na América do Sul o material genético de *Borrelia burgdorferi* sensu lato tem sido detectado em carrapatos do gênero *Ixodes* desde 2013. No Uruguai *B. burgdorferi* s.l. foi detectada em *Ixodes aragaoi* (139). Após esse relato, vários haplótipos de *B. burgdorferi* s.l. foram recentemente registrados em *I. pararicinus*, *Ixodes cf. neuquenensis* e *Ixodes sigelos* e *Haemaphysalis juxtakochi* na Argentina (140-144). Além disso, o DNA de *Borrelia chilensis* foi detectado em amostras de carrapatos *Ixodes stilesi* (145,146) e *Borrelia* sp. em *Ixodes* sp. e *Ixodes auritulus* do Chile (147).

O grupo da Febre Recorrente (GFR), em geral, é formado por bactérias do gênero *Borrelia* associadas a carrapatos da Família Argasidae, porém existem algumas exceções como *Borrelia recurrentis* transmitida pelo piolho *Pediculus humanus*, *Borrelia miyamotoi* e *Borrelia lonestari* associadas aos carrapatos da família Ixodidae, *Ixodes* spp. e *Amblyomma americanum*, respectivamente (148,149). O GFR abrange quatro linhagens que também possuem características ecológicas comuns, incluindo a família do vetor (Ixodidae ou Argasidae) e/ou distribuição geográfica: [1] GFR do Velho Mundo (Old-World TBRF borreliae) [2] GFR do Novo Mundo (New-World TBRF borreliae), [3] GFR *Borrelia* aviária mundialmente distribuída (*Borrelia*

anserina) (the worldwide avian TBRF borreliæ) e [4] GFR transmitida por carrapatos da família Ixodidae (HTBRF group) (Figura 11) (150).

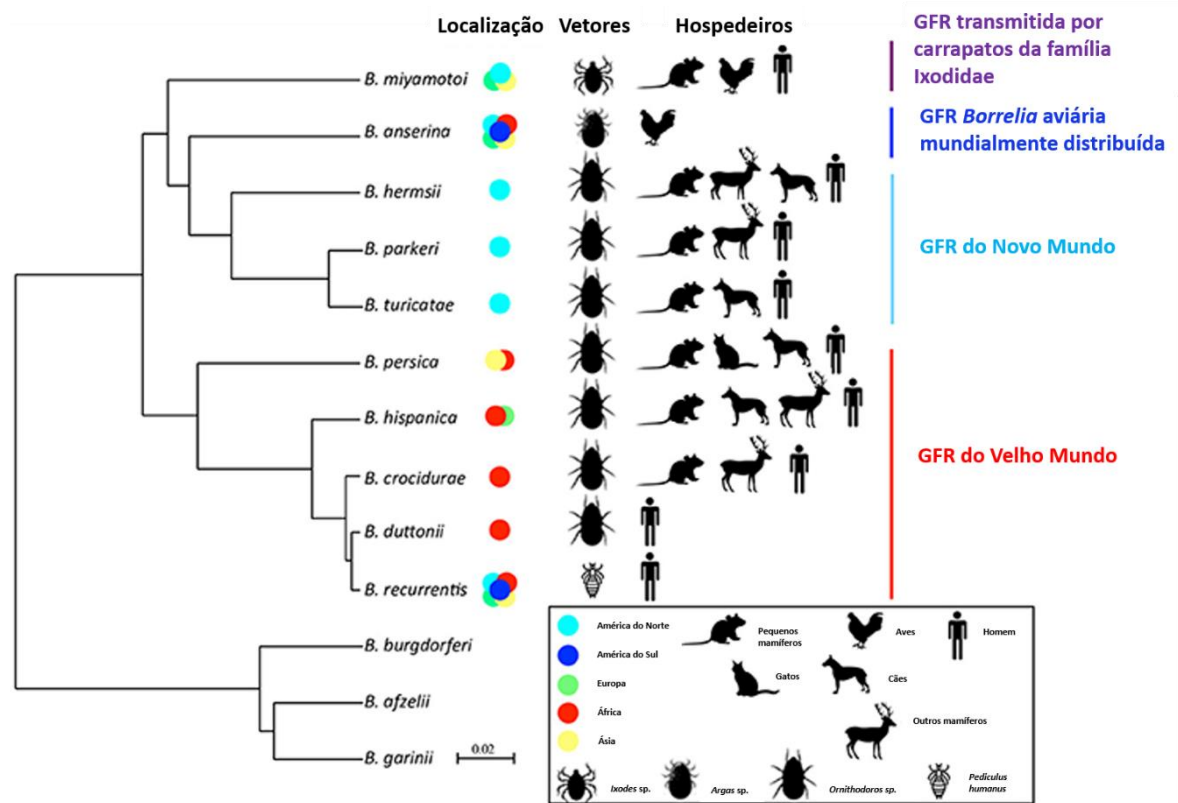


Figura 11: Linhagens de *Borrelia* do Grupo da Febre Recorrente, localização geográfica, vetores e hospedeiros. Fonte: (150).

A grande maioria das espécies de *Borrelia* do GFR são transmitidas por carrapatos do gênero *Ornithodoros*. Dentre as espécies de *Borrelia* spp. de importância para a saúde humana que fazem parte do GFR do Velho Mundo podemos citar como exemplos *Borrelia crocidurae* (1917) transmitida por *Ornithodoros sonrai*; *Borrelia duttonii* (1906) transmitida pelo complexo *Ornithodoros moubata* s.l.; *Borrelia hispanica* (1926) transmitida por *Ornithodoros erraticus* e *Ornithodoros marocanus*; e *Borrelia persica* (1913) transmitida por *Ornithodoros tholozani*. Já no GFR do Novo

Mundo temos *Borrelia brasiliensis* (1952) em *Ornithodoros brasiliensis*; *Borrelia hermsii* (1942) em *Ornithodoros hermsi*; *Borrelia parkeri* (1942) em *Ornithodoros parkeri*; *Borrelia turicatae* (1933) em *Ornithodoros turicata*; e *Borrelia venezuelensis* (1921) em *Ornithodoros rudis* (150).

Um outro patógeno bacteriano importante para mamíferos é *Francisella tularensis*. Essa espécie é dividida em três subespécies clinicamente relevantes: *tularensis* (tipo A), *holarctica* (tipo B), e *mediasiatica* (151,152). A subespécie *tularensis* está presente na América do Norte e é altamente virulenta para humanos e animais. A subespécie *holarctica* foi isolada na América do Norte e Eurásia e possui virulência moderada e a subespécie *mediasiatica* foi isolada da Ásia Central e as cepas também exibiram virulência moderada (153).

A tularemia é uma doença zoonótica conhecida desde o início do século passado. A doença foi descrita pela primeira vez por McCoy em roedores em 1911 (154) e o microorganismo causador, *Francisella tularensis*, foi posteriormente isolado de esquilos (155). A primeira descrição de caso humano bacteriologicamente confirmada ocorreu em 1914 (156). Esta espécie foi posteriormente isolada de centenas de espécies de animais (157) e vários vetores artrópodes foram identificados (158). Devido ao amplo espectro de potenciais vetores e hospedeiros e à complexa biologia do microorganismo causador, a compreensão detalhada da ecologia dessa bactéria ainda não está clara e muitas questões ainda estão abertas em relação à tularemia em animais, incluindo quais são espécies incidentais ou de reservatório (153).

O patógeno *Coxiella burnetii* é o agente etiológico da febre Q, ou “query fever”, uma zoonose descrita pela primeira vez na Austrália em 1937 (159). Casos de febre Q foram relatados em quase todos os lugares em que foram investigados, exceto na Nova Zelândia (159). Os principais reservatórios de *C. burnetii* são bovinos, ovinos e

caprinos. No entanto, nos últimos anos, um número crescente de animais foi relatado albergando a bactéria, incluindo mamíferos domésticos, mamíferos marinhos, répteis, carrapatos e aves (160). Os produtos do parto contêm a maior concentração de bactérias, mas *C. burnetii* também é encontrada na urina, nas fezes e no leite de animais infectados (161-163). A transmissão para o homem ocorre mais freqüentemente devido à inalação de bactérias em aerossóis que são disseminadas no ambiente por animais infectados após o parto ou aborto. Surto em larga escala podem ocorrer em nível de país, o que aconteceu na Holanda entre 2007 e 2010, com mais de 4.000 casos relatados (159). A espécie *C. burnetii* pode infectar uma ampla gama de hospedeiros vertebrados e invertebrados (164-166). Além disso, a bactéria pode persistir por períodos prolongados no ambiente, devido a um processo de pseudo-esporulação. Animais silvestres também podem constituir um reservatório, conforme ilustrado por um caso de febre Q aguda relatado após contato com cangurus e wallabies na Austrália (167) ou pelo envolvimento da preguiça de três dedos em Caiena, na Guiana Francesa (168). A bactéria *C. burnetii* também foi isolada em muitas espécies de carrapatos, sugerindo que esses artrópodes desempenham um papel na transmissão da mesma. Também, foi demonstrado que *C. burnetii* é capaz de crescer dentro de amebas, sugerindo uma participação desses hospedeiros na persistência ambiental da bactéria (159).

As cepas de *C. burnetii* foram primeiramente isoladas de carrapatos Ixodídeos: *Dermacentor andersoni* coletado em Montana e *Haemaphysalis humerosa* da Austrália (159). A hematofagia é o fator essencial para a aquisição de *C. burnetii* pelos artrópodes. Seguindo o padrão epidemiológico “clássico” de infecções zoonóticas, *C. burnetii* provavelmente circula entre os animais com a ajuda de vetores artrópodes hematófagos. No entanto, em contraste com o caso da maioria das doenças transmitidas por vetores, a presença de um vetor artrópode não é necessária para a transmissão do

agente infeccioso do reservatório para os mamíferos hospedeiros. Outro aspecto importante do ciclo epizoótico de *C. burnetii* é a ausência de qualquer especificidade de vetor. Esta bactéria foi isolada de mais de 40 espécies de carrapatos ixodídeos, pelo menos 14 espécies de carrapatos argasídeos e muitos outros artrópodes, incluindo percevejos, moscas e ácaros (159).

Tendo em vista a grande diversidade de bactérias que os carrapatos podem albergar e suas complexas relações com seus hospedeiros, torna-se necessário o aprofundamento do conhecimento sobre a microbiota dos carrapatos a fim de gerar novos subsídios para a prevenção e controle de doenças transmitidas por carrapatos.

1.2 Justificativa

A incidência (ou detecção) de casos de doenças transmitidas por carrapatos está aumentando no estado do Rio Grande do Sul (RS). No entanto, ainda existem várias lacunas na epidemiologia dessas doenças emergentes que necessitam ser preenchidas pois a maioria do conhecimento sobre essas enfermidades provém de outras áreas onde o clima, biomas, vetores e reservatórios são diferentes dos encontrados no RS. Por serem doenças de baixa prevalência e que afetam geralmente as populações mais pobres que vivem em áreas rurais, elas acabam sendo negligenciadas pelas políticas de saúde governamentais. Diante disso, estudos locais são necessários a fim de gerar conhecimento básico para fundamentar planos de ação para prevenção e controle dessas doenças.

A espécie *A. aureolatum* é amplamente distribuída no RS (24,27), sendo encontrada comumente em cães de áreas rurais e periurbanas do estado. Com o aumento da degradação ambiental, as oportunidades de contato dessa espécie de carrapato com seres humanos vêm aumentando, podendo os cães atuarem como “hospedeiros ponte” entre os carrapatos que se encontram na mata e os seres humanos. Existem vários registros do parasitismo humano por *A. aureolatum* na literatura (24,25) e esta espécie é o vetor comprovado de patógenos do gênero *Rickettsia* (33). Outra espécie de carrapato presente no RS é *O. brasiliensis*. Na região dos Campos de Cima da Serra, onde esta espécie é encontrada, é comum o relato de intenso parasitismo por esta espécie em moradores de áreas rurais (38). Além de causar um quadro de toxicose nos hospedeiros, *Borrelia brasiliensis* já foi encontrada nesta espécie de carrapato (41).

A utilização de ferramentas de análise por DNA *metabarcoding* propicia a identificação de um grande número de populações bacterianas presentes nos

organismos vivos, sendo muitas de difícil cultivo *in vitro*, que são ou podem vir a serem patogênicas para o hospedeiro vertebrado, incluindo o ser humano, quando este entra em contato com o carrapato vetor. Tendo em vista a falta de conhecimento sobre a microbiota de espécies de carrapatos do RS, espera-se com este trabalho caracterizar as populações bacterianas destes ectoparasitos e também identificar possíveis patógenos que possam ser transmitidos a humanos e animais. A análise das populações microbianas presentes nos carrapatos pode fornecer informações importantes para ajudar a prevenir as doenças emergentes, avaliar os riscos potenciais, e entender as interações entre simbiontes de carrapatos e patógenos.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Investigar os bacteriomas associados a duas espécies de carrapatos encontradas no Rio Grande do Sul.

1.3.2 Objetivos Específicos

1.3.2.1 Identificar os gêneros bacterianos, incluindo aqueles com importância em saúde pública, em carrapatos de uma espécie da família Ixodidae e de uma espécie da família Argasidae.

1.3.2.2 Identificar novas áreas de ocorrência desses parasitos.

1.3.2.3 Caracterizar individualmente, através do sequenciamento de regiões gênicas específicas, possíveis patógenos identificados na análise de DNA *metabarcoding*.

1.3.2.4 Realizar estudos sorológicos para averiguar a circulação desses patógenos em hospedeiros silvestres.

Capítulo 2

Artigo Científico 1

Artigo Científico 2

Artigo Científico 3

Esta seção está dividida em três artigos que compreendem a descrição do trabalho experimental da tese desenvolvido durante o período de execução do doutorado. Os resultados estão apresentados na forma de manuscritos preparados de acordo com normas de revistas científicas internacionais.

Molecular characterization of bacterial communities of two Neotropical tick species (*Amblyomma aureolatum* and *Ornithodoros brasiliensis*) using rDNA 16S sequencing

Artigo científico a ser submetido ao periódico científico *Microbial Ecology* publicado pela Springer.

Fator de impacto: 3.614

Guia dos autores:

https://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/248?detailsPage=pltdi_1809049

Molecular characterization of bacterial communities of two Neotropical tick species (*Amblyomma aureolatum* and *Ornithodoros brasiliensis*) using rDNA 16S sequencing

Bruno Dall'Agnol^{1,2*}, John Anthony McCulloch³, Fabiana Quoos Mayer¹, Ugo Araújo Souza¹, Anelise Webster¹, João Ricardo Martins¹, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira²,
José Reck¹

¹ Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor – IPVDF, Eldorado do Sul, RS, Brazil

² Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul – PUCRS, Porto Alegre, RS, Brazil

³National Cancer Institute, National Institutes of Health - NIH, Bethesda, MD, USA

*Corresponding author: Bruno Dall'Agnol. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde, 6000, Eldorado do Sul, RS, Brazil. CEP:92990-000 E-mail: bruno-dallagnol@hotmail.com ORCID: 0000-0003-4147-6673

ABSTRACT

Ticks are one of the main vectors of pathogens for humans and animals worldwide. However, they harbor non-pathogenic microorganisms that are important for its survival, helping in both nutrition and immunity. Therefore, the aim of this work was to investigate the bacterial communities associated with two Neotropical tick species of human and veterinary potential health importance from Brazil: *A. aureolatum* and *O. brasiliensis*. In *A. aureolatum*, the predominant bacterial phyla were Proteobacteria (98.68%), Tenericutes (0.70%), Bacteroidetes (0.14%), Actinobacteria (0.13%) and Acidobacteria (0.05%). The predominant genera were *Francisella* (97.01%), *Spiroplasma* (0.70%), *Wolbachia* (0.51%), *Candidatus* Midichloria (0.25%) and *Alkanindiges* (0.13%). The predominant phyla in *O. brasiliensis* were Proteobacteria (90.27%), Actinobacteria (7.38%), Firmicutes (0.77%), Bacteroidetes (0.44%) and Planctomycetes (0.22%). The predominant bacterial genera were *Coxiella* (87.71%), *Nocardioides* (1.73%), *Saccharopolyspora* (0.54%), *Marmoricola* (0.42%) and *Staphylococcus* (0.40%). Considering the genera with potential importance in human and animal health which can be transmitted by ticks: *Coxiella* sp. was found in all instars of *O. brasiliensis*; *Francisella* sp. in all instars of *A. aureolatum* and in unfed nymphs of *O. brasiliensis*; and *Rickettsia* sp. in females of *A. aureolatum* from BP and females and unfed nymphs of *O. brasiliensis*. These results help in the understanding of the tick-microbiota relationship in Ixodidae and Argasidae families, as well as may drive new studies with the focus on the manipulation of tick microbiota in order to prevent outbreaks of tick-borne diseases in South America.

KEYWORDS: *Coxiella*; *Francisella*; *Rickettsia*; microbiome; DNA metabarcoding; Brazil.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and INCT em Entomologia Molecular.

INTRODUCTION

Microbiome is a major factor in mammalian physiology [1]. The microbiota of mammals is associated with obesity [2], diabetes [3], cancer [1, 4], viral infection [1, 5], multiple sclerosis [6], hypertension, chronic kidney disease [7] and other metabolic, nervous, cardiovascular and immune diseases. These associations have been strengthened by several lines of evidence that link the effect of the microbiota on the physiology of mammals, mainly humans, however all metazoans have partnered with a small or large consortia of microbes to enhance health and survival, and with ticks it is not different [8].

Microorganisms that establish any mutualistic relationship with their hosts are generally called endosymbionts. Endosymbioses are interactions in which a smaller partner (the endosymbiont) lives inside the cell of a larger individual (the host) with beneficial mutual effect, for example, the origin of mitochondria in eukaryotic cells [9], and the *Coxiella* mutualist symbiont which is essential to the development of *Rhipicephalus microplus* [10]. Ticks are among the main vectors of diseases for humans and animals, but little is known about the interactions of these arthropods with their

microbiota [11]. It is well known that the microbiota plays a key role in the physiology of its host either by preventing infection by pathogens or by synthesis of compounds necessary for the survival of the host organism [11, 12]. In addition to endosymbionts, pathogens of medical and veterinary importance, such as species of the genera *Anaplasma*, *Borrelia*, *Coxiella*, *Ehrlichia*, *Francisella* and *Rickettsia*, are present in ticks [13]. Furthermore, it was demonstrated that arthropod microbiota can influence the presence and transmission of mammalian pathogens. For instance, commensal and symbiont bacteria can inhibit the infection by *Plasmodium* spp., *Trypanosoma* spp. and Dengue virus in *Anopheles* spp., *Glossina* spp. and *Aedes aegypti*, respectively [14]. In this sense, recently, several studies addressed the microbiome of ticks of medical importance, such as *Ixodes ricinus* [15], *Ixodes scapularis* [16, 17], *Ixodes pacificus* [18], *Dermacentor andersoni* [19,20], *Amblyomma americanum* [21,22], *Amblyomma maculatum* [23] and *Haemaphysalis longicornis* [24 – 26]. In spite of the abundance of tick species and impact of tick-borne diseases in South America, to date there is no research on microbiome of South American native ticks.

Brazil has a tick fauna composed by 73 species, of which 47 belong to the Ixodidae family and 26 belong to the Argasidae family [27]. Considering the Ixodidae family, *Amblyomma aureolatum* tick is recognized as vector of *Rickettsia* Spotted Fever Group (SFG) [28, 29] and the protozoan *Rangelia vitalii* [30, 31]. On the other hand, among Argasidae ticks, *Ornithodoros brasiliensis* is associated to a toxicosis syndrome in humans and animals [32, 33], and it was linked to the transmission of a *Borrelia* species [34]. Therefore, the aim of this work was to investigate the bacterial communities associated with two Neotropical tick species of human and veterinary potential health importance from Brazil: *A. aureolatum* and *O. brasiliensis*.

MATERIALS AND METHODS

Ethics statement

The study protocol was approved by the Committee for Animal Care and Experimentation of IPVDF (CEUA/IPVDF 28/2014) and by Brazilian Ministry of Environment (SISBIO 47357-3).

Ticks

From December 2014 to December 2016, *A. aureolatum* (Acari: Ixodidae) ticks were collected in their natural host, free-ranging Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). Wild canids were captured using Tomahawk live-traps in two areas of environmental preservation from Pampa biome in the Rio Grande do Sul (RS) state, southern Brazil: Banhado dos Pachecos (BP) in Viamão municipality; and APA Ibirapuitã, in Santana do Livramento municipality.

Specimens of *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae) ticks were collected at July 2016 in their natural environment, at Atlantic rainforest biome, in Jaquirana municipality, Southern Brazil highlands, RS. Ticks were manually collected from sifting the soil.

After the ticks were collected, they were immediately taken to the laboratory, washed thrice in 70% ethanol followed by a final wash using sterile ultrapure water to remove environmental debris and disinfect the surface. Ticks were identified until species level by dichotomous keys [35, 36]. Samples of *A. aureolatum* adults were discriminated by gender (males and females), while *O. brasiliensis* specimens were classified as adult males, adult females, fed or unfed nymphs.

DNA extraction, library preparation and sequencing

DNA extraction procedures were performed in a biosafety cabinet to ensure sample protection from environmental contaminants and also protection of researchers

from potential infectious pathogens. Genomic DNA was extracted from each individual whole tick using the PureLink Genomic DNA MiniKit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), including a treatment with 50 μ L lysozyme (20mg/mL) (Sigma-Aldrich, Dorset, UK) at 30 min/37°C for peptidoglycan disruption. Ticks were grouped considering host (for *A. aureolatum*), sex, instar and locality, as indicated in Table 1.

In order to synthesize the sequencing libraries, the V4 region of the bacterial 16S rRNA gene was amplified according to Kozich et al. [37] and 16S Metagenomic Sequencing Library Preparation guide of Illumina Inc. (https://support.illumina.com/documents/documentation/chemistry_documentation/16s/16s-metagenomic-library-prep-guide-15044223-b.pdf). Sequencing was performed on a MiSeq (Illumina) platform using a 500-cycle v2 kit generating 250-bp paired-end reads.

Bioinformatics analysis

Raw FASTQ files were analyzed in the Mothur algorithm (<https://www.mothur.org/>) and data analysis was performed in the statistical language R. The OTUs generated were compared with the ribosomal RNA database Silva (<https://www.arb-silva.de/>).

RESULTS

The mean number of raw reads obtained per sample before and after quality control were 313,515.2 (100,548 to 765,590) and 276,052.3 (91,728 to 665,380), respectively (Table 2).

In *A. aureolatum*, the predominant bacterial phyla were Proteobacteria (98.68%), Tenericutes (0.70%), Bacteroidetes (0.14%), Actinobacteria (0.13%) and Acidobacteria (0.05%). The predominant genera were *Francisella* (97.01%), *Spiroplasma* (0.70%), *Wolbachia* (0.51%), *Candidatus Midichloria* (0.25%) and *Alkanindiges* (0.13%) (Figure

1). Indeed, *Francisella* was the predominant genus in all samples of *A. aureolatum*. In ticks from BP, *Spiroplasma* sp. was found in all samples, while in ticks from APA Ibirapuitã it was found only in one female sample and in a small proportion. On the other hand, *Wolbachia* sp. was found only in samples from BP and in larger proportion in males than females. *Candidatus* Midichloria sp. was also found only in ticks from BP. *Alkanindiges* sp. was found only in males and *Morganella* sp. only in females from BP. *Rickettsiella* sp. was found only in male ticks from BP. A greater amount of unclassified Proteobacteria was found in APA Ibirapuitã than in BP. *Mycobacterium* sp. and *Burkholderia* sp. were also present in larger amount in BP collected ticks.

The predominant phyla in *O. brasiliensis* were Proteobacteria (90.27%), Actinobacteria (7.38%), Firmicutes (0.77%), Bacteroidetes (0.44%) and Planctomycetes (0.22%). The predominant bacterial genera were *Coxiella* (87.71%), *Nocardioides* (1.73%), *Saccharopolyspora* (0.54%), *Marmoricola* (0.42%) and *Staphylococcus* (0.40%) (Figure 2). In the immature instars (nymphs), *Staphylococcus* and *Escherichia-Shigella* were present in greater numbers compared to adults. Unclassified gammaproteobacteria was found in greater amount in unfed nymphs, while *Rickettsiella*, *Nitrosospora*, *Rubrobacter*, *Planctomyces* and *Acidibacter* were present in greater quantity in adults (males and females).

The bacterial diversity seems to be higher in the *A. aureolatum* samples collected in BP compared to those from APA Ibirapuitã and there is no evident difference between males and females (Figure 3). Since *O. brasiliensis* ticks were collected in only one location, the diversity evaluation only allows a comparison among different instars, and a greater diversity to be found in fed nymphs (Figure 3).

Considering the genera with potential importance in human and animal health which can be transmitted by ticks: *Coxiella* sp. was found in all instars of *O.*

brasiliensis; *Francisella* sp. in all instars of *A. aureolatum* and in unfed nymphs of *O. brasiliensis*; and *Rickettsia* sp. in females of *A. aureolatum* from BP and females and unfed nymphs of *O. brasiliensis*.

DISCUSSION

Ticks are one of the main vectors of pathogens for humans and animals worldwide. However, they harbor non-pathogenic microorganisms that are important for their survival, helping in both nutrition and immunity. Ticks depend on bacteria, such as *Coxiella*-like and *Francisella*-like endosymbionts, that probably provide nutrients that are lacking in their diet. In addition to endosymbionts, ticks may also present and transmit pathogens to mammals, including *Coxiella burnetii* and *Francisella tularensis*. However, the evolutionary relationship between endosymbiont and pathogenic species of a same genus may be puzzling [12, 38]. Analyzing the genome of *Coxiella*-like endosymbionts (CLE) of *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus*, Tsementzi et al. [39] observed that both genomes encode numerous pseudogenes, consistent with an ongoing genome reduction process. Similarly, *Francisella*-like endosymbionts (FLEs) contain pseudogenized versions of virulence genes present in *F. tularensis*, indicating that the common ancestor of FLEs and mammalian pathogens was equipped to function as a pathogen [40]. In silico flux balance metabolic analysis (FBA) revealed the excess production of L-proline for CLE genomes, indicating a possible proline transport from *Coxiella* to the tick. Additionally, both CLE genomes encode multiple copies of the proline/betaine transporter, proP gene [39]. Moreover, FLEs genomes contain intact pathways for the synthesis of several B vitamins and cofactors lacking in vertebrate blood [40], suggesting possible symbiotic mechanisms.

The active search for new microorganisms harbored in ticks can collaborate to prevent new cases of diseases, since tick-associated microorganisms of unknown pathogenicity may be identified first, and then an association with human or animal disease could be found [41]. For instance, *Rickettsia parkeri* was recovered from *Amblyomma maculatum* in Texas approximately 60 years prior to the index case in humans, only reported in 2004. In addition, the spirochete *Borrelia miyamotoi*, first identified in *Ixodes persulcatus* in Japan, was considered as a non-pathogenic microorganism until the first human cases reported only 15 years later [41].

In *A. aureolatum* ticks, the principal genus found was *Francisella*. It corroborates with the results from Budachetri et al. [23] and Varela-Stokes et al. [42] that reported *Francisella* as the main genus in *A. maculatum* (another *Amblyomma* species restricted to the Americas). Additionally, the presence of *Francisella* sp. have been reported in high abundance in *Dermacentor* species, including *Dermacentor variabilis*, *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor hunteri*, *Dermacentor nitens*, *Dermacentor occidentalis* and *Dermacentor albipictus* [23, 43 – 45]. On the other hand, the most abundant genus in *Amblyomma variegatum* (an Afrotropical tick species) was *Clavibacter* (13.4%) in males and *Borrelia* (8.6%) in females [24]. In *Amblyomma testudinarium* (an Oriental-Palearctic tick species) nymphs, the predominant genus was *Pseudoalteromonas* (17,2%) [24]. In *Amblyomma americanum* (a Nearctic tick species), *Coxiella* was found in greater amount in nymphs (26%), while *Bradyrhizobium* and *Phenylobacterium* were predominant in adults (28 to 45%) [46]. However, Ponnusamy et al. [21] observed that three of the most common genera found in *A. americanum* were *Rickettsia*, “*Candidatus* Midichloria mitochondrii,” and *Ehrlichia*, all members of the order Rickettsiales, representing 53% (median; interquartile range, 31% to 75%) of the reads. Trout Fryxell and DeBruyn [22] found that the most dominant OTUs were highly

variable between specimens of *A. americanum*, but the most abundant (>1 % relative abundance) across all specimens were *Flavobacterium* ($24.4 \pm 13.3\%$), an unclassified Gammaproteobacteria ($2.22 \pm 12.4\%$), *Rickettsia* ($9.1 \pm 14.5\%$), *Sphingomonas* ($4.6 \pm 3.6\%$), *Singulisphaera* ($1.91 \pm 1.81\%$), *Hymenobacter* ($1.95 \pm 3.00\%$), and *Bacillus* ($1.86 \pm 11.7\%$). In *Amblyomma tuberculatum* (a Neartic tick species), the main genera found were *Rickettsia* (55,8%) and *Francisella* (35,2%) [47]. Budachetri et al. [48] determined the microbiome of *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma maculatum* and *Haemaphysalis juxtakochi* collected from migratory bird species and found that the most prevalent genera observed, presenting abundance levels above 1%, were *Lactococcus*, *Raoultella*, *Wolbachia*, *Francisella*, *Propionibacterium*, *Ewingella*, *Elizabethkingia*, *Rickettsia*, *Massilia* and *Methylobacterium*.

Besides *Francisella*, the main genera found in *A. aureolatum* were *Spiroplasma*, *Wolbachia*, *Candidatus* Midichloria and *Alkanindiges*. *Spiroplasma* is common in arthropods (for a comprehensive review see Bonnet et al., [11], and Duron et al., [49]) and, although their effect in ticks is unknown, these bacteria showed a male-killer effect in diverse insect species [50]. The genus *Wolbachia* is very common in arthropods and is also present in ticks [11]. The effect of this genus on ticks is largely unknown, but is responsible by reproductive alterations in many arthropods [50]. It is a facultative mutualist (defensive symbiosis) in mosquitoes [51, 52], and an obligate symbiont in bed bugs [53, 54]. At least in the case of *Ixodes ricinus*, it has been demonstrated that the detection of *Wolbachia* sp. was due to a contamination by a hymenopteran parasitoid [55]. In several ticks, *Candidatus* Midichloria sp. resides in high numbers in female reproductive tissues. It lives inside tick mitochondria but its effects in tick physiology and metabolism remains unknown [56, 57]. Nevertheless, it was recently suggested that *Candidatus* Midichloria sp. may be an obligate nutritional symbiont providing B

vitamins [49] since its genome encodes pathways for the synthesis of major B vitamins and cofactors [57, 58]. Male *I. holocyclus* ticks also appear to inherit and harbor *Candidatus* Midichloria sp., however, *I. ricinus* males fail to establish stable bacterial populations. In addition, *Candidatus* Midichloria sp. is found in *I. ricinus* salivary glands from where it is introduced during feeding to vertebrate hosts, including humans. However, the consequences of *Midichloria* infection in vertebrate hosts, if any, are unknown [59 - 61]. *Alkanindiges* sp. is not commonly found in high proportions in ticks, although *Rhipicephalus microplus* eggs have been described to present relative abundance of 0.2% [62]. It seems, that *Alkanindiges* sp. are found to oilfield soils [63 – 67], patients with parotid abscess [68], bone and joint infections [69] and asthma [70], activated sludge systems [71], tonsils of healthy pigs [72], lettuce [73, 74] and drinking water wells [75].

To the best of our knowledge, there are very few studies on the microbiome characterization of Argasidae ticks. Ticks of this family could exhibit characteristics remarkable different from Ixodidae ticks, as for instance, fast feed (minutes) and long life (some species may live for several years). They are also able to induce severe injuries directly associated with the tick bite (tick toxicosis), may have several nymphal stages and females do not die after oviposition [33, 76]. In *Ornithodoros tholozani* collected in buffaloes from Pakistan the main genera of bacteria found were *Ralstonia* (40.0%), *Staphylococcus* (22.8%), *Enterococcus* (13.9%), *Saccharomonospora* (4.5%) and *Bacillus* (4.3%) [77]. The more predominant genera found in *O. brasiliensis* was *Coxiella*. This bacterium also was found to be the main symbiont of *Rhipicephalus* spp. [10, 78]. Guizzo et al., [10] showed that, in *Rhipicephalus microplus*, 99% and 98,3% of bacteria present in eggs and larvae, respectively, were *Coxiella* sp. Levels of the *Coxiella* sp. were affected in fully engorged females injected with tetracycline; and the

development of larva with reduced levels of the *Coxiella* sp. was arrested at the metanymph stage. In the Argasidae family, *Coxiella* sp. endosymbiont was found in *Carios capensis* [79], *Argas monolakensis* [80], *Ornithodoros rostratus* [81] and *Ornithodoros muesebecki* [82].

Besides *Coxiella* sp., the main genera found in *O. brasiliensis* were *Nocardioides*, *Saccharopolyspora*, *Marmoricola* and *Staphylococcus*. *Nocardioides* is symbiont of ants and is involved in ant-plant mutualisms [83, 84]. *Nocardioides* was also isolated from the water flea *Daphnia cucullata* (Crustacea: Cladocera) [85]. *Saccharopolyspora* was also found associated with ants [84] and was isolated from the gut of a termite (*Speculitermes* sp.) [86]. Members of the genus *Saccharopolyspora* are a potentially rich source of natural products, but only erythromycin, produced by *Saccharopolyspora erythraea*, and Spinosad, an insecticide based on chemical compounds found in the bacterial species *Saccharopolyspora spinosa*, are currently commercially available [86, 87]. The genus *Marmoricola* was also found in spiders from Japan [88] and ants from USA [89]. Andreotti et al. [62] showed that the genus *Staphylococcus* was relatively abundant in males (32%) and in eggs (18%) of *R. microplus* ticks, but not as much in adult females (0.7%).

In our study, among the genera with potential importance in human and animal health that can be transmitted by ticks, it is noteworthy the presence of *Coxiella*, *Francisella* and *Rickettsia*. We found *Rickettsia* sp. in *A. aureolatum*, which corroborates the studies of its importance as a vector of spotted fever in Brazil [28, 29]. We also found *Rickettsia* sp. in *O. brasiliensis*. Bacteria of the genus *Rickettsia* has never been reported in *O. brasiliensis* or in ticks of the Argasidae family in Brazil [90]. In recent years, the number of reports of *Rickettsia* spp. in Argasidae has increased, including the description of novel species of *Rickettsia* [77, 91 - 98]. So, tick-

transmitted rickettsioses may be a neglected subject that may have impact on public health, considering the amount human cases of parasitism by Argasidae, mainly by *O. brasiliensis* [33, 99]. Ongoing studies may clarify the potential roles of *Rickettsia* spp. in the syndrome associated with the *O. brasiliensis* bite.

Finally, it was not possible to detect *Borrelia* spp. in *O. brasiliensis*. Several species of *Ornithodoros* (such as *Ornithodoros hermsi*, *Ornithodoros sonrai*, *Ornithodoros turicata*, *Ornithodoros erraticus*, *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros rudis*), especially those presenting public health impact, have been associated with the transmission of *Borrelia* spp. belonging to the relapsing fever group [100 - 105]. Conversely, Davis [34] reported the isolation of *Borrelia* sp. in samples of *O. brasiliensis*. This difference corroborates the results found in this study, as we were able to describe significant differences in the bacteriome composition within individuals of a single species, and that gender, developmental stage, mammal host and environment may influence it. Additionally, these data show the importance to investigate pathogens presence specifically, since bacterial genera present in small proportions in a sample may not appear in the analysis of rRNA 16S gene metabarcoding [106]. Abundant bacterial endosymbionts limit the effectiveness of next-generation 16S bacterial community profiling in arthropods by masking less abundant bacteria, including pathogens [60]. In addition, the samples of *O. brasiliensis* were collected only from one place. The presence of *Borrelia* spp. in samples from different locations and using techniques presenting higher sensitivity could help to clarify this issue [103, 105].

In *A. aureolatum*, the bacterial diversity was higher in samples collected in BP compared to those from APA Ibirapuitã. BP is a wildlife conservation refuge surrounded by small farms with stray dogs carrying ticks into and out. APA Ibirapuitã

has a very low human population and animal density in comparison of BP. In *O. brasiliensis*, fed nymphs had a greater microbial diversity than unfed nymphs. This may be due to the fact that the former enter into contact with the host's microbiota during the blood meal. Males and females also had a lower diversity compared to fed nymphs. This difference may be due to the fact that the adult ticks were analyzed individually and the nymphs fed were analyzed in pools of 5 individuals and there may be variation among specimens.

Herein, we determined, for the first time, the bacteriome of two tick species native from Brazil. Furthermore, we were able to compare the *A. aureolatum* bacterial diversity from specimens of different ecological characteristics. These results help in the understanding of the tick-microbiota relationship in Ixodidae and Argasidae families, as well as may drive new studies with the focus on the manipulation of tick microbiota in order to prevent outbreaks of tick-borne diseases in South America.

REFERENCES

1. Rosshart SP, Vassallo BG, Angeletti D, Hutchinson DS, Morgan AP, Takeda K, Hickman HD, McCulloch JA, Badger JH, Ajami NJ, Trinchieri G, Pardo-Manuel de Villena F, Yewdell JW, Rehermann B (2017) Wild Mouse Gut Microbiota Promotes Host Fitness and Improves Disease Resistance. *Cell*. 171(5):1015-1028.e13. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.016. Epub 2017 Oct 19. PubMed PMID: 29056339.
2. Mulders RJ, de Git KCG, Schéle E, Dickson SL, Sanz Y, Adan RAH (2018) Microbiota in obesity: interactions with enteroendocrine, immune and central

nervous systems. *Obes Rev.* 19(4):435-451. doi: 10.1111/obr.12661. Epub 2018 Jan 23. Review. PubMed PMID: 29363272.

3. Inoue R, Ohue-Kitano R, Tsukahara T, Tanaka M, Masuda S, Inoue T, Yamakage H, Kusakabe T, Hasegawa K, Shimatsu A, Satoh-Asahara N (2017) Prediction of functional profiles of gut microbiota from 16S rRNA metagenomic data provides a more robust evaluation of gut dysbiosis occurring in Japanese type 2 diabetic patients. *J Clin Biochem Nutr.* 61(3):217-221. doi: 10.3164/jcbn.17-44. Epub 2017 Oct 11. PubMed PMID: 29203964; PubMed Central PMCID: PMC5703784.

4. Kroemer G, Zitvogel L (2018) Cancer immunotherapy in 2017: The breakthrough of the microbiota. *Nat Rev Immunol.* 18(2):87-88. doi: 10.1038/nri.2018.4. PubMed PMID: 29379189.

5. Oh JZ, Ravindran R, Chassaing B, Carvalho FA, Maddur MS, Bower M, Hakimpour P, Gill KP, Nakaya HI, Yarovinsky F, Sartor RB, Gewirtz AT, Pulendran B (2014) TLR5-mediated sensing of gut microbiota is necessary for antibody responses to seasonal influenza vaccination. *Immunity.* 41(3):478-492. doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.009. Epub 2014 Sep 11. PubMed PMID: 25220212; PubMed Central PMCID: PMC4169736.

6. Dopkins N, Nagarkatti PS, Nagarkatti M (2018) The role of gut microbiome and associated metabolome in the regulation of neuroinflammation in multiple sclerosis and its implications in attenuating chronic inflammation in other

inflammatory and autoimmune disorders. Immunology. 154(2):178-185. doi: 10.1111/imm.12903. Epub 2018 Feb 27. Review. PubMed PMID: 29392733; PubMed Central PMCID: PMC5980216.

7. Sircana A, De Michieli F, Parente R, Framarin L, Leone N, Berrutti M, Paschetta E, Bongiovanni D, Musso G (2018) Gut Microbiota, Hypertension and Chronic kidney Disease: recent advances. Pharmacol Res. pii: S1043-6618(17)31208-2. doi: 10.1016/j.phrs.2018.01.013. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 29378252.

8. Narasimhan S, Fikrig E (2015) Tick microbiome: the force within. Trends Parasitol. 31(7):315-23. doi: 10.1016/j.pt.2015.03.010. Epub 2015 Apr 27. Review. PubMed PMID: 25936226; PubMed Central PMCID: PMC4492851.

9. Dietel AK, Kaltenpoth M, Kost C (2018) Convergent Evolution in Intracellular Elements: Plasmids as Model Endosymbionts. Trends Microbiol. pii: S0966-842X(18)30067-2. doi: 10.1016/j.tim.2018.03.004. [Epub ahead of print] Review. PubMed PMID: 29650391.

10. Guizzo MG, Parizi LF, Nunes RD, Schama R, Albano RM, Tirloni L, Oldiges DP, Vieira RP, Oliveira WHC, Leite MS, Gonzales SA, Farber M, Martins O, Vaz IDS Jr, Oliveira PL (2017) A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. Sci Rep. 7(1):17554. doi: 10.1038/s41598-017-17309-x. PubMed PMID: 29242567; PubMed Central PMCID: PMC5730597.

- 392
- 393 11. Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O (2017) The Tick
394 Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and
395 Pathogen Transmission. Front Cell Infect Microbiol. 7:236. doi:
396 10.3389/fcimb.2017.00236. eCollection 2017. Review. PubMed PMID:
397 28642842; PubMed Central PMCID: PMC5462901.
- 398
- 399 12. Gerhart JG, Moses AS, Raghavan R (2016) A *Francisella*-like endosymbiont in
400 the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. Sci Rep. 6:33670. doi:
401 10.1038/srep33670. PubMed PMID: 27645766; PubMed Central PMCID:
402 PMC5028885.
- 403
- 404 13. Greay TL, Gofton AW, Paparini A, Ryan UM, Oskam CL, Irwin PJ (2018)
405 Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation
406 sequencing. Parasit Vectors. 11(1):12. doi: 10.1186/s13071-017-2550-5.
407 Review. PubMed PMID: 29301588; PubMed Central PMCID: PMC5755153.
- 408
- 409 14. Weiss B, Aksoy S (2011) Microbiome influences on insect host vector
410 competence. Trends Parasitol. 27(11):514-22. doi: 10.1016/j.pt.2011.05.001.
411 Epub 2011 Jun 21. Review. PubMed PMID: 21697014; PubMed Central
412 PMCID: PMC3179784.
- 413
- 414 15. Hernández-Jarguín A, Díaz-Sánchez S, Villar M, de la Fuente J (2018)
415 Integrated metatranscriptomics and metaproteomics for the characterization of
416 bacterial microbiota in unfed *Ixodes ricinus*. Ticks Tick Borne Dis. pii: S1877-

959X(18)30034-7. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.04.020. [Epub ahead of print]
PubMed PMID: 29753651.

16. Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Zhao YO, Heisig J, Pan J, Eppler-Epstein R, Deponte K, Fish D, Fikrig E (2014) Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe*. 15(1):58-71. doi: 10.1016/j.chom.2013.12.001. PubMed PMID: 24439898; PubMed Central PMCID: PMC3905459.

17. Clow KM, Weese JS, Rousseau J, Jardine CM (2018) Microbiota of field-collected *Ixodes scapularis* and *Dermacentor variabilis* from eastern and southern Ontario, Canada. *Ticks Tick Borne Dis*. 9(2):235-244. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.09.009. Epub 2017 Sep 20. PubMed PMID: 29042239.

18. Kwan JY, Griggs R, Chicana B, Miller C, Swei A (2017) Vertical vs. horizontal transmission of the microbiome in a key disease vector, *Ixodes pacificus*. *Mol Ecol*. 26(23):6578-6589. doi: 10.1111/mec.14391. Epub 2017 Nov 27. PubMed PMID: 29178531.

19. Clayton KA, Gall CA, Mason KL, Scoles GA, Brayton KA (2015) The characterization and manipulation of the bacterial microbiome of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Parasit Vectors*. 8:632. doi: 10.1186/s13071-015-1245-z. PubMed PMID: 26653035; PubMed Central PMCID: PMC4674957.

20. Gall CA, Reif KE, Scoles GA, Mason KL, Mousel M, Noh SM, Brayton KA (2016) The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. ISME J. 10(8):1846-55. doi: 10.1038/ismej.2015.266. Epub 2016 Feb 16. PubMed PMID: 26882265; PubMed Central PMCID: PMC5029153.
21. Ponnusamy L, Gonzalez A, Van Treuren W, Weiss S, Parobek CM, Juliano JJ, Knight R, Roe RM, Apperson CS, Meshnick SR (2014) Diversity of Rickettsiales in the microbiome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. Appl Environ Microbiol. 80(1):354-9. doi: 10.1128/AEM.02987-13. Epub 2013 Oct 25. PubMed PMID: 24162580; PubMed Central PMCID: PMC3910995.
22. Trout Fryxell RT, DeBruyn JM (2016) The Microbiome of *Ehrlichia*-Infected and Uninfected Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). PLoS One. 11(1):e0146651. doi: 10.1371/journal.pone.0146651. eCollection 2016. Erratum in: PLoS One. 2016;11(5):e0155559. PubMed PMID: 26751816; PubMed Central PMCID: PMC4709196.
23. Budachetri K, Browning RE, Adamson SW, Dowd SE, Chao CC, Ching WM, Karim S (2014) An insight into the microbiome of the *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol. 51(1):119-29. PubMed PMID: 24605461; PubMed Central PMCID: PMC3956751.
24. Nakao R, Abe T, Nijhof AM, Yamamoto S, Jongejan F, Ikemura T, Sugimoto C (2013) A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing

Maps), to the microbiome analysis of ticks. ISME J. 7(5):1003-15. doi: 10.1038/ismej.2012.171. Epub 2013 Jan 10. Erratum in: ISME J. 2014 Aug;8(8):1752. PubMed PMID: 23303373; PubMed Central PMCID: PMC3635243.

25. Zhuang L, Du J, Cui XM, Li H, Tang F, Zhang PH, Hu JG, Tong YG, Feng ZC, Liu W (2018) Identification of tick-borne pathogen diversity by metagenomic analysis in *Haemaphysalis longicornis* from Xinyang, China. Infect Dis Poverty. 7(1):45. doi: 10.1186/s40249-018-0417-4. PubMed PMID: 29730989.

26. Zhang R, Huang Z, Yu G, Zhang Z (2018) Characterization of microbiota diversity of field-collected *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) with regard to sex and blood meals. J Basic Microbiol. doi: 10.1002/jobm.201800372. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 30387176.

27. Gianizella SL, Martins TF, Onofrio VC, Aguiar NO, Gravena W, do Nascimento CAR, Neto LC, Faria DL, Lima NAS, Solorio MR, Maranhão L, Lima IJ, Cobra IVD, Santos T, Lopes GP, Ramalho EE, Luz HR, Labruna MB (2018) Ticks (Acari: Ixodidae) of the state of Amazonas, Brazil. Exp Appl Acarol. 74(2):177-183. doi: 10.1007/s10493-018-0221-7. Epub 2018 Jan 30. PubMed PMID: 29383533.

28. Saraiva DG, Soares HS, Soares JF, Labruna MB (2014) Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. Emerg Infect Dis. 20(9):1504-10. doi:

10.3201/eid2009.140189. PubMed PMID: 25148391; PubMed Central PMCID:
PMC4178383.

29. Dall'Agnol B, Souza UA, Weck B, Trigo TC, Jardim MMA, Costa FB, Labruna
MB, Peters FB, Favarini MO, Mazim FD, Ferreira CAS, Reck J (2018)
Rickettsia parkeri in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa.
Transbound Emerg Dis. 65(2):e224-e230. doi: 10.1111/tbed.12743. Epub 2017
Nov 8. PubMed PMID: 29119703.

30. Soares JF, Dall'Agnol B, Costa FB, Krawczak FS, Comerlato AT, Rossato BC,
Linck CM, Sigahi EK, Teixeira RH, Sonne L, Hagiwara MK, Gregori F, Vieira
MI, Martins JR, Reck J, Labruna MB (2014) Natural infection of the wild canid,
Cerdocyon thous, with the piroplasmid *Rangelia vitalii* in Brazil. Vet Parasitol.
202(3-4):156-63. doi: 10.1016/j.vetpar.2014.02.058. Epub 2014 Mar 15.
PubMed PMID: 24685025.

31. Soares JF, Costa FB, Girotto-Soares A, Da Silva AS, França RT, Taniwaki SA,
Dall'Agnol B, Reck J, Hagiwara MK, Labruna MB (2018) Evaluation of the
vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa,
Piroplasmorida), the agent of canine rangelirosis. Ticks Tick Borne Dis.
9(5):1221-1234. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.05.004. Epub 2018 May 4. PubMed
PMID: 29752143.

32. Reck J, Soares JF, Termignoni C, Labruna MB, Martins JR (2011) Tick
toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis*. Vet Clin Pathol.

40(3):356-60. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00338.x. Epub 2011 Aug 9.
PubMed PMID: 21827517.

33. Reck J, Marks FS, Guimarães JA, Termignoni C, Martins JR (2013) Epidemiology of *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) in the southern Brazilian highlands and the description of human and animal retrospective cases of tick parasitism. Ticks Tick Borne Dis. 4(1-2):101-9. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.09.004. Epub 2012 Dec 10. PubMed PMID: 23238249.

34. Davis GE (1952) Observations on the biology of the argasid tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923; with the recovery of a spirochete, *Borrelia brasiliensis*, n. sp. J Parasitol. 38(5):473-6. PubMed PMID: 12991141.

35. Barros-Battesti, D. M., Arzua, M., & Bechara, G. H. (2006). Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Brazil: Vox/ICTTD-3/Butantan.

36. Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Nieri-Bastos FA, Soares JF, Marcili A, Famadas KM, Faccini JLH, Ramirez DG, Doyle RL, Martins JR, Reck J, Guglielmone AA, Labruna MB (2012) *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. Zootaxa (Auckland. Print) 3178:22–32.

37. Kozich JJ, Westcott SL, Baxter NT, Highlander SK, Schloss PD (2013) Development of a dual-index sequencing strategy and curation pipeline for

analyzing amplicon sequence data on the MiSeq Illumina sequencing platform.
Appl Environ Microbiol. 79(17):5112-20. doi: 10.1128/AEM.01043-13. Epub
2013 Jun 21. PubMed PMID: 23793624; PubMed Central PMCID:
PMC3753973.

38. Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, Vavre
F, Zenner L, Jourdain E, Durand P, Amathau C, Renaud F, Trape JF,
Biguezoton AS, Cremaschi J, Dietrich M, Léger E, Appelgren A, Dupraz M,
Gómez-Díaz E, Diatta G, Dayo GK, Adakal H, Zoungrana S, Vial L, Chevillon
C (2015) The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of
Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS
Pathog. 11(5):e1004892. doi: 10.1371/journal.ppat.1004892. eCollection 2015
May. PubMed PMID: 25978383; PubMed Central PMCID: PMC4433120.

39. Tsementzi D, Castro Gordillo J, Mahagna M, Gottlieb Y, Konstantinidis KT
(2018) Comparison of closely related, uncultivated *Coxiella* tick endosymbiont
population genomes reveals clues about the mechanisms of symbiosis. Environ
Microbiol. 20(5):1751-1764. doi: 10.1111/1462-2920.14104. PubMed PMID:
29575448.

40. Gerhart JG, Auguste Dutcher H, Brenner AE, Moses AS, Grubhoffer L,
Raghavan R (2018) Multiple Acquisitions of Pathogen-Derived *Francisella*
Endosymbionts in Soft Ticks. Genome Biol Evol. 10(2):607-615. doi:
10.1093/gbe/evy021. PubMed PMID: 29385445; PubMed Central PMCID:
PMC5804916.

41. Varela-Stokes AS, Park SH, Kim SA, Ricke SC (2017) Microbial Communities in North American Ixodid Ticks of Veterinary and Medical Importance. *Front Vet Sci.* 4:179. doi: 10.3389/fvets.2017.00179. eCollection 2017. Review. PubMed PMID: 29104867; PubMed Central PMCID: PMC5654947.
42. Varela-Stokes AS, Park SH, Stokes JV, Gavron NA, Lee SI, Moraru GM, Ricke SC (2018) Tick microbial communities within enriched extracts of *Amblyomma maculatum*. *Ticks Tick Borne Dis.* 9(4):798-805. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.02.022. Epub 2018 Mar 1. PubMed PMID: 29530467; PubMed Central PMCID: PMC5962414.
43. Niebylski ML, Peacock MG, Fischer ER, Porcella SF, Schwan TG (1997) Characterization of an endosymbiont infecting wood ticks, *Dermacentor andersoni*, as a member of the genus *Francisella*. *Appl Environ Microbiol.* 63(10):3933-40. PubMed PMID: 9327558; PubMed Central PMCID: PMC168705.
44. Sun LV, Scoles GA, Fish D, O'Neill SL (2000) *Francisella*-like endosymbionts of ticks. *J Invertebr Pathol.* 76(4):301-3. PubMed PMID: 11112376.
45. Scoles GA (2004) Phylogenetic analysis of the *Francisella*-like endosymbionts of *Dermacentor* ticks. *J Med Entomol.* 41(3):277-86. PubMed PMID: 15185926.

46. Menchaca AC, Visi DK, Strey OF, Teel PD, Kalinowski K, Allen MS, Williamson PC (2013) Preliminary assessment of microbiome changes following blood-feeding and survivorship in the *Amblyomma americanum* nymph-to-adult transition using semiconductor sequencing. PLoS One. 8(6):e67129. doi: 10.1371/journal.pone.0067129. Print 2013. PubMed PMID: 23826210; PubMed Central PMCID: PMC3691118.
47. Budachetri K, Gaillard D, Williams J, Mukherjee N, Karim S (2016) A snapshot of the microbiome of *Amblyomma tuberculatum* ticks infesting the gopher tortoise, an endangered species. Ticks Tick Borne Dis. 7(6):1225-1229. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.07.010. Epub 2016 Jul 20. PubMed PMID: 27460902; PubMed Central PMCID: PMC5048529.
48. Budachetri K, Williams J, Mukherjee N, Sellers M, Moore F, Karim S (2017) The microbiome of neotropical ticks parasitizing on passerine migratory birds. Ticks Tick Borne Dis. 8(1):170-173. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.10.014. Epub 2016 Oct 28. PubMed PMID: 27802919; PubMed Central PMCID: PMC5472101.
49. Duron O, Binetruy F, Noël V, Cremaschi J, McCoy KD, Arnathau C, Plantard O, Goolsby J, Pérez de León AA, Heylen DJA, Van Oosten AR, Gottlieb Y, Baneth G, Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Opara MN, Zenner L, Vavre F, Chevillon C (2017) Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. Mol Ecol. 26(11):2905-2921. doi: 10.1111/mec.14094. Epub 2017 Apr 4. PubMed PMID: 28281305.

50. Engelstadter, J, and Hurst, GDD (2009) The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 40, 127–149. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.110308.120206.
51. Brownlie JC, Johnson KN (2009) Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* 17(8):348-54. doi: 10.1016/j.tim.2009.05.005. Epub 2009 Aug 5. Review. PubMed PMID: 19660955.
52. Hamilton PT, Perlman SJ (2013) Host defense via symbiosis in *Drosophila*. *PLoS Pathog.* 9(12):e1003808. doi: 10.1371/journal.ppat.1003808. Epub 2013 Dec 26. Review. PubMed PMID: 24385901; PubMed Central PMCID: PMC3873448.
53. Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng XY, Fukatsu T (2010) *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107(2):769-74. doi: 10.1073/pnas.0911476107. Epub 2009 Dec 22. PubMed PMID: 20080750; PubMed Central PMCID: PMC2818902.
54. Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T (2014) Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111(28):10257-62. doi: 10.1073/pnas.1409284111. Epub 2014 Jun 30. PubMed PMID: 24982177; PubMed Central PMCID: PMC4104916.

55. Plantard O, Bouju-Albert A, Malard MA, Hermouet A, Capron G, Verheyden H (2012) Detection of *Wolbachia* in the tick *Ixodes ricinus* is due to the presence of the hymenoptera endoparasitoid *Ixodiphagus hookeri*. PLoS One. 7(1):e30692. doi: 10.1371/journal.pone.0030692. Epub 2012 Jan 26. PubMed PMID: 22292021; PubMed Central PMCID: PMC3266912.
56. Epis S, Mandrioli M, Genchi M, Montagna M, Sacchi L, Pistone D, Sasserà D (2013) Localization of the bacterial symbiont *Candidatus* Midichloria mitochondrii within the hard tick *Ixodes ricinus* by whole-mount FISH staining. Ticks Tick Borne Dis. 4(1-2):39-45. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.06.005. Epub 2012 Dec 10. PubMed PMID: 23238245.
57. Buysse M, Duron O (2018) Multi-locus phylogenetics of the *Midichloria* endosymbionts reveals variable specificity of association with ticks. Parasitology. 21:1-10. doi: 10.1017/S0031182018000793. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 29779502.
58. Sasserà D, Lo N, Epis S, D'Auria G, Montagna M, Comandatore F, Horner D, Peretó J, Luciano AM, Franciosi F, Ferri E, Crotti E, Bazzocchi C, Daffonchio D, Sacchi L, Moya A, Latorre A, Bandi C (2011) Phylogenomic evidence for the presence of a flagellum and *cbb(3)* oxidase in the free-living mitochondrial ancestor. Mol Biol Evol. 28(12):3285-96. doi: 10.1093/molbev/msr159. Epub 2011 Jun 20. PubMed PMID: 21690562.

59. Mariconti M, Epis S, Gaibani P, Dalla Valle C, Sassera D, Tomao P, Fabbi M, Castelli F, Marone P, Sambri V, Bazzocchi C, Bandi C (2012) Humans parasitized by the hard tick *Ixodes ricinus* are seropositive to *Midichloria mitochondrii*: is *Midichloria* a novel pathogen, or just a marker of tick bite? Pathog Glob Health. 106(7):391-6. doi: 10.1179/2047773212Y.0000000050. PubMed PMID: 23265610; PubMed Central PMCID: PMC3589662.
60. Gofton AW, Oskam CL, Lo N, Beninati T, Wei H, McCarl V, Murray DC, Paparini A, Greay TL, Holmes AJ, Bunce M, Ryan U, Irwin P (2015) Inhibition of the endosymbiont "*Candidatus* *Midichloria mitochondrii*" during 16S rRNA gene profiling reveals potential pathogens in *Ixodes* ticks from Australia. Parasit Vectors. 8:345. doi: 10.1186/s13071-015-0958-3. PubMed PMID: 26108374; PubMed Central PMCID: PMC4493822.
61. Serra V, Cafiso A, Formenti N, Verheyden H, Plantard O, Bazzocchi C, Sassera D (2018) Molecular and Serological Evidence of the Presence of *Midichloria mitochondrii* in Roe Deer (*Capreolus capreolus*) in France. J Wildl Dis. 54(3):597-600. doi: 10.7589/2017-09-241. Epub 2018 Mar 16. PubMed PMID: 29547359.
62. Andreotti R, Pérez de León AA, Dowd SE, Guerrero FD, Bendele KG, Scoles GA (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. BMC Microbiol. 11(1):6. doi: 10.1186/1471-2180-11-6. PubMed PMID: 21211038; PubMed Central PMCID: PMC3025832.

63. Bogan BW, Sullivan WR, Kayser KJ, Derr KD, Aldrich HC, Paterek JR (2003)
Alkanindiges illinoisensis gen. nov., sp. nov., an obligately hydrocarbonoclastic,
aerobic squalane-degrading bacterium isolated from oilfield soils. Int J Syst Evol
Microbiol. 53(Pt 5):1389-95. PubMed PMID: 13130023.
64. Chang W, Klemm S, Beaulieu C, Hawari J, Whyte L, Ghoshal S (2011)
Petroleum hydrocarbon biodegradation under seasonal freeze-thaw soil
temperature regimes in contaminated soils from a sub-Arctic site. Environ Sci
Technol. 45(3):1061-6. doi: 10.1021/es1022653. Epub 2010 Dec 31. PubMed
PMID: 21194195.
65. Sun W, Dong Y, Gao P, Fu M, Ta K, Li J (2015) Microbial communities
inhabiting oil-contaminated soils from two major oilfields in Northern China:
Implications for active petroleum-degrading capacity. J Microbiol. 53(6):371-8.
doi: 10.1007/s12275-015-5023-6. Epub 2015 May 30. PubMed PMID:
26025169.
66. Fuentes S, Barra B, Caporaso JG, Seeger M (2015) From Rare to Dominant: a
Fine-Tuned Soil Bacterial Bloom during Petroleum Hydrocarbon
Bioremediation. Appl Environ Microbiol. 82(3):888-96. doi:
10.1128/AEM.02625-15. Print 2016 Feb 1. PubMed PMID: 26590285; PubMed
Central PMCID: PMC4725283.

67. Zheng J, Feng JQ, Zhou L, Mbadinga SM, Gu JD, Mu BZ (2018) Characterization of bacterial composition and diversity in a long-term petroleum contaminated soil and isolation of high-efficiency alkane-degrading strains using an improved medium. *World J Microbiol Biotechnol.* 34(2):34. doi: 10.1007/s11274-018-2417-8. PubMed PMID: 29426982.
68. Woo PC, Tse H, Lau SK, Leung KW, Woo GK, Wong MK, Ho CM, Yuen KY (2005) *Alkanindiges hongkongensis* sp. nov. A novel *Alkanindiges* species isolated from a patient with parotid abscess. *Syst Appl Microbiol.* 28(4):316-22. PubMed PMID: 15997704.
69. Fenollar F, Roux V, Stein A, Drancourt M, Raoult D (2006) Analysis of 525 samples to determine the usefulness of PCR amplification and sequencing of the 16S rRNA gene for diagnosis of bone and joint infections. *J Clin Microbiol.* 44(3):1018-28. PubMed PMID: 16517890; PubMed Central PMCID: PMC1393109.
70. Fazlollahi M, Lee TD, Andrade J, Oguntuyo K, Chun Y, Grishina G, Grishin A, Bunyavanich S (2018) The nasal microbiome in asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 142(3):834-843.e2. doi: 10.1016/j.jaci.2018.02.020. Epub 2018 Mar 5. PubMed PMID: 29518419; PubMed Central PMCID: PMC6123291.
71. Klein AN, Frigon D, Raskin L (2007) Populations related to *Alkanindiges*, a novel genus containing obligate alkane degraders, are implicated in biological

foaming in activated sludge systems. Environ Microbiol. 9(8):1898-912.
PubMed PMID: 17635538.

72. Lowe BA, Marsh TL, Isaacs-Cosgrove N, Kirkwood RN, Kiupel M, Mulks MH
(2012) Defining the "core microbiome" of the microbial communities in the
tonsils of healthy pigs. BMC Microbiol. 12:20. doi: 10.1186/1471-2180-12-20.
PubMed PMID: 22313693; PubMed Central PMCID: PMC3297519.

73. Rastogi G, Sbodio A, Tech JJ, Suslow TV, Coaker GL, Leveau JH (2012) Leaf
microbiota in an agroecosystem: spatiotemporal variation in bacterial
community composition on field-grown lettuce. ISME J. 6(10):1812-22. doi:
10.1038/ismej.2012.32. Epub 2012 Apr 26. PubMed PMID: 22534606; PubMed
Central PMCID: PMC3446804.

74. Erlacher A, Cardinale M, Grosch R, Grube M, Berg G (2014) The impact of the
pathogen *Rhizoctonia solani* and its beneficial counterpart *Bacillus*
amyloliquefaciens on the indigenous lettuce microbiome. Front Microbiol.
5:175. doi: 10.3389/fmicb.2014.00175. eCollection 2014. PubMed PMID:
24795707; PubMed Central PMCID: PMC4001036.

75. Karwautz C, Lueders T (2014) Impact of hydraulic well restoration on native
bacterial communities in drinking water wells. Microbes Environ. 29(4):363-9.
doi: 10.1264/jsme2.ME14035. Epub 2014 Oct 2. PubMed PMID: 25273229;
PubMed Central PMCID: PMC4262359.

76. Ramirez DG, Landulfo GA, Onofrio VC, Simons SM, Reck J, Martins JR, Labruna MB, Barros-Battesti DM (2016) Laboratory life cycle of *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): An endemic tick from southern Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 7(5):730-733. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.001. Epub 2016 Mar 3. PubMed PMID: 26972686.
77. Karim S, Budachetri K, Mukherjee N, Williams J, Kausar A, Hassan MJ, Adamson S, Dowd SE, Apanskevich D, Arijo A, Sindhu ZU, Kakar MA, Khan RMD, Ullah S, Sajid MS, Ali A, Iqbal Z (2017) A study of ticks and tick-borne livestock pathogens in Pakistan. PLoS Negl Trop Dis. 11(6):e0005681. doi: 10.1371/journal.pntd.0005681. eCollection 2017 Jun. PubMed PMID: 28650978; PubMed Central PMCID: PMC5501686.
78. Bernasconi MV, Casati S, Péter O, Piffaretti JC (2002) *Rhipicephalus* ticks infected with *Rickettsia* and *Coxiella* in Southern Switzerland (Canton Ticino). Infect Genet Evol. 2(2):111-20. PubMed PMID: 12797987.
79. Reeves WK, Loftis AD, Priestley RA, Wills W, Sanders F, Dasch GA (2005) Molecular and biological characterization of a novel *Coxiella*-like agent from *Carios capensis*. Ann N Y Acad Sci. 1063:343-5. PubMed PMID: 16481538.
80. Reeves WK (2008) Molecular evidence for a novel *Coxiella* from *Argas monolakensis* (Acari: Argasidae) from Mono Lake, California, USA. Exp Appl Acarol. 44(1):57-60. doi: 10.1007/s10493-008-9128-z. Epub 2008 Feb 5. PubMed PMID: 18247143.

81. Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Martins JR, Labruna MB (2012) *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). Ticks Tick Borne Dis. 3(4):203-6. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.02.003. Epub 2012 Apr 4. PubMed PMID: 22480930.
82. Al-Deeb MA, Frangoulidis D, Walter MC, Kömpf D, Fischer SF, Petney T, Muzaffar SB (2016) *Coxiella*-like endosymbiont in argasid ticks (*Ornithodoros muesebecki*) from a Socotra Cormorant colony in Umm Al Quwain, United Arab Emirates. Ticks Tick Borne Dis. 7(1):166-171. doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.10.012. Epub 2015 Oct 19. PubMed PMID: 26515059.
83. Hanshew AS, McDonald BR, Díaz Díaz C, Djiéto-Lordon C, Blatrix R, Currie CR (2015) Characterization of actinobacteria associated with three ant-plant mutualisms. Microb Ecol. 69(1):192-203. doi: 10.1007/s00248-014-0469-3. Epub 2014 Aug 6. PubMed PMID: 25096989.
84. Reyes RD, Cafaro MJ (2015) *Paratrechina longicornis* ants in a tropical dry forest harbor specific Actinobacteria diversity. J Basic Microbiol. 55(1):11-21. doi: 10.1002/jobm.201300785. Epub 2014 Apr 28. PubMed PMID: 24771570.
85. Tóth EM, Kéki Z, Homonnay ZG, Borsodi AK, Márialigeti K, Schumann P (2008) *Nocardioides daphniae* sp. nov., isolated from *Daphnia cucullata* (Crustacea: Cladocera). Int J Syst Evol Microbiol. 58(Pt 1):78-83. doi: 10.1099/ijs.0.65305-0. PubMed PMID: 18175687.

86. Sinma K, Ishida Y, Tamura T, Kitpreechavanich V, Tokuyama S (2011) *Saccharopolyspora pathumthaniensis* sp. nov., a novel actinomycetes isolated from termite guts (*Speculitermes* sp.). J Gen Appl Microbiol. 57(2):93-100. PubMed PMID: 21606610.
87. Prabhu K, Murugan K, Nareshkumar A, Bragadeeswaran S (2011) Larvicidal and pupicidal activity of spinosad against the malarial vector *Anopheles stephensi*. Asian Pac J Trop Med. 4(8):610-3. doi: 10.1016/S1995-7645(11)60157-0. PubMed PMID: 21914537.
88. Iwai K, Iwamoto S, Aisaka K, Suzuki M (2009) Isolation of Novel Actinomycetes from Spider Materials. Actinomycetologica. 23 (1):8–15. doi: 10.3209/saj.SAJ230103.
89. Ishak HD, Plowes R, Sen R, Kellner K, Meyer E, Estrada DA, Dowd SE, Mueller UG (2011) Bacterial diversity in *Solenopsis invicta* and *Solenopsis geminata* ant colonies characterized by 16S amplicon 454 pyrosequencing. Microb Ecol. 61(4):821-31. doi: 10.1007/s00248-010-9793-4. Epub 2011 Jan 18. PubMed PMID: 21243351.
90. Labruna MB, Marcili A, Ogrzewalska M, Barros-Battesti DM, Dantas-Torres F, Fernandes AA, Leite RC, Venzal JM (2014) New records and human parasitism by *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) in Brazil. J Med Entomol. 51(1):283-7. PubMed PMID: 24605480.

- 837
- 838 91. Moreira-Soto RD, Moreira-Soto A, Corrales-Aguilar E, Calderón-Arguedas Ó,
839 Troyo A (2017) '*Candidatus Rickettsia nicoyana*': A novel *Rickettsia* species
840 isolated from *Ornithodoros knoxjonesi* in Costa Rica. Ticks Tick Borne Dis.
841 8(4):532-536. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.02.015. Epub 2017 Feb 27. PubMed
842 PMID: 28268195.
- 843
- 844 92. Sánchez-Montes S, Guzmán-Cornejo C, Martínez-Nájera Y, Becker I, Venzal
845 JM, Labruna MB (2016) *Rickettsia lusitaniae* associated with *Ornithodoros*
846 *yumatensis* (Acari: Argasidae) from two caves in Yucatan, Mexico. Ticks Tick
847 Borne Dis. 7(6):1097-1101. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.09.003. Epub 2016 Sep
848 11. PubMed PMID: 27639933.
- 849
- 850 93. Tahir D, Socolovschi C, Marié JL, Ganay G, Berenger JM, Bompar JM,
851 Blanchet D, Cheuret M, Mediannikov O, Raoult D, Davoust B, Parola P (2016)
852 New *Rickettsia* species in soft ticks *Ornithodoros hasei* collected from bats in
853 French Guiana. Ticks Tick Borne Dis. 7(6):1089-1096. doi:
854 10.1016/j.ttbdis.2016.09.004. Epub 2016 Sep 11. PubMed PMID: 27639932.
- 855
- 856 94. Lafri I, Leulmi H, Baziz-Neffah F, Lalout R, Mohamed C, Mohamed K, Parola
857 P, Bitam I (2015) Detection of a novel *Rickettsia* sp. in soft ticks (Acari:
858 Argasidae) in Algeria. Microbes Infect. 17(11-12):859-61. doi:
859 10.1016/j.micinf.2015.09.010. Epub 2015 Sep 25. PubMed PMID: 26408401.
- 860

95. Milhano N, Palma M, Marcili A, Nuncio MS, de Carvalho IL, de Sousa R (2014) *Rickettsia lusitaniae* sp. nov. isolated from the soft tick *Ornithodoros erraticus* (Acarina: Argasidae). Comp Immunol Microbiol Infect Dis. 37(3):189-93. doi: 10.1016/j.cimid.2014.01.006. Epub 2014 Jan 30. PubMed PMID: 24513450.
96. Socolovschi C, Kernif T, Raoult D, Parola P (2012) *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France, 2010. Emerg Infect Dis. 18(12):1966-75. doi: 10.3201/eid1812.111237. PubMed PMID: 23171714; PubMed Central PMCID: PMC3557878.
97. Pader V, Nikitorowicz Buniak J, Abdissa A, Adamu H, Tolosa T, Gashaw A, Cutler RR, Cutler SJ (2012) *Candidatus Rickettsia hoogstraalii* in Ethiopian *Argas persicus* ticks. Ticks Tick Borne Dis. 3(5-6):338-45. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.021. Epub 2012 Nov 8. PubMed PMID: 23140898.
98. Duh D, Punda-Polic V, Avsic-Zupanc T, Bouyer D, Walker DH, Popov VL, Jelovsek M, Gracner M, Trilar T, Bradaric N, Kurtti TJ, Strus J (2010) *Rickettsia hoogstraalii* sp. nov., isolated from hard- and soft-bodied ticks. Int J Syst Evol Microbiol. 60(Pt 4):977-84. doi: 10.1099/ijss.0.011049-0. Epub 2009 Aug 7. PubMed PMID: 19666817.
99. Martins JR, Doyle RL, Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Guglielmone AA (2011) Occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) in

São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil. Neotrop Entomol. 40(1):143-4.
PubMed PMID: 21437496.

100. McCoy BN, Raffel SJ, Lopez JE, Schwan TG (2010) Bloodmeal size and
spirochete acquisition of *Ornithodoros hermsi* (Acari: Argasidae) during
feeding. J Med Entomol. 47(6):1164-72. PubMed PMID: 21175068; PubMed
Central PMCID: PMC3071302.

101. Lopez JE, McCoy BN, Krajacich BJ, Schwan TG (2011) Acquisition and
subsequent transmission of *Borrelia hermsii* by the soft tick *Ornithodoros*
hermsi. J Med Entomol. 48(4):891-5. PubMed PMID: 21845950.

102. Schwan TG, Anderson JM, Lopez JE, Fischer RJ, Raffel SJ, McCoy BN,
Safronetz D, Sogoba N, Maïga O, Traoré SF (2012) Endemic foci of the tick-
borne relapsing fever spirochete *Borrelia crocidurae* in Mali, West Africa, and
the potential for human infection. PLoS Negl Trop Dis. 6(11):e1924. doi:
10.1371/journal.pntd.0001924. Epub 2012 Nov 29. PubMed PMID: 23209863;
PubMed Central PMCID: PMC3510061.

103. Boyle WK, Wilder HK, Lawrence AM, Lopez JE (2014) Transmission
dynamics of *Borrelia turicatae* from the arthropod vector. PLoS Negl Trop Dis.
8(4):e2767. doi: 10.1371/journal.pntd.0002767. eCollection 2014 Apr. PubMed
PMID: 24699275; PubMed Central PMCID: PMC3974661.

104. Trape JF, Diatta G, Arnathau C, Bitam I, Sarih M, Belghyti D, Bouattour A, Elguero E, Vial L, Mané Y, Baldé C, Prugnolle F, Chauvancy G, Mahé G, Granjon L, Duplantier JM, Durand P, Renaud F (2013) The epidemiology and geographic distribution of relapsing fever borreliosis in West and North Africa, with a review of the *Ornithodoros erraticus* complex (Acari: Ixodida). PLoS One. 8(11):e78473. doi: 10.1371/journal.pone.0078473. eCollection 2013. Erratum in: PLoS One. 2014;9(1). doi:10.1371/annotation/20b57909-df52-4073-a93f-a6689f84389d. Prugnolle, Franck [corrected to Prugnolle, Franck]. PubMed PMID: 24223812; PubMed Central PMCID: PMC3817255.
105. Muñoz-Leal S, Faccini-Martínez AA, Costa FB, Marcili A, Mesquita ETKC, Marques EP Jr, Labruna MB (2018) Isolation and molecular characterization of a relapsing fever *Borrelia* recovered from *Ornithodoros rudi* in Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 9(4):864-871. doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.03.008. Epub 2018 Mar 9. PubMed PMID: 29571703.
106. Frey KG, Herrera-Galeano JE, Redden CL, Luu TV, Servetas SL, Mateczun AJ, Mokashi VP, Bishop-Lilly KA (2014) Comparison of three next-generation sequencing platforms for metagenomic sequencing and identification of pathogens in blood. BMC Genomics. 15:96. doi: 10.1186/1471-2164-15-96. PubMed PMID: 24495417; PubMed Central PMCID: PMC3922542.

Figure captions

Figure 1. Bacterial diversity at the genus level in *Amblyomma aureolatum* ticks. APA: APA do Ibirapuitã; BP: RVS Banhado dos Pachecos.

Figure 2. Bacterial diversity at the genus level in *Ornithodoros brasiliensis* ticks.

Figure 3. Diversity index. A. Shannon Index. B. Simpson Index.

938 Table 1. Data about origin of the pool of ticks used in the DNA metabarcoding analysis.

Sample origin	Biome	latitude	longitude	Tick species	NCBI taxon id of the tick	Library name	Life stage	Sex	Number of ticks
APA Ibirapuitã	Pampa	30°20'32.5"S	55°41'09.7"W	<i>Amblyomma aureolatum</i>	187763	B	Adult	Male	5
APA Ibirapuitã	Pampa	30°20'32.5"S	55°41'09.7"W	<i>Amblyomma aureolatum</i>	187763	C	Adult	Female	5
APA Ibirapuitã	Pampa	30°20'32.5"S	55°41'09.7"W	<i>Amblyomma aureolatum</i>	187763	D	Adult	Female	5
Banhado dos Pachecos	Pampa	30°05'37.9"S	50°51'01.5"W	<i>Amblyomma aureolatum</i>	187763	E	Adult	Male	5
Banhado dos Pachecos	Pampa	30°05'37.9"S	50°51'01.5"W	<i>Amblyomma aureolatum</i>	187763	F	Adult	Male	5
Banhado dos Pachecos	Pampa	30°05'37.9"S	50°51'01.5"W	<i>Amblyomma aureolatum</i>	187763	G	Adult	Female	5
Banhado dos Pachecos	Pampa	30°05'37.9"S	50°51'01.5"W	<i>Amblyomma aureolatum</i>	187763	H	Adult	Female	5
Jaquirana	Atlantic rainforest	29°01'09.8"S	50°25'54.3"W	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	888526	J	Adult	Male	1
Jaquirana	Atlantic rainforest	29°01'09.8"S	50°25'54.3"W	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	888526	K	Adult	Female	1
Jaquirana	Atlantic rainforest	29°01'09.8"S	50°25'54.3"W	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	888526	L	Adult	Female	1
Jaquirana	Atlantic rainforest	29°01'09.8"S	50°25'54.3"W	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	888526	M	Fed nymph	Immature	5
Jaquirana	Atlantic rainforest	29°01'09.8"S	50°25'54.3"W	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	888526	N	Fed nymph	Immature	5
Jaquirana	Atlantic rainforest	29°01'09.8"S	50°25'54.3"W	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	888526	P	Unfed nymph	Immature	15
Jaquirana	Atlantic rainforest	29°01'09.8"S	50°25'54.3"W	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	888526	Q	Unfed nymph	Immature	15
Jaquirana	Atlantic rainforest	29°01'09.8"S	50°25'54.3"W	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	888526	R	Unfed nymph	Immature	15

939

940 Table 2. Number of reads and bacterial diversity index.

Sample origin	Tick species	Library name	Life stage	Sex	Number of raw reads	Number of reads after quality control	Shannon index	Simpson index	invSimpson index
APA Ibirapuitã	<i>Amblyomma aureolatum</i>	B	Adult	Male	294424	277238	0,097180283	0,019209686	1,019585882
APA Ibirapuitã	<i>Amblyomma aureolatum</i>	C	Adult	Female	346018	327598	0,055127549	0,013924067	1,014120674
APA Ibirapuitã	<i>Amblyomma aureolatum</i>	D	Adult	Female	100548	91728	0,080087477	0,024767218	1,025396194
RVS Banhado dos Pachecos	<i>Amblyomma aureolatum</i>	E	Adult	Male	318006	298018	0,752314061	0,28020152	1,389274852
RVS Banhado dos Pachecos	<i>Amblyomma aureolatum</i>	F	Adult	Male	312700	285202	1,597470598	0,561248189	2,279160929
RVS Banhado dos Pachecos	<i>Amblyomma aureolatum</i>	G	Adult	Female	144174	131514	0,11195518	0,02694269	1,027688625
RVS Banhado dos Pachecos	<i>Amblyomma aureolatum</i>	H	Adult	Female	239878	207742	2,084659654	0,694184435	3,269807541
Jaquirana	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	J	Adult	Male	148164	119234	1,116713161	0,267420311	1,365030238
Jaquirana	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	K	Adult	Female	368288	323768	1,125283115	0,25330364	1,33922674
Jaquirana	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	L	Adult	Female	429368	376904	1,046095937	0,239096409	1,314222253
Jaquirana	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	M	Fed nymph	Immature	381608	319306	1,58776802	0,392536779	1,646172909
Jaquirana	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	N	Fed nymph	Immature	234072	200520	1,581527038	0,391100196	1,642283497
Jaquirana	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	P	Unfed nymph	Immature	346760	294182	0,611494688	0,136234093	1,157719706
Jaquirana	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	Q	Unfed nymph	Immature	765590	665380	0,85484268	0,197547578	1,246177156
Jaquirana	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	R	Unfed nymph	Immature	273130	222450	0,750464292	0,176728503	1,214663905

Figure 1

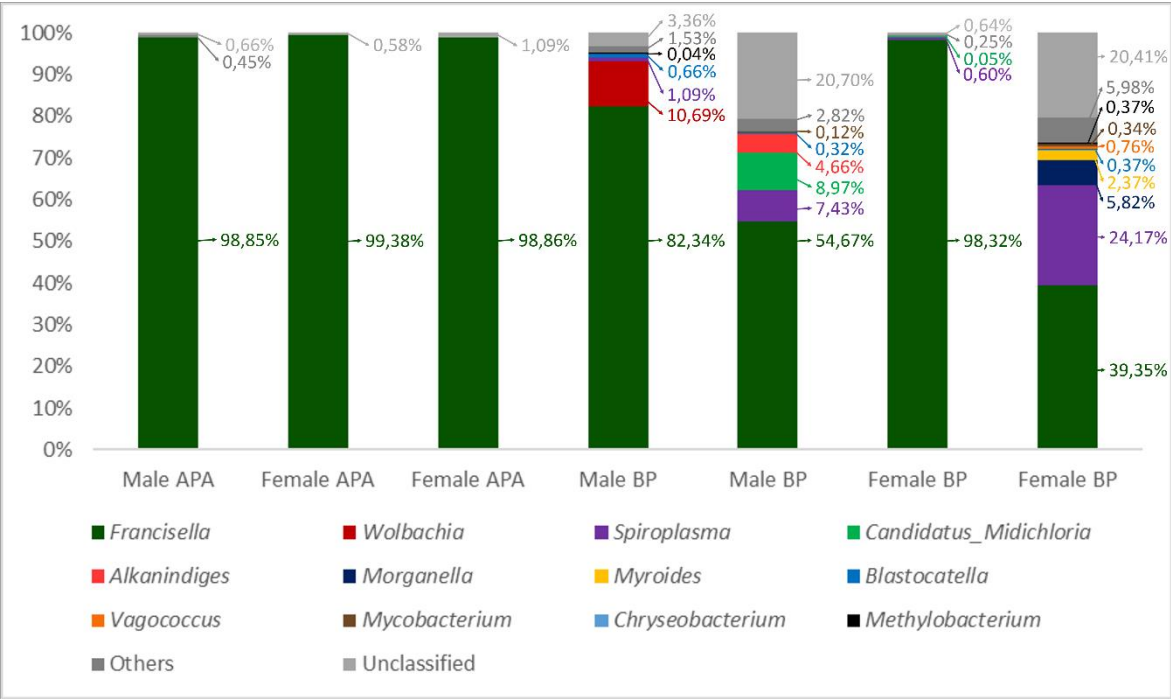
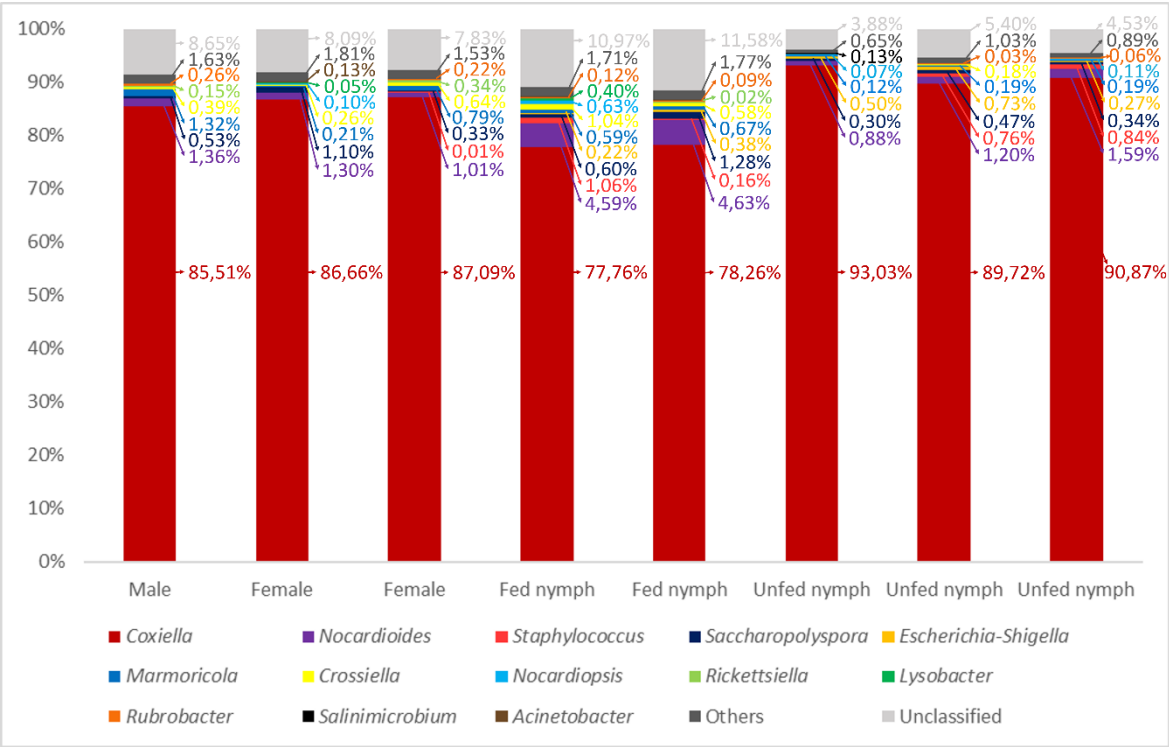
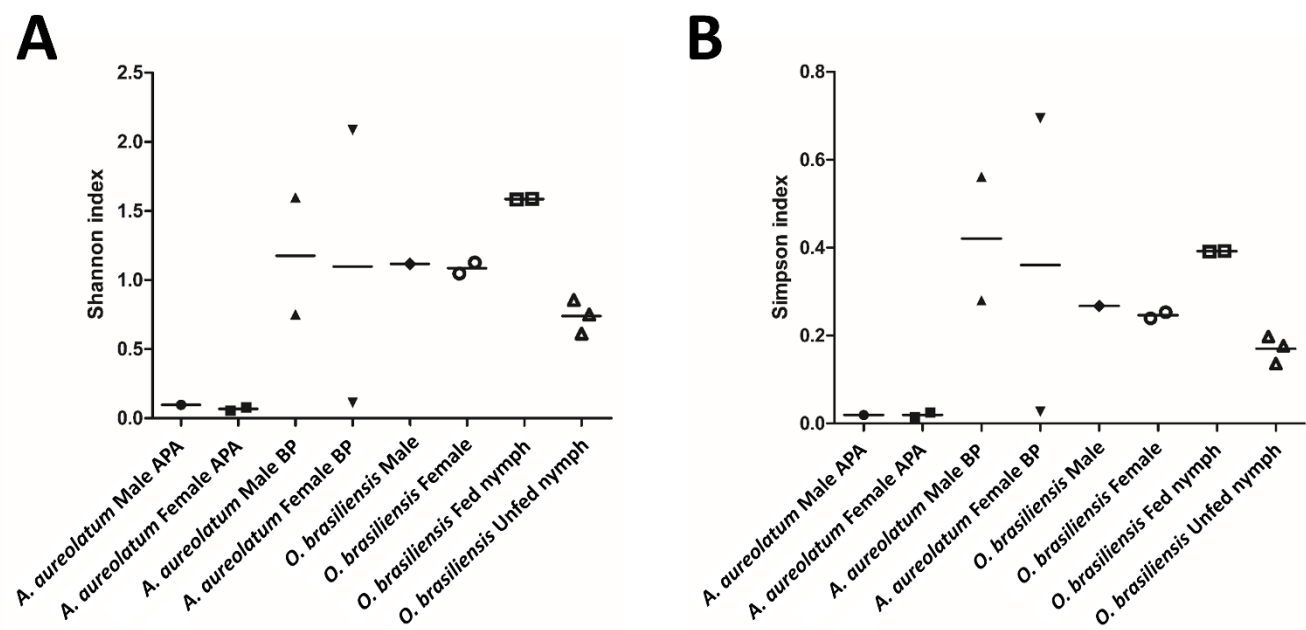


Figure 2



951 Figure 3



952

953

Artigo Científico 2

Clinical findings associated with *Ornithodoros brasiliensis* tick parasitism in travelers in Southern Brazil

Artigo científico submetido ao periódico científico *Wilderness & Environmental Medicine* publicado pela Elsevier.

Fator de impacto: 1.161

Guia dos autores: <https://www.wemjournal.org/content/authorinfo>

Case report

Title: **Clinical findings associated with *Ornithodoros brasiliensis* tick parasitism in travelers in Southern Brazil**

Running head: Tick parasitism in travelers, Brazil

Authors: Bruno Dall'Agnol, DVM, PhD^{1*}; Diogo Schott, MSc¹; Thamiris Padilha, DVM¹; Paola Antunes, DVM¹; Ugo A. Souza, DVM¹; Anelise Webster, DVM, PhD¹; Getúlio D. Souza, MSc²; Carlos Alexandre S. Ferreira, PhD³; José Reck, DVM, PhD¹

¹ Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, Brazil

²Secretaria Estadual da Saúde do Rio Grande do Sul (SES-RS), Porto Alegre, Brazil

³ Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS), Porto Alegre, Brazil

*Address for correspondence: Bruno Dall'Agnol, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF). Estrada do Conde, 6000, Eldorado do Sul, 92990-000, RS, Brazil. E-mail: bruno-dallagnol@hotmail.com. Phone/Fax number: +55 51 3481-3974

The work described in the manuscript was formally presented at a scientific meeting “II Simpósio Nacional de Doenças Transmitidas por Carrapatos” in October 16 and 17, 2017 from Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Abstract

We report a series of clinical cases associated to the parasitism by *Ornithodoros brasiliensis* tick in a group of travelers in the Caxias do Sul municipality, Southern Brazil. These cases draw attention to underdiagnosed noninfectious syndromes caused by ticks with restricted local distribution.

Key-words: Argasidae, Toxicosis, Mouro Tick, Caxias do Sul

INTRODUCTION

Ticks are blood-feeding parasites distributed worldwide (1). They can cause various damage to human and animal health, pathogen transmission or by inducing severe injuries directly associated with the tick bite (2). For instance, in North America, *Dermacentor andersoni* (Ixodidae) induces cases of paralysis in humans (3), while *Ornithodoros savignyi* (Argasidae) is the causative agent of a severe and often lethal syndrome known as sand tampan toxicosis in Africa (4). However, these syndromes seem to be associated to salivary toxins rather than some infectious agents. In Southern Brazil, *Ornithodoros brasiliensis* (Argasidae) tick is also known to cause a non-infectious syndrome which leads to systemic changes and severe lesions at the site of the bite (5).

CASE DESCRIPTION

Here, we report a case series associated with *O. brasiliensis* tick parasitism involving eight Brazilian travelers following an ecotourism trail in the Southern Brazil highlands. Between April, 14th and 15th, 2017, they spent the night in tents in the entrance of a cave, close to a waterfall, a tourist attraction in Caxias do Sul municipality (29°02'35.7"S 51°01'36.4"W) (Figure 1, panel A and B). The tourists

reported that seven people from the group woke during the night due to several painful “bug” bites. The guide of the group photographed one of the “bugs” and collected some specimens (Figure 1C).

About one week later, the guide (Case 1, a 48-year-old man), who reported having been bitten approximately 50 times that night, sought medical attention at a municipal health center in Caxias do Sul. He reported intense pruritus at the bite sites and the formation of blisters. He was prescribed with betamethasone dipropionate cream, topically. After two weeks, the patient reported a complete recovery. The guide delivered the collected “bugs” to the medical center. The parasites were identified as two male specimens of *O. brasiliensis* ticks (6).

Four of the other six people who were bitten sought medical attention in their home cities. Cases 2 (a 19-year-old woman) and 3 (a 49-year-old woman) (Figure 1D) were a daughter and mother bitten by approximately 20 ticks on their feet, legs, hands, arms and neck. About four weeks after the episode, since the symptoms had not disappeared, they sought medical attention. They reported a severe pruritus, erythema, edema and blisters at the bite sites. The primary care physician at their home city told them that the tick bites were no reason for concern. They returned several times for consultation. Then, patients 2 and 3 received dexamethasone (IM, two doses) and fexofenadine (oral, SID, for seven days). Due to the severity of her clinical presentation, patient #3 also received systemic antimicrobial therapy. Both patients reported that the lesions and symptoms remained for more than 20 weeks after the episode. Patients 4 and 5 were a couple, a 31-year-old man and a 28-year-old woman. He was bitten by six ticks, and she was bitten by three, both on their hands, abdomen and neck. She noticed severe pruritus, erythema and bruises at bite sites two days after the episode, which lasted for approximately eight weeks. Her husband noticed the

formation of blisters and a loss of sensation around the bite site. The symptoms started about four days after the tick bites. He sought medical attention and his physician prescribed systemic antimicrobial therapy for six days. His symptoms disappeared after seven weeks. All patients that sought medical attention reported that all of their doctors said that they had never treated a victim of tick parasitism or tick-borne diseases, had never heard about a tick bite lesion lasting for such a long time, and that tick bites were no reason for concern.

Patient 6 was a 51-year-old man bitten by 35 ticks. He reported the formation of painful bruises around the tick bite. The symptoms lasted for approximately four weeks. Case 7 was an 18-year-old boy bitten by three ticks on the torso and neck. He did not report any symptoms associated with tick bites.

About two months after the parasitism episode, we visited the local area to search for ticks. A total of two females and eight males of *O. brasiliensis* were found. Ticks and patient's blood samples were further submitted to pathogen investigation. A set of PCRs for *Borrelia* spp. and *Rickettsia* spp. (7,8) was performed. All samples were negative in PCR analysis.

DISCUSSION

Locally known as “mouro tick” or “bicho mouro”, *O. brasiliensis* is also designated as “ground tick” due to the habits of living buried into sand near host inhabitations, cellars, stables and even human habitations, (9, 10). This tick species is responsible to cause severe host reactions to tick bite, in animals (11) and humans (5). However, to date, the salivary compounds which induces such lesions are not fully known. It is known that *O. brasiliensis* salivary gland homogenates display a potent inhibition of endothelial cell proliferation, a crucial step in wound healing (2). In

addition, studies in experimental animals (Wistar rats) have shown changes in the eosinophil and basophil counts, increase in creatine phosphokinase (CPK) and CPK-MB fraction, and fibrinogen level. Moreover, histopathological analysis of bitten rats revealed edema and muscle degeneration tick attachment site. (12).

To the best of our knowledge, this tick species had never been reported previously in the wilderness, i.e., it was only reported underneath or around human habitations in other municipalities of Southern Brazil, São Francisco de Paula and Jaquirana (5). Herein, we reported the occurrence of *O. brasiliensis* in a cave from Caxias do Sul municipality, which could be the natural habitat of this tick species, as for other *Ornithodoros* species (13, 14). According to anecdotal reports from nearby residents, they noticed that for more than 40 years have been reports of "bugs" buried in the sand that often bite people who visit this place, indicating that the presence of ticks in the cave is not recent.

Despite the fact that a toxicosis syndrome associated with *O. brasiliensis* tick bites has been reported in retrospective studies with local inhabitants from Southern Brazil, to date, there are no case reports describing it (5). The case series presented here has particular importance since it occurred with travelers. Medical practitioners should be aware that travelers, especially those returning from trails or camping, should present syndromes only known in locally restricted regions.

Acknowledgments: We especially thank Mr. Clairton Júlio de Lima from the company Lobão Trilhas e Aventuras for the fundamental support in the execution of this work and Eduardo Kieling (SES-RS), Adriana Rhoden (Secretaria Municipal de Saúde de Caxias do Sul, Caxias do Sul, Brazil), Bruna F. Leal, Rovaina Doyle, and Fabrício Tibere Jardim (IPVDF) for their valuable help during field work.

Author Contributions: Study concept and design (BD, JR); obtaining funding (BD, JR); acquisition of the data (BD, DS, TP, PA, UAS, AW, GDS); analysis of the data (BD, DS, TP, PA, UAS, AW, GDS, CASF, JR); drafting of the manuscript (BD, JR); critical revision of the manuscript (BD, AW, CASF, JR); approval of final manuscript (BD, DS, TP, PA, UAS, AW, GDS, CASF, JR).

Financial/Material Support: This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and INCT em Entomologia Molecular.

Disclosure Statement: None.

References

1. Nava S, Guglielmone AA, Mangold AJ. An overview of systematics and evolution of ticks. *Front Biosci (Landmark Ed)*. 2009;14:2857-77. Review. PubMed PMID: 19273240.
2. Reck J, Marks FS, Termignoni C, Guimarães JA, Martins JR. *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) salivary gland homogenates inhibit in vivo wound healing and in vitro endothelial cell proliferation. *Parasitol Res*. 2013;112(4):1749-53. doi: 10.1007/s00436-013-3333-3. Epub 2013 Feb 9. PubMed PMID: 23397378.
3. Morshed M, Li L, Lee MK, Fernando K, Lo T, Wong Q. A Retrospective Cohort Study of Tick Paralysis in British Columbia. *Vector Borne Zoonotic*

Dis. 2017;17(12):821-824. doi: 10.1089/vbz.2017.2168. Epub 2017 Oct 30.
PubMed PMID: 29083955.

4. Mans BJ, Steinmann CM, Venter JD, Louw AI, Neitz AW. Pathogenic mechanisms of sand tampan toxicoses induced by the tick, *Ornithodoros savignyi*. Toxicon. 2002;40(7):1007-16. PubMed PMID: 12076655.

5. Reck J, Marks FS, Guimarães JA, Termignoni C, Martins JR. Epidemiology of *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) in the southern Brazilian highlands and the description of human and animal retrospective cases of tick parasitism. Ticks Tick Borne Dis. 2013;4(1-2):101-9. doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.09.004. Epub 2012 Dec 10. PubMed PMID: 23238249.

6. Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Nieri-Bastos FA, Soares JF, Marcili A, Famadas KM, et al. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. Zootaxa (Auckland. Print). 2012;3178:22–32.

7. Barbieri AM, Venzal JM, Marcili A, Almeida AP, González EM, Labruna MB. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting ticks of the *Ixodes ricinus* complex in Uruguay: first report for the Southern Hemisphere. Vector Borne Zoonotic Dis. 2013;13(3):147-53. doi: 10.1089/vbz.2012.1102. Epub 2013 Feb 12. PubMed PMID: 23402334.

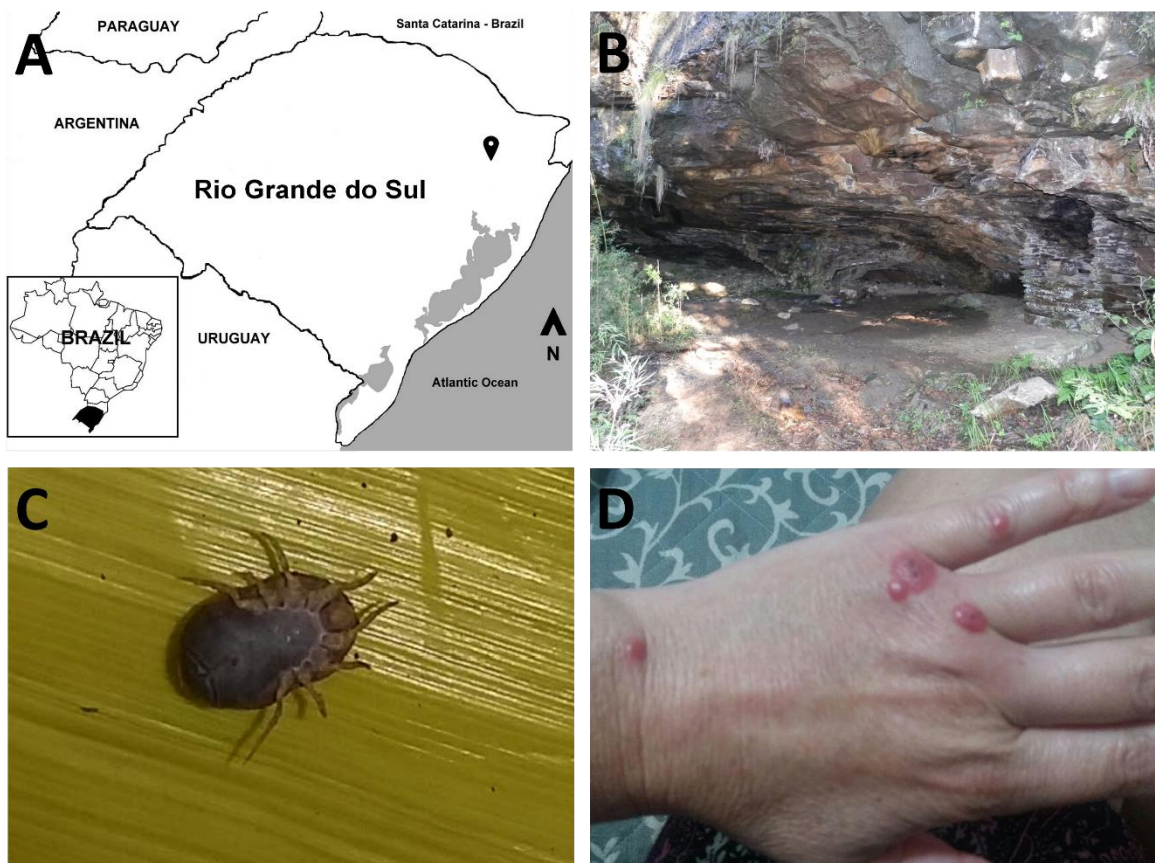
8. Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. J Clin Microbiol. 2004;42(1):90-8. PubMed PMID: 14715737; PubMed Central PMCID: PMC321730.

9. Evans DE, Martins JR, Guglielmone AA. A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2000;95(4):453-70. Review. PubMed PMID: 10904399.
10. Martins JR, Doyle RL, Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Guglielmone AA. Occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil. Neotrop Entomol. 2011;40(1):143-4. PubMed PMID: 21437496.
11. Reck J, Soares JF, Termignoni C, Labruna MB, Martins JR. Tick toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis*. Vet Clin Pathol. 2011;40(3):356-60. doi: 10.1111/j.1939-165X.2011.00338.x. Epub 2011 Aug 9. PubMed PMID: 21827517.
12. Reck J, Bandarra P, Pavarini S, Termignoni C, Driemeier D, Martins JR, et al. Experimentally induced tick toxicosis in rats bitten by *Ornithodoros brasiliensis* (Chelicerata: Argasidae): a clinico-pathological characterization. Toxicon. 2014;88:99-106. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.06.017. Epub 2014 Jun 26. PubMed PMID: 24973739.
13. Guzmán-Cornejo C, García-Prieto L, Rebollo-Hernández A, Venzal JM, Nava S, Sánchez-Montes S. Molecular evidence and additional morphological characters to distinguish *Ornithodoros brodyi* and *Ornithodoros yumatensis* (Ixodida: Argasidae) in their different developmental stages. Acta Parasitol. 2017;1;62(2):432-448. doi: 10.1515/ap-2017-0051. PubMed PMID: 28426405.
14. Guzmán-Cornejo C, García-Prieto L, Nava S, Venzal JM, Sánchez-Montes S, Montiel-Parra G. Redescription of *Ornithodoros dyeri* (Ixodida: Argasidae)

197 based on morphologic and molecular data. Ticks Tick Borne Dis.
198 2016;7(5):834-841. doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.03.015. Epub 2016 Mar 31.
199 PubMed PMID: 27062447.
200

201 Figure caption: A) Rio Grande do Sul state, Brazil, and neighboring countries. Gray
202 shading indicates bodies of water; map-marker indicates the cave from Caxias do Sul
203 municipality. B) Cave entrance where tourists camped. C) Specimen of *O. brasiliensis*
204 found attached to the body of the case 1, collected and photographed by the patient D)
205 Lesions caused by the bite of *Ornithodoros brasiliensis* in the hand of case 3, four
206 weeks after tick bites.

207 Figure



208

209

Artigo Científico 3

***Rickettsia parkeri* in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa**

Artigo científico publicado no periódico científico *Transboundary and Emerging Diseases* publicado pela Wiley.

Fator de impacto: 3.504

Rickettsia parkeri in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa

B. Dall'Agnol^{1,2} | U. A. Souza¹ | B. Weck¹ | T. C. Trigo³ | M. M. A. Jardim³ |
F. B. Costa⁴ | M. B. Labruna⁴ | F. B. Peters⁵ | M. O. Favarini⁵ | F. D. Mazim⁶ |
C. A. S. Ferreira² | J. Reck¹ 

¹Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, Brazil

²Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

³Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB-RS), Porto Alegre, RS, Brazil

⁴Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

⁵Área de Vida Assessoria e Consultoria em Biologia e Meio Ambiente, Canoas, RS, Brazil

⁶Ka'aguy Consultoria Ambiental, Pelotas, RS, Brazil

Correspondence

J. Reck, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Eldorado do Sul, RS, Brazil.
Email: jose.reck@gmail.com

Funding information

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES); INCT Entomologia Molecular

Summary

Spotted fevers are tick-borne diseases associated with various *Rickettsia* species. *Rickettsia parkeri* sensu stricto (s.s.) is the agent of an emerging eschar-associated rickettsiosis in humans from the USA and South American Pampa. Considering that *R. parkeri* s.s. is restricted to Americas and the potential role of dogs in the epidemiology of the disease, it is thus reasonable to hypothesize that wild canids could be involved in the enzootic cycle of this rickettsiosis. The aim of this work was to investigate the potential role of the wild canids from Pampa, *Cerdocyon thous* (crab-eating fox) and *Lycalopex gymnocercus* (Pampas fox), in the ecology of *R. parkeri* s.s. For that, 32 live-trapped free-ranging wild canids were sampled. Ticks were observed in 30 of the 32 foxes. Of the 292 ticks collected, 22 (7.5%) were positive by PCR for the presence of *R. parkeri* s.s. DNA. Also, 20 (62%) wild canids showed antibodies against *R. parkeri*. The results suggest that wild canids are involved in the enzootic cycle of *R. parkeri* s.s. in the Pampa biome and could be responsible for pathogen (and its vectors) dispersal.

KEYWORDS

Amblyomma, *Cerdocyon thous*, *Lycalopex gymnocercus*, rickettsiosis, spotted fever, tick

1 | INTRODUCTION

Spotted fevers are tick-borne diseases associated with various *Rickettsia* species. In the Americas, *Rickettsia parkeri* is the agent of an emerging febrile eschar-associated rickettsiosis in humans (Paddock et al., 2004). In addition to *Rickettsia parkeri* sensu stricto (s.s.), in last years, *R. parkeri*-like agents, such as *Rickettsia* sp. strain Atlantic Rainforest, have also emerged as public health issues (Spolidorio et al., 2010). In the USA, where approximately 40 human cases have been reported in recent years, the main vector of *R. parkeri* s.s. is the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum* (Herrick et al., 2016; Sumner et al., 2007). In South America, *R. parkeri* s.s. has been

incriminated as the major agent of spotted fever in the Uruguayan, Argentinian and Brazilian Pampa (Nava et al., 2008; Venzal et al., 2004; Weck et al., 2016).

In Pampa biome, the main tick vectors of *R. parkeri* s.s. are *Amblyomma triste* and *Amblyomma tigrinum* (Nava et al., 2008; Venzal et al., 2004; Weck et al., 2016), species traditionally found in domestic and wild canids. Recently, in a spotted fever case reported in the Brazilian Pampa (Weck et al., 2016), we observed that the patient's domicile and her dogs were frequently infested by *R. parkeri*-infected *A. tigrinum* ticks. Also, data from the literature indicates there is a high seroprevalence of antibodies against *R. parkeri* in dogs from the Pampa (Lado, Costa, Verdes, Labruna, & Venzal, 2015). The

Pampa biome, also known as Southern America Grasslands or "Campos", lies within the South Temperate Zone and has both subtropical and temperate climates with four well-characterized seasons and with well-distributed rainfall throughout the year (Roesch et al., 2009). Although the Pampa biome is frequently referred as a steppe, the biological uniqueness of the area leads some authors to suggest that Pampa should not be classified under the common accepted international physiographic terms (Overbeck et al., 2007). The vegetation is mainly characterized by grasslands, with sparse shrub and tree formations. The most part of Pampa's soil shows a sandy texture due to its sedimentary rock origin (Roesch et al., 2009).

Considering that *R. parkeri* s.s. is restricted to Americas and the potential role of domestic dogs in the enzootic cycle of the disease, it is thus reasonable to hypothesize that *R. parkeri* s.s. should evolve in close association with South American native wild canids, which in turn, may serve as potential reservoirs for the pathogen and its vectors. Although it has been suggested that wild carnivores could be associated with *R. parkeri* in the USA (Starkey et al., 2013), there are no data about potential natural host(s)/reservoir(s) of *R. parkeri* in South America. In the Pampa biome, the most abundant wild canids are *Cercopithecus thous* (crab-eating fox) and *Lycalopex gymnocercus* (Pampas fox). These canids, locally known as "graxaim" or "sorro", are very tolerant to changes in the environment, and can be found in cultivated areas, and even in the vicinity of urbanized areas (Beisiegel, Lemos, Azevedo, Queirolo, & Jorge, 2013; Gonçalves, Quintela, & Freitas, 2014; Queirolo, Kasper, & Beisiegel, 2013). Thus, the aim of this work was to investigate the potential role of the wild canids found in the Pampa, *C. thous* and *L. gymnocercus*, in the ecology of *R. parkeri* s.s.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study site and capture events

From December 2014 to December 2016, wild canids were captured in four municipalities within the Pampa biome in the Rio Grande do Sul (RS) state, southern Brazil: Santana do Livramento (30°25'53.1"S 55°28'09.9"W), Triunfo (29°51'58.1"S 51°21'54.5"W), Viamão (30°05'32.0"S 50°51'00.0"W) and Candiota (31°28'59.8"S 53°48'44.1"W) (Figure 1). *C. thous* and *L. gymnocercus* (Figure 2, Panels a and b) were captured using tomahawk live-traps. Once trapped, animals were anesthetized using an association of ketamine (10 mg/kg) and xylazine (1 mg/kg). Then, animals underwent a physical examination and collection of blood samples and ticks. Blood samples were collected by a single jugular vein puncture, using vacuum blood collection system and plastic tubes containing EDTA (approximately 4 ml blood) and serology tubes without anticoagulant (approximately 2 ml blood). Total blood and serum samples were stored at -20°C for further analysis. Ticks were manually collected from animals and immediately placed in ethanol. After full recovery from anaesthesia, animals were released at the site of capture. The study protocol was approved by our Committee for Animal Care and Experimentation (CEUA/IPVDF 28/2014) and by Brazilian biodiversity authorities (SISBIO 47357-3).

2.2 | Blood tests and detection of antibodies against *Rickettsia* spp.

Blood samples were submitted to haematological analysis in an automated veterinary haematology analyzer (Bio-1800 Vet®, Bioeasy Diagnostica S/A, Belo Horizonte, Brazil). The following parameters were analysed: red blood cells (RBC) count, haemoglobin (Hb), packed cell volume (PCV) and white blood cells (WBC) count. The reference values were obtained from Mattoso, Catenacci, Beier, Lopes, and Takahira (2012). Serum samples of wild canids were tested individually for the presence of antibodies against *Rickettsia* spp. by indirect immunofluorescence assay (IFA), as previously described (Labruna et al., 2007). As the antigen, five *Rickettsia* isolates from Brazil were used: *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia amblyommatis*, *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii*. Samples that reacted at the screening dilution (1:64) were then titrated using serial 2-fold dilutions to determine endpoint titres. Reactions were performed using fluorescein-conjugated anti-dog IgG (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). For all reactions, negative and positive controls were included on each slide. Positive control sera were obtained from experimentally *Rickettsia*-infected dogs (Piranda et al., 2008); and negative controls were obtained from specific pathogen-free Beagle dogs.

2.3 | Ticks and molecular detection of *Rickettsia* spp.

Ticks were identified by morphologic dichotomous keys (Barros-Battesti, Arzua, & Bechara, 2006; Martins, Onofrio, Barros-Battesti, & Labruna, 2010). Parasitism prevalence and mean parasite abundance, and their respective confidence intervals, were calculated using the online tool QPweb (the web version of Quantitative Parasitology 3.0 software, available at www2.univet.hu/qpweb/qp10/). Ticks and fox blood samples were individually subjected to DNA extraction using the PureLink Genomic DNA MiniKit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DNA from ticks or blood samples was screened for *Rickettsia* spp. using a PCR assay for a 401 bp fragment of the citrate synthase (*gltA*) gene (Labruna et al., 2004), and positive samples were further tested for a 617 bp fragment of *ompA* from the spotted fever group (SFG) *Rickettsia* spp. (Regnery, Spruill, & Plikaytis, 1991). Positive samples were further analysed by PCR amplification of *htrA* fragment (549 bp; Labruna et al., 2004). Sequencing of PCR products from *ompA* and *htrA* was performed, and sequence comparisons were carried out using the BLAST algorithm.

3 | RESULTS

Of the 32 wild canids sampled, 27 were *C. thous* and five were *L. gymnocercus*. Only *C. thous* individuals were captured in the Triunfo, Santana do Livramento and Viamão municipalities, two in the



FIGURE 1 Setting for investigation of *Rickettsia parkeri* sensu stricto in wild canids from Brazilian Pampa. Rio Grande do Sul state, Brazil, and neighbouring countries. Light grey shading indicates the Pampa biome; dark grey shading indicates bodies of water; foxes indicate the sites of capture, as follows: (1) Santana do Livramento, (2) Candiota, (3) Triunfo and (4) Viamão municipalities

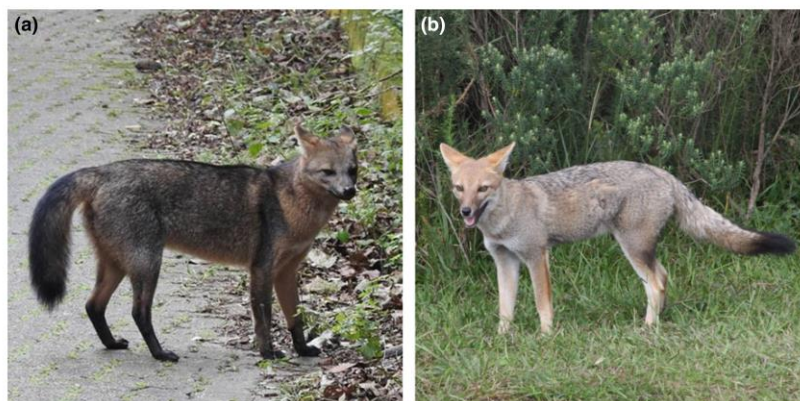


FIGURE 2 Wild canids sampled in this study. Panel a, *Cerdocyon thous* (crab-eating fox). Panel b, *Lycalopex gymnocercus* (Pampas fox)

first municipality and 11 in each of the latter two. Candiota was the only municipality in which *L. gymnocercus* was captured, resulting in five individuals and three additional *C. thous* specimens. All animals trapped were clinically healthy.

Ticks were observed attached (Figure 3, Panel a) in 30 of the 32 sampled wild canids (93.8% parasitism prevalence, CI 95% = 79.2–99.2). Only one *C. thous* and one *L. gymnocercus* from Candiota were not parasitized by ticks. Parasite infestation ranged from 0 to 29 ticks per fox (mean parasite abundance = 9.12; CI 95% = 6.62–12). The following ticks were recorded: 197 *Amblyomma aureolatum*, seven *A. tigrinum*, four *A. triste*, one *Amblyomma dubitatum*, 51 *Amblyomma* spp. larvae and 32 *Rhipicephalus microplus*. In one *C. thous*, we recorded an eschar at the tick (*A. aureolatum*) attachment site (Figure 3, Panel b).

Of the 292 ticks collected, 22 (7.5%) were positive in all PCR analyses for *Rickettsia* spp. Twenty *A. aureolatum* ticks from crab-

eating foxes (15 from Santana do Livramento and five from Triunfo) and two *A. tigrinum* (one in a crab-eating fox and one in a Pampas fox) from Candiota were positive for *Rickettsia* spp. Blood samples of foxes were negative in all PCR analyses for *Rickettsia* spp. All sequences obtained from *ompA* and *htrA* rickettsial genes were identical and showed 100% identity to sequences from the *R. parkeri* s.s. clone RS (GenBank accession no. KX196265.1 and KX196266.1, respectively), which was previously detected in *A. tigrinum* ticks from dogs of an area endemic for spotted fever in the Brazilian Pampa (Weck et al., 2016). The infection rate of *R. parkeri* in ticks from wild canids was 10% for *A. aureolatum* and 28% for *A. tigrinum*.

Three of four regions investigated presented wild canids harbouring ticks positive for *R. parkeri*, and among the 32 wild canids sampled, 11 (34%) showed at least one tick positive for *R. parkeri*. Twenty-seven (84.3%) sera of wild canids tested by

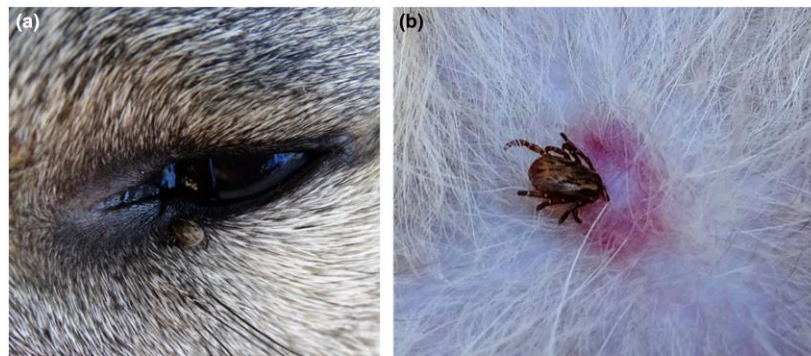


FIGURE 3 Ticks identified in wild canids from Brazilian Pampa. Panel a, *Amblyomma aureolatum* male tick attached near to the left eye of a crab-eating fox. Panel b, *A. aureolatum* male tick attached at the abdomen of a crab-eating fox. Note the eschar at the tick attachment site

IFA were positive for the presence of antibodies against *Rickettsia* spp. (titre > 1:64). Among these animals, 20 (74% of seropositive) showed a higher antibody titre against *R. parkeri* than against other rickettsial species. Despite the well-known cross-reactivity between *Rickettsia* species in serology tests, 11 canids showed antibody titres to *R. parkeri* that were more than 4-fold higher than endpoint titres to any other rickettsial antigen tested. Table 1 summarizes the information on the sampled wild canids, and the results of serology tests and of PCR analysis. Table S1 shows the results of antibody titration of each sampled animal against all antigens tested, as well as, the geometric mean titres (from each capture site) for each antigen tested. The average values of haematological parameters from sampled foxes were as follows: RBC $4.61 \times 10^6/\mu\text{L}$; Hb 12.92 g/dl; PCV 39.8%; WBC $15.11 \times 10^3/\mu\text{L}$. No animal showed abnormalities in haematological parameters in comparison with reference values. There was no difference between the average values of haematological parameters of seropositive and seronegative foxes ($p > .05$).

4 | DISCUSSION

Tick-borne diseases cannot be understood unless under the umbrella of one health approach (Oura, 2014), as it is directly associated with human, (wild and domestic) animals and the environment. Moreover, the risk of tick-borne diseases seems to be linked with some human activities, such as hunting and eco-tourism, as well as, the expansion of cities over wilderness areas (Bayles, Evans, & Allan, 2013; Bermúdez et al., 2016). These activities also increase the odds for contact between domestic and wild animals and create opportunities for parasites/pathogens exchange. In this sense, it is noteworthy that the majority of spotted fever cases in Rio Grande do Sul state, only part of Brazil located in the Pampa biome, occurred in people involved in illegal hunting using dogs (unpublished data kindly provided by Centro Estadual de Vigilância em Saúde—CEVS, State Health Department).

Despite the recent emergence of *R. parkeri* s.s. as the principal agent of spotted fever in the South American Pampa (Nava et al., 2008; Romer et al., 2011; Venzal et al., 2004; Weck et al., 2016, 2017), there is no epidemiological information

concerning its potential natural host(s). Previous studies of *R. parkeri* rickettsiosis in the South American Pampa biome found that domestic dogs had a high frequency of *R. parkeri*-infected ticks and antibodies against *R. parkeri*. Moreover, in these areas, *R. parkeri*-infected ticks found in dogs belong to those tick species classically associated with wild carnivore hosts, particularly wild canids (Lado, Castro, Labruna, & Venzal, 2014; Weck et al., 2016).

Here, we report that the majority of wild canids from different sites of the Pampa biome showed high antibody titres against *R. parkeri* and that at least one-third of them were carrying *R. parkeri*-infected ticks. Concerning the potential role of wild canids as reservoirs of *R. parkeri* s.s. in the South American Pampa, we must take into account that the fox species investigated are as follows: (i) highly abundant in the Pampa (Beisiegel et al., 2013; Gonçalves et al., 2014; Queirolo et al., 2013); (ii) well adapted to live in habitats changed by humans and domestic animals (Beisiegel et al., 2013; Gonçalves et al., 2014; Queirolo et al., 2013); and (iii) are frequently parasitized by ticks already associated with spotted fever (Evans, Martins, & Guglielmo, 2000). Based on the above observations and the data reported here, it is plausible that wild canids are involved in the enzootic cycle of *R. parkeri* and have an important role in the dispersal of the ticks infected by *R. parkeri* in the Pampa biome.

We also report the detection of *R. parkeri* s.s. in *A. aureolatum* for the first time, a tick species widespread in Brazil, and previously associated with other spotted fever pathogens, such *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*-like strain Atlantic Rainforest (Medeiros et al., 2011; Szabó, Pinter, & Labruna, 2013). So, these results place *A. aureolatum* tick as a vector species associated with the major distinct spotted fever pathogens involved in cases of spotted fever in Brazil.

Given that wild and domestic canids share habitats and ticks, we must also consider the potential role of domestic dogs in the epidemiology of *R. parkeri* in the Pampa. Indeed, as a part of another study using camera-traps in the same locality studied here (Santana do Livramento), we registered domestic and wild canids sharing the same habitat (Figure 4). Thus, domestic dogs can act as bridge-hosts (Sepúlveda et al., 2014), that is they carry the infected vector from the habitat of the natural host (foxes) to the habitat (houses) of the

TABLE 1 Wild canids sampled, serology tests and PCR analysis

Capture site	Wild canids species	Sample	Sex	Age	Rickettsia serology		Rickettsia PCR-positive ticks
					Species with the highest titre	Antibody titre	
Santana do Livramento	<i>C. thous</i>	C3	Male	Adult	<i>R. parkeri</i>	2,048	—
	<i>C. thous</i>	C5	Male	Juvenile	<i>R. parkeri/R. rickettsii</i>	64	1 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>C. thous</i>	C6	Male	Juvenile	<i>R. parkeri</i>	16,384	—
	<i>C. thous</i>	C7	Female	Juvenile	NR	—	2 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>C. thous</i>	C8	Female	Adult	<i>R. parkeri</i>	16,384	3 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>C. thous</i>	C9	Male	Adult	<i>R. parkeri</i>	512	2 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>C. thous</i>	C10	Female	Adult	<i>R. parkeri</i>	4,096	1 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>C. thous</i>	C11	Male	Adult	<i>R. parkeri/R. rickettsii</i>	256	—
	<i>C. thous</i>	C12	Male	Adult	NR	—	1 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>C. thous</i>	C13	Male	Adult	<i>R. parkeri/R. rickettsii</i>	256	—
	<i>C. thous</i>	C16	Male	Adult	<i>R. parkeri</i>	2,048	5 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
Triunfo	<i>C. thous</i>	C14	Male	Adult	<i>R. parkeri/R. rickettsii</i>	128	1 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>C. thous</i>	C15	Male	Adult	<i>R. rickettsii</i>	2,048	4 <i>A. aureolatum</i> (<i>R. parkeri</i>)
Viamão	<i>C. thous</i>	C17	Male	Adult	<i>R. parkeri</i>	256	—
	<i>C. thous</i>	C18	Male	Senile	<i>R. parkeri</i>	8,192	—
	<i>C. thous</i>	C19	Female	Senile	<i>R. parkeri</i>	4,096	—
	<i>C. thous</i>	C20	Male	Juvenile	<i>R. parkeri</i>	128	—
	<i>C. thous</i>	C21	Male	Adult	NR	—	—
	<i>C. thous</i>	C22	Male	Adult	<i>R. parkeri</i>	1,024	—
	<i>C. thous</i>	C23	Female	Adult	<i>R. parkeri</i>	16,384	—
	<i>C. thous</i>	C24	Male	Juvenile	<i>R. parkeri</i>	64	—
	<i>C. thous</i>	C26	Female	Juvenile	<i>R. parkeri</i>	512	—
	<i>C. thous</i>	C27	Male	Senile	<i>R. parkeri</i>	1,024	—
Candiota	<i>C. thous</i>	C28	Female	Juvenile	NR	—	—
	<i>C. thous</i>	C29	Female	Juvenile	<i>R. rhipicephali</i>	256	—
	<i>C. thous</i>	C31	Male	Adult	<i>R. parkeri</i>	256	—
	<i>C. thous</i>	C37	Male	Adult	<i>R. parkeri/R. rhipicephali</i>	8,192	1 <i>A. tigrinum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>L. gymnocercus</i>	C30	Female	Adult	<i>R. parkeri</i>	8,192	—
	<i>L. gymnocercus</i>	C32	Male	Adult	<i>R. parkeri</i>	512	—
	<i>L. gymnocercus</i>	C34	Female	Adult	<i>R. parkeri</i>	16,384	—
	<i>L. gymnocercus</i>	C38	Female	Adult	<i>R. parkeri</i>	2,048	1 <i>A. tigrinum</i> (<i>R. parkeri</i>)
	<i>L. gymnocercus</i>	C39	Male	Adult	NR	—	—

NR, Non reactive.

susceptible population (humans). In this context, both wild and domestic canids may serve as sentinels in future epidemiological studies on *R. parkeri* s.s. and spotted fever in the South American Pampa.

The results showed that *Rickettsia* spp. could infect and circulate among the great part of wild canids from Pampa. Also, antibody titres indicated that *R. parkeri* s.s. is the most prevalent *Rickettsia* species among sampled foxes. In addition, that both crab-eating fox and Pampas fox can harbour tick species associated with spotted fever, at least one-third of them carry *R. parkeri*-infected ticks. Thus, the results suggest that wild canids are involved in the enzootic

cycle of *R. parkeri* s.s. in the Pampa biome and could be responsible for pathogen (and its vectors) dispersal.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Mariano Cordeiro Pairet Jr. (FZB), André Osório Rosa (RVSBP), Ana Paula Albano (UFPEL), José Bonifácio Soares (Ka'aguy), Viviane Kélin de Souza (IPVDF), Anelise Webster (IPVDF) and Diogo Schott (IPVDF) for their valuable help during field work. This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de



FIGURE 4 Camera trap records showing the habitat sharing between domestic dogs and wild canids in Santana do Livramento municipality. Panel a, domestic dog. Panel b, *Cerdocyon thous* (crab-eating fox), approximately 72 hr after the record of the image showed in Panel a. Panel c, domestic dog recorded approximately 5 days after the *C. thous* recorded in Panel b

Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Projeto RS Biodiversidade, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and INCT Entomologia Molecular.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there are no conflict of interests.

ORCID

J. Reck  <http://orcid.org/0000-0002-0969-792X>

REFERENCES

- Barros-Battesti, D. M., Arzua, M., & Bechara, G. H. (2006). *Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo, Brazil: Vox/ICTTD-3/Butantan.
- Bayles, B. R., Evans, G., & Allan, B. F. (2013). Knowledge and prevention of tick-borne diseases vary across an urban-to-rural human land-use gradient. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 4, 352–358. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.01.001>
- Beisiegel, B. M., Lemos, F. G., Azevedo, F. C., Queirolo, D., & Jorge, R. S. P. (2013). Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3, 138–145.
- Bermúdez, S. E., Castro, A. M., Trejos, D., García, G. G., Gabster, A., Miranda, R. J., ... Paternina, L. E. (2016). Distribution of spotted fever group rickettsiae in hard ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments (2007–2013). *EcoHealth*, 13, 274–284. <https://doi.org/10.1007/s10393-016-1118-8>
- Evans, D. E., Martins, J. R., & Guglielmone, A. A. (2000). A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 453–470.
- Gonçalves, G. L., Quintela, F. M., & Freitas, T. R. O. (2014). *Mamíferos do Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, Brazil: Pacartes.
- Herrick, K. L., Pena, S. A., Yaglom, H. D., Layton, B. J., Moors, A., Loftis, A. D., ... Paddock, C. D. (2016). *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Arizona, USA. *Emerging Infectious Diseases*, 22, 780–785. <https://doi.org/10.3201/eid2205.151824>
- Labruna, M. B., Horta, M. C., Aguiar, D. M., Cavalcante, G. T., Pinter, A., Gennari, S. M., & Camargo, L. M. (2007). Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7, 249–255.
- Labruna, M. B., Whitworth, T., Horta, M. C., Bouyer, D. H., McBride, J. W., Pinter, A., ... Walker, D. H. (2004). *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, 42, 90–98.
- Lado, P., Castro, O., Labruna, M. B., & Venzal, J. M. (2014). First molecular detection of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* and *Amblyomma dubitatum* ticks from Uruguay. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 5, 660–662. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.021>
- Lado, P., Costa, F. B., Verdes, J. M., Labruna, M. B., & Venzal, J. M. (2015). Seroepidemiological survey of *Rickettsia* spp. in dogs from the endemic area of *Rickettsia parkeri* rickettsiosis in Uruguay. *Acta Tropica*, 146, 7–10. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.014>
- Martins, T. F., Onofrio, V. C., Barros-Battesti, D. M., & Labruna, M. B. (2010). Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 1, 75–99. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.03.002>
- Mattoso, C. R., Catenacci, L. S., Beier, S. L., Lopes, R. S., & Takahira, R. K. (2012). Hematologic, serum biochemistry and urinary values for captive Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) in São Paulo state, Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 32, 559–566.
- Medeiros, A. P., Souza, A. P., Moura, A. B., Lavina, M. S., Bellato, V., Sartor, A. A., ... Labruna, M. B. (2011). Spotted fever group *Rickettsia*

- infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 926–930.
- Nava, S., Elshenawy, Y., Eremeeva, M. E., Sumner, J. W., Mastropaolo, M., & Paddock, C. D. (2008). *Rickettsia parkeri* in Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1894–1897. <https://doi.org/10.3201/eid1412.080860>
- Oura, C. (2014). A One Health approach to the control of zoonotic vector-borne pathogens. *Veterinary Record*, 174, 398–402. <https://doi.org/10.1136/vr.g2539>
- Overbeck, G. E., Muller, S. C., Fidelis, A., Pfadenhauer, J., Pillar, V. D., Blanco, C. C., ... Forneck, E. D. (2007). Brazil's neglected biome: The South Brazilian Campos. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 9, 101–116.
- Paddock, C. D., Sumner, J. W., Comer, J. A., Zaki, S. R., Goldsmith, C. S., Goddard, J., ... Ohl, C. A. (2004). *Rickettsia parkeri*: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, 38, 805–811.
- Piranda, E. M., Faccini, J. L., Pinter, A., Saito, T. B., Pacheco, R. C., Hagiwara, M. K., & Labruna, M. B. (2008). Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: Clinical and laboratory findings. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 696–701.
- Queirolo, D., Kasper, C. B., & Beisiegel, B. M. (2013). Avaliação de risco de extinção do Graxaim-do-campo *Lycalopex gymnocercus* (G. Fischer, 1814) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3, 172–178.
- Regnery, R. L., Spruill, C. L., & Plikaytis, B. D. (1991). Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, 173, 1576–1589.
- Roesch, L. F. W., Vieira, F. C. B., Pereira, V. A., Schünemann, A. L., Teixeira, I. F., Senna, A. J. T., & Stefenon, V. M. (2009). The Brazilian Pampa: A fragile biome. *Diversity*, 1, 182–198. <https://doi.org/10.3390/d1020182>
- Romer, Y., Seijo, A. C., Crudo, F., Nicholson, W. L., Varela-Stokes, A., Lash, R. R., & Paddock, C. D. (2011). *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 1169–1173. <https://doi.org/10.3201/eid1707.101857>
- Sepúlveda, M. A., Singer, R. S., Silva-Rodríguez, E. A., Eguren, A., Stowhas, P., & Pelican, K. (2014). Invasive American mink: Linking pathogen risk between domestic and endangered carnivores. *EcoHealth*, 11, 409–419. <https://doi.org/10.1007/s10393-014-0917-z>
- Spolidorio, M. G., Labruna, M. B., Mantovani, E., Brandao, P. E., Richtzenhain, L. J., & Yoshinari, N. H. (2010). Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 16, 521–523. <https://doi.org/10.3201/eid1603.091338>
- Starkey, L. A., West, M. D., Barrett, A. W., Saucier, J. M., O'Connor, T. P., Paras, K. L., ... Little, S. E. (2013). Prevalence of antibodies to spotted fever group *Rickettsia* spp. and *Ehrlichia* spp. in coyotes (*Canis latrans*) in Oklahoma and Texas, USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 49, 670–673. <https://doi.org/10.7589/2012-08-215>
- Sumner, J. W., Durden, L. A., Goddard, J., Stromdahl, E. Y., Clark, K. L., Reeves, W. K., & Paddock, C. D. (2007). Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) and *Rickettsia parkeri*, United States. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 751–753.
- Szabó, M. P., Pinter, A., & Labruna, M. B. (2013). Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3, 27. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00027>
- Venzal, J. M., Portillo, A., Estrada-Peña, A., Castro, O., Cabrera, P. A., & Oteo, J. A. (2004). *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*, 10, 1493–1495.
- Weck, B., Dall'Agnol, B., Souza, U., Webster, A., Stenzel, B., Klafke, G., ... Reck, J. (2016). Spotted fever group *Rickettsia* in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. *Emerging Infectious Diseases*, 22, 2014–2016. <https://doi.org/10.3201/eid2211.160859>
- Weck, B., Dall'Agnol, B., Souza, U., Webster, A., Stenzel, B., Klafke, G., ... Reck, J. (2017). *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. *Acta Tropica*, 171, 182–185. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2017.03.028>

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Dall'Agnol B, Souza UA, Weck B, et al. *Rickettsia parkeri* in free-ranging wild canids from Brazilian Pampa. *Transbound Emerg Dis*. 2018;65:e224–e230. <https://doi.org/10.1111/tbed.12743>

Supplementary Table 1: Antibody titers for *Rickettsia* spp. in free-ranging wild canids from southern Brazil.

Capture site	Wild canids species	Sample	Sex	Age	Antibody titer				
					<i>R. parkeri</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. amblyommatis</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. bellii</i>
Santana do Livramento	<i>C. thous</i>	C3	Male	Adult	2048	512	512	128	NR
	<i>C. thous</i>	C5	Male	Juvenile	64	64	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C6	Male	Juvenile	16384	4096	8192	4096	1024
	<i>C. thous</i>	C7	Female	Juvenile	NR	NR	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C8	Female	Adult	16384	2048	2048	256	NR
	<i>C. thous</i>	C9	Male	Adult	512	64	256	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C10	Female	Adult	4096	128	64	512	64
	<i>C. thous</i>	C11	Male	Adult	256	256	64	128	NR
	<i>C. thous</i>	C12	Male	Adult	NR	NR	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C13	Male	Adult	256	256	64	64	NR
	<i>C. thous</i>	C16	Male	Adult	2048	512	NR	512	NR
Geometric mean (n = 11)					1290.15	348.36	344.55	312.06	256
Triunfo	<i>C. thous</i>	C14	Male	Adult	128	128	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C15	Male	Adult	NR	2048	NR	512	NR
Geometric mean (n = 2)					128	512	-	512	-
Viamão	<i>C. thous</i>	C17	Male	Adult	256	128	128	64	NR
	<i>C. thous</i>	C18	Male	Senile	8192	512	256	512	NR
	<i>C. thous</i>	C19	Female	Senile	4096	128	256	2048	NR
	<i>C. thous</i>	C20	Male	Juvenile	128	64	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C21	Male	Adult	NR	NR	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C22	Male	Adult	1024	256	512	512	256
	<i>C. thous</i>	C23	Female	Adult	16384	256	512	2048	NR
	<i>C. thous</i>	C24	Male	Juvenile	64	NR	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C26	Female	Juvenile	512	256	256	256	NR
	<i>C. thous</i>	C27	Male	Senile	1024	128	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C28	Female	Juvenile	NR	NR	NR	NR	NR
Geometric mean (n = 11)					948.09	181.01	287.35	512	256
Candiota	<i>C. thous</i>	C29	Female	Juvenile	128	128	128	256	NR
	<i>C. thous</i>	C31	Male	Adult	256	NR	NR	NR	NR
	<i>C. thous</i>	C37	Male	Adult	8192	512	512	8192	NR
	<i>L. gymnocercus</i>	C30	Female	Adult	8192	256	512	512	NR
	<i>L. gymnocercus</i>	C32	Male	Adult	512	64	NR	NR	NR
	<i>L. gymnocercus</i>	C34	Female	Adult	16384	4096	8192	2048	NR
	<i>L. gymnocercus</i>	C38	Female	Adult	2048	128	256	512	NR
	<i>L. gymnocercus</i>	C39	Male	Adult	NR	NR	NR	NR	NR
Geometric mean (n = 8)					1680.04	287.35	588.13	1024	-
GEOMETRIC MEAN (n = 32)					1139.23	278.20	376.25	512	256

NR: not reactive at a serum dilution of 1:64

Capítulo 3

Considerações Finais

3.1 Considerações finais

Doenças vetoriais são temas extremamente complexos de serem estudados à medida que abrangem as interrelações de organismos diversos como patógenos (protozoários, bactérias ou vírus), vetores (artrópodes, moluscos) e hospedeiros vertebrados (mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes). Essas relações nem sempre são tão claras e muitas vezes outros atores estão envolvidos, como por exemplo, bactérias que desenvolvem uma relação de simbiose com os vetores e podem impedir a infecção do vetor pelo patógeno. Sobre essas relações entre organismos podemos dizer que datam dos primórdios da vida na terra e foram de fundamental importância para a evolução das espécies que conhecemos hoje. Essas relações estão sempre em transformação, sendo que patógenos podem evoluir para simbiontes e o oposto também pode ser verdadeiro (127). Ao longo da história evolutiva dos seres vivos, estabeleceram-se relações entre os metazoários e pequenos ou grandes consórcios de microrganismos, que favoreceram a sobrevivência neste planeta. A literatura é rica em exemplos de várias associações entre artrópodes e microbiota que modulam aspectos essenciais do seu ciclo de vida, incluindo aptidão reprodutiva, sobrevivência e competência vetorial (49).

Geralmente, simbiontes são encontrados em grandes quantidades e são transmitidos para os descendentes por via transovariana em grande proporção. Sabe-se que alguns simbiontes são responsáveis pelo efeito “male-killer”, ou seja, a morte dos machos da prole. Também são responsáveis por produzir compostos não adquiridos pela dieta como, por exemplo, vitaminas do complexo B para artrópodes hematófagos, pois o sangue de vertebrados é pobre nestes compostos. Vários patógenos de vertebrados causam também um efeito deletério no artrópode vetor. Simbiontes também

podem atuar como competidores pelos sítios de infecção no artrópode colaborando para a resistência do artrópode à infecção pelo patógeno (67).

O conhecimento da composição da microbiota dos artrópodes vetores e dos benefícios que os simbiossiontes proporcionam a estes pode colaborar para no futuro desenvolvermos métodos de controle dos artrópodes baseados no ataque à sua microbiota, indispensável para sua sobrevivência. Essa pode ser uma estratégia alternativa, visto a crescente seleção de vetores resistentes aos tratamentos químicos convencionais (169). Guizzo e colaboradores (107) mostraram que o tratamento de *Rhipicephalus microplus* com antimicrobianos causou a morte de *Coxiella* endossimbionte nos carrapatos e conseqüentemente a incapacidade dos carrapatos em completar seu ciclo evolutivo. Dessa forma, nós determinamos aqui o microbioma de duas espécies de carrapatos neotropicais de importância em Saúde Pública e Veterinária, *Amblyomma aureolatum* e *Ornithodoros brasiliensis*.

O carrapato *A. aureolatum* pode atuar como vetor de *Rickettsia rickettsii* e outras espécies de *Rickettsia* já foram encontradas infectando essa espécie, tal como *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (33,35). A espécie *A. aureolatum* também é o vetor do protozoário *R. vitalii*, que causa a doença conhecida como Rangeliose em cães em alguns países da América do Sul (36). A bactéria *Francisella* sp. foi o principal gênero bacteriano encontrado em *A. aureolatum*. Esse gênero é conhecidamente o principal endossimbionte em outras espécies de carrapatos como *A. maculatum* e *Dermacentor* spp. (94,170) e estudos demonstram que ele possa ter evoluído do patógeno *Francisella tularensis* através de um processo de evolução reduitiva (127). Endossimbiontes do gênero *Francisella* são importantes para a fisiologia do carrapato pois seu genoma contém vias intactas para a síntese de várias vitaminas do complexo B e cofatores ausentes no sangue de vertebrados (171).

Na análise do microbioma de *A. aureolatum* também encontramos sequências de DNA de bactérias do gênero *Rickettsia*. Aprofundando as análises sobre esse gênero determinamos a presença do DNA de *Rickettsia parkeri* s.s. e encontramos altos títulos de anticorpos nos hospedeiros naturais, canídeos silvestres das espécies *Cerdocyon thous* e *Lycalopex gymnocercus*, demonstrando possíveis reservatórios desse patógeno no bioma Pampa brasileiro. O patógeno *R. parkeri* s.s tem sido associado a casos de Febre Maculosa no bioma Pampa e no estado do RS já foi encontrado em *Amblyomma tigrinum*, *Amblyomma dubitatum* e *Haemaphysalis juxtakochi* (135-137). Esta espécie de *Rickettsia* parece estar amplamente distribuída no bioma Pampa, porém nunca havia sido encontrada em carrapatos da espécie *A. aureolatum*. Esse achado, somado as evidências sorológicas, demonstra que canídeos silvestres podem atuar como reservatórios de *R. parkeri* s.s. no bioma Pampa do RS e que os carrapatos que parasitam esses carnívoros podem atuar como vetores desse patógeno para humanos.

O carrapato *Ornithodoros brasiliensis* é uma espécie com registros apenas para o Brasil, no estado do Rio Grande do Sul na Região dos Campos de Cima da Serra nos municípios de São Francisco de Paula e Jaquirana (38). Esta espécie possui importância pois um quadro de toxicose causado pelo parasitismo desse carrapato já foi descrito em humanos e animais (38,44). O principal gênero bacteriano encontrado em *O. brasiliensis* foi *Coxiella*. Esse gênero infecta pelo menos dois terços das espécies de carrapatos (67) e foi identificado em carrapatos dos gêneros *Rhipicephalus*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Ornithodoros*, *Argas* e *Carios*, sendo o mais comum simbionte maternalmente transmitido em carrapatos (107). O genoma de *Coxiella* endossimbionte mostrou codificar vias principais de síntese de vitamina B, como biotina (vitamina B7), ácido fólico (B9), riboflavina (B2) e seus cofatores, que não são usualmente obtidos em quantidades suficientes a partir de uma dieta exclusivamente

sanguínea. A análise do genoma de *Coxiella* endossimbionte de *Rhiphicephalus* spp. revelou o excesso de produção de L-prolina, indicando um possível transporte de prolina de *Coxiella* sp. para o carrapato. Adicionalmente, o genoma de *Coxiella* sp. codifica múltiplas cópias do transportador de prolina/betaína, gene proP indicando um possível mecanismo de simbiose (172).

No nosso trabalho também ampliamos a distribuição conhecida de *Ornithodoros brasiliensis* para o município de Caxias do Sul, o segundo município mais populoso do RS, e registramos o parasitismo humano em um grupo de turistas que praticavam trilhas pelas matas do município. Esse também foi o primeiro registro de *Ornithodoros brasiliensis* em cavernas, fato que contribui para o entendimento da eco-epidemiologia e história evolutiva dessa espécie de carrapato.

Por fim, os resultados encontrados aqui contribuem para o entendimento da eco-epidemiologia das relações entre bactérias e carrapatos de interesse em saúde pública no Rio Grande do Sul. Espera-se que a caracterização da microbiota dessas espécies de carrapatos aliada à pesquisa de patógenos nesses vetores possa auxiliar no desenvolvimento de novas pesquisas a fim de prevenir as doenças transmitidas por vetores no estado e a entender a história natural desses parasitos.

Referências Bibliográficas

1. Grisi L, Leite RC, Martins JR, Barros AT, Andreotti R, Cançado PH, et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2014;23(2):150-156.
2. Rossati A. Global Warming and Its Health Impact. *Int J Occup Environ Med.* 2017;8(1):7-20.
3. Nava S, Venzal JM, González-Acuña D, Martins TF, Guglielmone AA. Ticks of the Southern Cone of America: Diagnosis, Distribution, and Hosts with Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance. 2017. Academic Press. 372 pg.
4. Sonenshine DE, Roe RM. Overview. Ticks, people and animals. In: 2nd ed. Sonenshine DE, Roe RM, editors. *Tick biology*, vol. 1. Oxford: Oxford University Press; 2014. p. 3-16.
5. Peñalver E, Arillo A, Delclòs X, Peris D, Grimaldi DA, Anderson SR, et al. Parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. *Nat Commun.* 2017;8(1):1924.
6. Klompen H, Grimaldi D. First Mesozoic record of a parasitiform mite: a larval argasid tick in Cretaceous amber (Acari: Ixodida: Argasidae). *Annals of the Entomological Society of America.* 2001;94:10–15.
7. Huchet JB, Callou C, Lichtenberg R, Dunand F. The dog mummy, the ticks and the louse fly: Archaeological report of severe ectoparasitosis in Ancient Egypt. *Int J Paleopathol.* 2013;3(3):165-175.
8. Krantz, G.W. *A Manual of Acarology*, 2nd ed. Oregon State University BookStores, Corvallis, OR, USA. 1978. 509 pg.
9. NCBI taxonomy database. National Center for Biotechnology Information. 2019. Acesso em: 03 de março de 2019. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=6935>
10. Gianizella SL, Martins TF, Onofrio VC, Aguiar NO, Gravena W, do Nascimento CAR, et al. Ticks (Acari: Ixodidae) of the state of Amazonas, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 2018;74(2):177-183.
11. Muñoz-Leal S, Barbier E, Soares FAM, Bernard E, Labruna MB, Dantas-Torres F. New records of ticks infesting bats in Brazil, with observations on the first nymphal stage of *Ornithodoros hasei*. *Exp Appl Acarol.* 2018;76(4):537-549.
12. Dantas-Torres, Onofrio & Barros Battesti. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Systematic & Applied Acarology.* 2009;14(1), 30–46.
13. Labruna MB; Venzal JM. *Carios fonsecai* sp. Nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. *Acta Parasitologica.* 2009;54:355-363.

14. Nava S, Venzal JM, Terassini FA, Mangold AJ, Camargo LM, Labruna MB. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. *J Parasitol.* 2010;96(6):1089-1101.
15. Dantas-Torres F, Venzal JM, Bernardi LF, Ferreira RL, Onofrio VC, Marcili A, et al. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. *J Parasitol.* 2012;98(1):36-45.
16. Martins TF, Venzal JM, Terassini FA, Costa FB, Marcili A, Camargo LM, et al. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 2014;62(1):121-128.
17. Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(3):252-76.
18. Barros-Battesti DM, Landulfo GA, Luz HR, Marcili A, Onofrio VC, Famadas KM. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. *Parasit Vectors.* 2015;13;8:268.
19. Krawczak FS, Martins TF, Oliveira CS, Binder LC, Costa FB, Nunes PH, et al. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. *J Med Entomol.* 2015;52(1):28-37.
20. Wolf RW, Aragona M, Muñoz-Leal S, Pinto LB, Melo AL, Braga IA, et al. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016;7(3):449-456.
21. Labruna MB, Nava S, Marcili A, Barbieri AR, Nunes PH, Horta MC, et al. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. *Parasit Vectors.* 2016;9(1):511.
22. Muñoz-Leal S, Toledo LF, Venzal JM, Marcili A, Martins TF, Acosta ICL, et al. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: *Ornithodoros*) associated with stream-breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: *Cycloramphus*) in Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8(5):682-692.
23. Michel T, Souza U, Dall'Agnol B, Webster A, Peters F, Christoff A, et al. *Ixodes* spp. (Acari: Ixodidae) ticks in Rio Grande do sul state, Brazil. *Syst. Appl. Acarol.* 2017;22(12):2057-2067.

24. Reck J, Souza U, Souza G, Kieling E, Dall'Agnol B, Webster A, et al. Records of ticks on humans in Rio Grande do Sul state, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9(5):1296-1301.
25. Guglielmone AA, Estrada-Peña A, Mangold AJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Martins JR, et al. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. *Vet Parasitol.* 2003;113(3-4):273-288.
26. Pinter A, Dias RA, Gennari SM, Labruna MB. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 2004;41(3):324-332.
27. Evans DE, Martins JR, Guglielmone AA. A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2000;95(4):453-470.
28. Martins JR, Salomão EL, Doyle RL, Teixeira MC, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. First record of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) parasitizing *Alouatta guariba* (Humboldt) (Primata: Atelidae) in southern Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2006;15(4):203-205.
29. Martins JR, Reck J Jr, Doyle RL, da Cruz NL, Vieira AW, Souza UA. *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) parasitizing margay (*Leopardus wiedii*) in Rio Grande do Sul. *Rev Bras Parasitol Vet.* 2010;19(3):189-191.
30. Sobreira Rodrigues D, Avila de Carvalho H, Almeida Fernandes A, Freitas CM, Cerqueira Leite R, de Oliveira PR. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2002;97(6):853-856.
31. Labruna MB, Ogrzewalska M, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Moraes-Filho J, et al. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(5):829-834.
32. Ogrzewalska M, Saraiva DG, Moraes-Filho J, Martins TF, Costa FB, Pinter A, et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology.* 2012;139(10):1283-1300.
33. Saraiva DG, Soares HS, Soares JF, Labruna MB. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(9):1504-1510.
34. Medeiros AP, Souza AP, Moura AB, Lavina MS, Bellato V, Sartor AA, et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2011;106(8):926-930.
35. Barbieri AR, Filho JM, Nieri-Bastos FA, Souza JC Jr, Szabó MP, Labruna MB. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(6):848-853.

36. Soares JF, Costa FB, Giroto-Soares A, Da Silva AS, França RT, Taniwaki SA, et al. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangeliiosis. Ticks Tick Borne Dis. 2018;9(5):1221-1234.
37. di Primio. Nosologia e insetos transmissores de doenças no Rio Grande do Sul. Anais da Faculdade de Medicina de Porto Alegre. 1970; v30: 13-25.
38. Reck J, Marks FS, Guimarães JA, Termignoni C, Martins JR. Epidemiology of *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) in the southern Brazilian highlands and the description of human and animal retrospective cases of tick parasitism. Ticks Tick Borne Dis. 2013;4(1-2):101-9.
39. Pinto C, Di Primio R. Contribuição para a biologia dos Ixodidae do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). Rev Méd-Cirúg Braz. 1931;39:236-239.
40. Aragão HB 1936. Ixódidas brasileiros e de alguns países limítrofes. Mem Inst Oswaldo Cruz 31: 759-844.
41. Davis GE. Observations on the biology of the argasid tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923; with the recovery of a spirochete, *Borrelia brasiliensis*, n. sp. J Parasitol. 1952;38(5):473-476.
42. Di Primio R. Contribuição a biologia do *Ornithodoros* (sic) *brasiliensis* Aragão, 1923. RevMed Rio Grande do Sul. 1952;8:178-183.
43. Martins JR, Doyle RL, Barros-Battesti DM, Onofrio VC, Guglielmone AA. Occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil. Neotrop Entomol. 2011;40(1):143-144.
44. Reck J, Soares JF, Termignoni C, Labruna MB, Martins JR. Tick toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis*. Vet Clin Pathol. 2011;40(3):356-360.
45. Reck J, Marks FS, Termignoni C, Guimarães JA, Martins JR. *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) salivary gland homogenates inhibit *in vivo* wound healing and *in vitro* endothelial cell proliferation. Parasitol Res. 2013;112(4):1749-1753.
46. Reck J, Bandarra P, Pavarini S, Termignoni C, Driemeier D, Martins JR, et al. Experimentally induced tick toxicosis in rats bitten by *Ornithodoros brasiliensis* (Chelicerata: Argasidae): a clinico-pathological characterization. Toxicon. 2014;88:99-106.
47. Ramirez DG, Landulfo GA, Onofrio VC, Simons SM, Reck J, Martins JR, et al. Laboratory life cycle of *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): An endemic tick from southern Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2016;7(5):730-733.
48. Hooper LV, Gordon JI. Commensal Host-Bacterial Relationships in the Gut. Science. 2001;292(5519):1115-1118.

49. Narasimhan S, Fikrig E. Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol.* 2015;31(7):315-323.
50. Weiss B, Aksoy S. Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends Parasitol.* 2011;27(11):514–522.
51. Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci.* 2014;3:6–13.
52. Zug R, Hammerstein P. Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2015;90(1):89–111.
53. Mixson TR, Campbell SR, Gill JS, Ginsberg HS, Reichard M V, Schulze TL, et al. Prevalence of *Ehrlichia*, *Borrelia*, and Rickettsial Agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) Collected from Nine States. *J Med Entomol.* 2006;43(6):1261–1268.
54. Corrigan J. Investigation of Spotted Fever Group *Rickettsia* in dogs and ticks in the northern California. Humboldt State University; 2012.
55. Noda H, Munderloh UG, Kurtti TJ. Endosymbionts of Ticks and Their Relationship to *Wolbachia* spp. and Tick-Borne Pathogens of Humans and Animals. *Appl Environ Microbiol.* 1997;63(10):3926–3932.
56. Epis S, Sasser D, Beninati T, Lo N, Beati L, Piesman J, et al. *Midichloria mitochondrii* is widespread in hard ticks (Ixodidae) and resides in the mitochondria of phylogenetically diverse species. *Parasitology.* 2008;135:485–494.
57. Benson MJ, Gawronski JD, Eveleigh DE, Benson DR. Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(1):616-620.
58. Van Overbeek L, Gassner F, Van Der Plas CL, Kastelein P, Nunes U, Takken W. Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 66(1):72–84.
59. Sparagano OAE, Allsopp MTE., Mank RA, Rijpkema SGT, Figueroa JV, Jongejan F. Molecular detection of pathogen DNA in ticks (Acari: Ixodidae): A review. *Exp Appl Acarol.* 1999;23(12):929–960.
60. Schabereiter-gurtner C, Lubitz W, Rölleke S. Application of broad-range 16S rRNA PCR amplification and DGGE fingerprinting for detection of tick-infecting bacteria. *J Microbiol Methods.* 2003;52(2):251–260.

61. Halos L, Mavris M, Vourc'h G, Maillard R, Barnouin J, Boulouis H, et al. Broad-range PCR-TTGE for the first-line detection of bacterial pathogen DNA in ticks. *Vet Res.* 2006;37(2):245–253.
62. Bacci G, Teresa M, Alessia C, Marco B, Viti C, Nannipieri P, et al. Exploring the dynamics of bacterial community composition in soil: the pan-bacteriome approach. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2015;107(3):785–797.
63. Ji Y, Ashton L, Pedley SM, Edwards DP, Tang Y, et al. Reliable, verifiable and efficient monitoring of biodiversity via metabarcoding. *Ecology Letters.* 2013;16(10):1245–1257.
64. Dethlefsen L, Huse S, Sogin ML, Relman DA. The Pervasive Effects of an Antibiotic on the Human Gut Microbiota, as Revealed by Deep 16S rRNA Sequencing. *PLoS Biol.* 2008;6(11):2383–2400.
65. Jensen K, de Miranda Santos IK, Glass EJ. Using genomic approaches to unravel livestock (host)–tick–pathogen interactions. *Trends Parasitol.* 2007;23(9):439–444.
66. Greay TL, Gofton AW, Paparini A, Ryan UM, Oskam CL, Irwin PJ. Recent insights into the tick microbiome gained through next-generation sequencing. *Parasit Vectors.* 2018;11(1):12.
67. Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7:236.
68. Chauvin A, Moreau E, Bonnet S, Plantard O, Malandrin L. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet Res.* 2009;40(2):37.
69. Xia H, Beck AS, Gargili A, Forrester N, Barrett AD, Bente DA. Transstadial Transmission and Long-term Association of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks Shapes Genome Plasticity. *Sci Rep.* 2016;6:35819.
70. Pradeu T. A Mixed Self: The Role of Symbiosis in Development. *Biological Theory.* 2011; 6(1):80-88.
71. Gil R, Latorre A. Unity Makes Strength: A Review on Mutualistic Symbiosis in Representative Insect Clades. *Life (Basel).* 2019;9(1). pii: E21.
72. Childs JE, Paddock CD. Passive Surveillance as an Instrument to Identify Risk Factors for Fatal Rocky Mountain Spotted Fever: Is There More to Learn? *Am J Trop Med Hyg.* 2002;66(5):450–577.
73. Ahantarig A, Trinachartvanit W, Baimai V, Grubhoffer L. Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens). *Folia Microbiol.* 2013;58:419–428.

74. Burgdorfer W, Owen CR. Experimental Studies on Argasid Ticks as Possible Vectors of Tularemia. *J Infect Dis.* 1956;98:67–74.
75. Scoles GA. Phylogenetic Analysis of the *Francisella*-like Endosymbionts of *Dermacentor* Ticks. *J Med Entomol.* 2004;41(3):277–286.
76. Zhong J, Jasinskas A, Barbour AG. Antibiotic Treatment of the Tick Vector *Amblyomma americanum* Reduced Reproductive Fitness. *PLoS One.* 2007;2(5):e405.
77. Klyachko O, Stein BD, Grindle N, Clay K, Fuqua C. Localization and Visualization of a *Coxiella*-Type Symbiont within the Lone Star Tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73(20):6584–6594.
78. Beninati T, Lo N, Sacchi L, Genchi C, Noda H, Bandi C. A Novel Alpha-Proteobacterium Resides in the Mitochondria of Ovarian Cells of the Tick *Ixodes ricinus*. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(5):2596–2602.
79. Sasser D, Beninati T, Bandi C, Bouman EAP, Sacchi L, Fabbi M, et al. “*Candidatus* *Midichloria mitochondrii*”, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2006;56:2535–2540.
80. Sacchi L, Bigliardi E, Corona S, Beninati T, Lo N, Franceschi A. A symbiont of the tick *Ixodes ricinus* invades and consumes mitochondria in a mode similar to that of the parasitic bacterium *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Tissue Cell.* 2004;36:43–53.
81. Lo N, Beninati T, Sasser D, Bouman EAP, Santagati S, Gern L, et al. Widespread distribution and high prevalence of an alpha-proteobacterial symbiont in the tick *Ixodes ricinus*. *Environ Microbiol.* 2006;8(7):1280–1287.
82. Mariconti M, Epis S, Gaibani P, Valle CD, Sasser D, Tomao P, et al. Humans parasitized by the hard tick *Ixodes ricinus* are seropositive to *Midichloria mitochondrii*: is *Midichloria* a novel pathogen, or just a marker of tick bite? *Pathog Glob Health.* 2012;106(7):391–396.
83. Bazzocchi C, Mariconti M, Sasser D, Rinaldi L, Martin E, Cringoli G, et al. Molecular and serological evidence for the circulation of the tick symbiont *Midichloria* (Rickettsiales: Midichloriaceae) in different mammalian species. *Parasites and Vectors.* 2013;6(350):1–7.
84. Dergousoff SJ, Chilton NB. Detection of a new *Arsenophonus*-type bacterium in Canadian populations of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *Exp Appl Acarol.* 2010;52(1):85–91.
85. Subramanian G, Sekeyova Z, Raoult D, Mediannikov O. Multiple tick-associated bacteria in *Ixodes ricinus* from Slovakia. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3(5-6):405–409.

86. Clay K, Klyachko O, Grindle N, Civitello D, Oleske D, Fuqua C. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Mol Ecol*. 2008;17(19):4371–4381.
87. Nováková E, Hypsa V, Moran NA. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiol*. 2009;9:143.
88. Taylor GP, Coghlin PC, Floate KD, Perlman SJ. The host range of the male-killing symbiont *Arsenophonus nasoniae* in filth fly parasitoids. *J Invertebr Pathol*. 2011;106(3):371–379.
89. Hartelt K, Oehme R, Frank H, Brockmann SO, Hassler D, Kimmig P. Pathogens and symbionts in ticks: prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* (*Ehrlichia* sp.), *Wolbachia* sp., *Rickettsia* sp., and *Babesia* sp. in Southern Germany. *Int J Med Microbiol*. 2004;293 Suppl :86–92.
90. Zhang X, Norris DE, Rasgon JL. Distribution and molecular characterization of *Wolbachia* endosymbionts and filarial nematodes in Maryland populations of the lone star tick (*Amblyomma americanum*). *FEMS Microbiol Ecol*. 2011;77(1):50–56.
91. Weller SJ, Baldridge GD, Munderloh UG, Noda H, Simser J, Kurtti TJ. Phylogenetic placement of rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and *Ixodes scapularis*. *J Clin Microbiol*. 1998;36(5):1305–1317.
92. Azad AF, Beard CB. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. *Emerg Infect Dis*. 1998;4(2):179–186.
93. de la Fuente J, Blouin EF, Kocan KM. Infection Exclusion of the Rickettsial Pathogen *Anaplasma marginale* in the Tick Vector *Dermacentor variabilis*. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2003;10(1):182–184.
94. Budachetri K, Browning RE, Adamson SW, Dowd SE, Chao C-C, Ching W-M, et al. An Insight Into the Microbiome of the *Amblyomma maculatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 2014;51(1):119–129.
95. Narasimhan S, Rajeevan N, Liu L, Zhao YO, Heisig J, Pan J, et al. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe*. 2014;15(1):58–71.
96. Jasinskas A, Zhong J, Barbour AG. Highly prevalent *Coxiella* sp. bacterium in the tick vector *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol*. 2007;73(1):334–336.
97. Ponnusamy L, Gonzalez A, Van Treuren W, Weiss S, Parobek CM, Juliano JJ, et al. Diversity of rickettsiales in the microbiome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80(1):354–359.

98. Lalar I, Friedmann Y, Gottlieb Y. Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environ Microbiol.* 2014;16(12):3657–68.
99. Moreno CX, Moy F, Daniels TJ, Godfrey HP, Cabello FC. Molecular analysis of microbial communities identified in different developmental stages of *Ixodes scapularis* ticks from Westchester and Dutchess Counties, New York. *Environ Microbiol.* 2006;8(5):761–72.
100. Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE, Zhao F, Qi J, Tomsho LP, et al. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One.* 2011;6(10):e25604.
101. Nakao R, Abe T, Nijhof AM, Yamamoto S, Jongejan F, Ikemura T, et al. A novel approach, based on BLSOMs (Batch Learning Self-Organizing Maps), to the microbiome analysis of ticks. *ISME J.* 2013;7(5):1003–1015.
102. Vayssier-Taussat M, Moutailler S, Michelet L, Devillers E, Bonnet S, Cheval J, et al. Next generation sequencing uncovers unexpected bacterial pathogens in ticks in western Europe. *PLoS One.* 2013;8(11):e81439.
103. Qiu Y, Nakao R, Ohnuma A, Kawamori F, Sugimoto C. Microbial population analysis of the salivary glands of ticks; a possible strategy for the surveillance of bacterial pathogens. *PLoS One.* 2014;9(8):e103961.
104. Andreotti R, Pérez de León AA, Dowd SE, Guerrero FD, Bendele KG, Scoles GA. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol.* 2011;11(1):6.
105. Zhang X, Yang Z, Lu B, Ma X, Zhang C, Xu H. The composition and transmission of microbiome in hard tick, *Ixodes persulcatus*, during blood meal. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(6):864–870.
106. Wang J, Weiss BL, Aksoy S. Tsetse fly microbiota: form and function. *Front Cell Infect Microbiol.* 2013;3:69.
107. Guizzo MG, Parizi LF, Nunes RD, Schama R, Albano RM, Tirloni L, et al. A *Coxiella* mutualist symbiont is essential to the development of *Rhipicephalus microplus*. *Sci Rep.* 2017;7(1):17554.
108. Machado-Ferreira E, Dietrich G, Hojgaard A, Levin M, Piesman J, Zeidner NS, et al. *Coxiella* symbionts in the Cayenne tick *Amblyomma cajennense*. *Microb Ecol.* 2011;62(1):134–142.
109. Lalar I, Harrus S, Mumcuoglu KY, Gottlieb Y. Composition and seasonal variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* bacterial communities. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78(12):4110–4116.

110. Duron O, Sidi-Boumedine K, Rousset E, Moutailler S, Jourdain E. The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated? *Trends Parasitol.* 2015;31(11):536-552.
111. Duron O, Binetruy F, Noël V, Cremaschi J, McCoy KD, Arnathau C, et al. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol Ecol.* 2017;26(11):2905-2921.
112. Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Martins JR, et al. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3(4):203-206.
113. Duron O, Jourdain E, McCoy KD. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014;5(5):557-563.
114. Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLoS Pathog.* 2015;11(5):e1004892.
115. Gottlieb Y, Lázár I, Klasson L. Distinctive Genome Reduction Rates Revealed by Genomic Analyses of Two *Coxiella*-Like Endosymbionts in Ticks. *Genome Biol Evol.* 2015;7(6):1779-1796.
116. Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star tick. *Genome Biol Evol.* 2015;7(3):831-838.
117. Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet.* 2008;42:165-190.
118. Wernegreen JJ. Endosymbiosis. *Curr Biol.* 2012;22(14):R555-561.
119. Angelakis E, Mediannikov O, Jos SL, Berenger JM, Parola P, Raoult D. 'Candidatus *Coxiella massiliensis*' Infection. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(2):285-288.
120. Shivaprasad HL, Cadenas MB, Diab SS, Nordhausen R, Bradway D, Crespo R, et al. *Coxiella*-like infection in psittacines and a toucan. *Avian Dis.* 2008;52(3):426-432.
121. Woc-Colburn AM, Garner MM, Bradway D, West G, D'Agostino J, Trupkiewicz J, et al. Fatal coxiellosis in Swainson's Blue Mountain Rainbow Lorikeets (*Trichoglossus haematodus moluccanus*). *Vet Pathol.* 2008;45(2):247-254.
122. Vapniarsky N, Barr BC, Murphy B. Systemic *Coxiella*-like infection with myocarditis and hepatitis in an eclectus parrot (*Eclectus roratus*). *Vet Pathol.* 2012;49(4):717-722.

123. Seo MG, Lee SH, VanBik D, Ouh IO, Yun SH, Choi E, et al. Detection and Genotyping of *Coxiella burnetii* and *Coxiella*-Like Bacteria in Horses in South Korea. PLoS One. 2016;11(5):e0156710.
124. Liu LM, Liu JN, Liu Z, Yu ZJ, Xu SQ, Yang XH, et al. Microbial communities and symbionts in the hard tick *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae) from north China. Parasit Vectors. 2013;6(1):310.
125. Duron O, Morel O, Noël V, Buysse M, Binetruy F, Lancelot R, et al. Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways. Curr Biol. 2018;28(12):1896-1902.e5.
126. Sjödin A, Svensson K, Ohrman C, Ahlinder J, Lindgren P, Duodu S, et al. Genome characterisation of the genus *Francisella* reveals insight into similar evolutionary paths in pathogens of mammals and fish. BMC Genomics. 2012;13:268.
127. Gerhart JG, Moses AS, Raghavan R. A *Francisella*-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. Sci Rep. 2016;6:33670.
128. Michelet L, Bonnet S, Madani N, Moutailler S. Discriminating *Francisella tularensis* and *Francisella*-like endosymbionts in *Dermacentor reticulatus* ticks: evaluation of current molecular techniques. Vet Microbiol. 2013;163(3-4):399-403.
129. Gillespie JJ, Beier MS, Rahman MS, Ammerman NC, Shallom JM, Purkayastha A, et al. Plasmids and rickettsial evolution: insight from *Rickettsia felis*. PLoS One. 2007;2(3):e266.
130. Blanton LS. The Rickettsioses: A Practical Update. Infect Dis Clin North Am. 2019;33(1):213-229.
131. Szabó MP, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. Front Cell Infect Microbiol. 2013;3:27.
132. Nieri-Bastos FA, Marcili A, De Sousa R, Paddock CD, Labruna MB. Phylogenetic Evidence for the Existence of Multiple Strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. Appl Environ Microbiol. 2018;84(8). pii: e02872-17.
133. Krawczak FS, Binder LC, Oliveira CS, Costa FB, Moraes-Filho J, Martins TF, et al. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. Exp Appl Acarol. 2016;70(2):219-229.
134. Vizzoni VF, Silva AB, Cardoso KM, Dos Santos FB, Stenzel B, Amorim M, et al. 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. 2016;162:142-145.

135. 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.* 2016;22(11):2014-2016.
136. Weck B, Dall'Agnol B, Souza U, Webster A, Stenzel B, Klafke G, et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. *Acta Trop.* 2017;171:182-185.
137. Souza U, Dall'Agnol B, Michel T, Webster A, Weck B, Doyle R, et al. Molecular survey of *Rickettsia* spp. in the Neotropical deer tick *Haemaphysalis juxtakochi* from Brazilian Pampa. *Parasitol Res.* 2018;117(10):3293-3298.
138. Steere AC, Strle F, Wormser GP, Hu LT, Branda JA, Hovius JW, et al. Lyme borreliosis. *Nat Rev Dis Primers.* 2016;2:16090.
139. Barbieri AM, Venzal JM, Marcili A, Almeida AP, González EM, Labruna MB. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting ticks of the *Ixodes ricinus* complex in Uruguay: first report for the Southern Hemisphere. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2013;13(3):147-153.
140. Nava S, Barbieri AM, Maya L, Colina R, Mangold AJ, Labruna MB, et al. *Borrelia* infection in *Ixodes pararicinus* ticks (Acari: Ixodidae) from northwestern Argentina. *Acta Trop.* 2014;139:1-4.
141. 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.* 2016;162:218-221.
142. Saracho Bottero MN, Sebastian PS, Carvalho LA, Claps LG, Mastropaolo M, Mangold AJ, et al. Presence of *Borrelia* in different populations of *Ixodes pararicinus* from northwestern Argentina. *Ticks Tick Borne Dis.* 2017;8(4):488-493.
143. Flores FS, Muñoz-Leal S, Diaz A, Labruna MB. Wild birds as host of *Borrelia burgdorferi* sensu lato in northwestern Argentina. *Ticks Tick Borne Dis.* 2018;9(6):1586-1589.
144. Saracho-Bottero MN, Tarragona EL, Sebastian PS, Venzal JM, Mangold AJ, Guglielmone AA, et al. Ticks infesting cattle and humans in the Yungas Biogeographic Province of Argentina, with notes on the presence of tick-borne bacteria. *Exp Appl Acarol.* 2018;74(1):107-116.
145. Ivanova LB, Tomova A, González-Acuña D, Murúa R, Moreno CX, Hernández C, et al. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ Microbiol.* 2014;16(4):1069-1080.

146. Verdugo C, Jiménez O, Hernández C, Álvarez P, Espinoza A, González-Acuña D. Infection with *Borrelia chilensis* in *Ixodes stilesi* ticks collected from Pudu puda deer. Ticks Tick Borne Dis. 2017;8(5):733-740.
147. Muñoz-Leal S, Lopes MG, Marcili A, Martins TF, González-Acuña D, Labruna MB. Anaplasmatidae, *Borrelia* and *Hepatozoon* agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile. Acta Trop. 2019;192:91-103.
148. Burkot TR, Mullen GR, Anderson R, Schneider BS, Happ CM, Zeidner NS. *Borrelia lonestari* DNA in adult *Amblyomma americanum* ticks, Alabama. Emerg Infect Dis. 2001;7(3):471-473.
149. Salkeld DJ, Nieto NC, Bonilla DL, Yoshimizu MH, Padgett KA. *Borrelia miyamotoi* Infections in Small Mammals, California, USA. Emerg Infect Dis. 2018;24(12):2356-2359.
150. Talagrand-Reboul E, Boyer PH, Bergström S, Vial L, Boulanger N. Relapsing Fevers: Neglected Tick-Borne Diseases. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:98.
151. Olsufjev NG, Meshcheryakova IS. Intraspecific taxonomy of tularemia agent *Francisella tularensis* McCoy et Chapin. J Hyg Epidemiol Microbiol Immunol. 1982;26(3):291-299.
152. Eliasson H, Broman T, Forsman M, Bäck E. Tularemia: current epidemiology and disease management. Infect Dis Clin North Am. 2006;20(2):289-311.
153. Pilo P. Phylogenetic Lineages of *Francisella tularensis* in Animals. Front Cell Infect Microbiol. 2018;8:258.
154. McCoy GW. A plague-like disease of rodents. Public Health Bull. 1911;43: 53–71.
155. McCoy GW, Chapin CW. Further observations on a plague-like disease of rodents with a preliminary note on the causative agent, *Bacterium tularensis*. J. Infect. Dis. 1912;10:61–72.
156. Wherry WB, Lamb BH. Infection of man with *Bacterium tularensis*. J. Infect. Dis. 1914;15:331–340.
157. Mörner T. The ecology of tularemia. Rev Sci Tech. 1992;11(4):1123-1130.
158. Petersen JM, Mead PS, Schriefer ME. *Francisella tularensis*: an arthropod-borne pathogen. Vet Res. 2009;40(2):7.
159. Eldin C, Mélenotte C, Mediannikov O, Ghigo E, Million M, Edouard S, et al. From Q Fever to *Coxiella burnetii* Infection: a Paradigm Change. Clin Microbiol Rev. 2017;30(1):115-190.

160. Anderson A, Bijlmer H, Fournier PE, Graves S, Hartzell J, Kersh GJ, et al. Diagnosis and management of Q fever--United States, 2013: recommendations from CDC and the Q Fever Working Group. *MMWR Recomm Rep*. 2013;62(RR-03):1-30.
161. Guatteo R, Beaudeau F, Berri M, Rodolakis A, Joly A, Seegers H. Shedding routes of *Coxiella burnetii* in dairy cows: implications for detection and control. *Vet Res*. 2006;37(6):827-833.
162. Rodolakis A, Berri M, Héchard C, Caudron C, Souriau A, Bodier CC, et al. Comparison of *Coxiella burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine, and ovine herds. *J Dairy Sci*. 2007;90(12):5352-5360.
163. Angelakis E, Raoult D. Q Fever. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):297-309.
164. Maurin M, Raoult D. Q fever. *Clin Microbiol Rev*. 1999;12(4):518-553.
165. Parker NR, Barralet JH, Bell AM. Q fever. *Lancet*. 2006;367(9511):679-688.
166. Tissot-Dupont H, Raoult D. Q fever. *Infect Dis Clin North Am*. 2008;22(3):505-514.
167. Stevenson S, Gowardman J, Tozer S, Woods M. Life-threatening Q fever infection following exposure to kangaroos and wallabies. *BMJ Case Rep*. 2015;2015. pii: bcr2015210808.
168. Davoust B, Marié JL, Pommier de Santi V, Berenger JM, Edouard S, Raoult D. Three-toed sloth as putative reservoir of *Coxiella burnetii*, Cayenne, French Guiana. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(10):1760-1761.
169. Klafke G, Webster A, Dall Agnol B, Pradel E, Silva J, de La Canal LH, et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017;8(1):73-80.
170. Varela-Stokes AS, Park SH, Stokes JV, Gavron NA, Lee SI, Moraru GM, et al. Tick microbial communities within enriched extracts of *Amblyomma maculatum*. *Ticks Tick Borne Dis*. 2018;9(4):798-805.
171. Gerhart JG, Auguste Dutcher H, Brenner AE, Moses AS, Grubhoffer L, Raghavan R. Multiple Acquisitions of Pathogen-Derived *Francisella* Endosymbionts in Soft Ticks. *Genome Biol Evol*. 2018;10(2):607-615.
172. Tsementzi D, Castro Gordillo J, Mahagna M, Gottlieb Y, Konstantinidis KT. Comparison of closely related, uncultivated *Coxiella* tick endosymbiont population genomes reveals clues about the mechanisms of symbiosis. *Environ Microbiol*. 2018;20(5):1751-1764.

APÊNDICES

Apêndice 1

Artigo Científico

“*Candidatus Rickettsia asemboensis*” in *Rhipicephalus sanguineus* ticks, Brazil

Artigo científico publicado no periódico científico *Acta Tropica* publicado pela Elsevier.

Fator de impacto: 2.509



Short communication

“Candidatus Rickettsia asemboensis” in *Rhipicephalus sanguineus* ticks, Brazil



Bruno Dall'Agnol^{a,b}, Ugo Souza^a, Anelise Webster^a, Bárbara Weck^a, Bárbara Stenzel^c,
Marcelo Labruna^d, Guilherme Klafke^a, João Ricardo Martins^a,
Carlos Alexandre Sanchez Ferreira^b, José Reck^{a,*}

^a Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária (FEPAGRO), Eldorado do Sul, RS, Brazil

^b Faculdade de Biociências (FABIO), Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, RS, Brazil

^c Centro Estadual de Vigilância em Saúde (CEVS), Porto Alegre, RS, Brazil

^d Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 24 October 2016

Received in revised form 9 December 2016

Accepted 12 December 2016

Available online 13 December 2016

Keywords:

Rickettsia felis-like

Spotted fever

Rio Grande do Sul

Flea-borne

ABSTRACT

“*Candidatus Rickettsia asemboensis*” is an obligate intracellular bacterium of the Rickettsiales order, genetically related to species belonging to the *Rickettsia felis* group, agents of flea-borne spotted fever. Here we report for the first time the detection of “Ca. *R. asemboensis*”, a flea-associated organism, in *Rhipicephalus sanguineus* ticks. It is the first occurrence of this emerging bacterium in Brazil, which increases the geographical distribution of this *R. felis*-like agent.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rickettsia felis and related *Rickettsia* species are worldwide distributed emerging pathogens. Recently, there is an increasing number of reports around the world implicating these agents as a human pathogens. The syndromes associated to *R. felis* and its related species are also referred as flea-borne spotted fever (Angelakis et al., 2016).

“*Candidatus Rickettsia asemboensis*” is a recently described bacterium of the Rickettsiales order. It is genetically closely related to the human pathogen *Rickettsia felis*, and it has been found in endemic areas of flea-borne spotted fever (Jiang et al., 2013). Until now, it was only described infecting fleas associated to domestic animals, rodents and from human households, such as *Xenopsylla cheopis*, *Synosternus cleopatrae*, *Pulex irritans*, *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis*. In addition to the site of first description (Asembo, Kenya), this microorganism has been additionally reported in South Africa, Israel, Ecuador, Colombia and United

States (Jiang et al., 2013; Oteo et al., 2014; Rzotkiewicz et al., 2015; Faccini-Martínez et al., 2016; Billeter et al., 2016; Kolo et al., 2016).

According to the concept used for novel/unclassified *Rickettsia* spp., the potential of unknown or novel bacterial species as disease agents is never ruled out when other species from the same genus are pathogenic, particularly for vector-borne organisms (Labruna et al., 2007). In recent decades, diseases associated with rickettsial bacteria are considered as emerging and re-emerging diseases worldwide, particularly for those species belonging to the Spotted Fever Group (which includes *R. rickettsi* and *R. parkeri*) and Transitional Group *Rickettsia* (which includes *R. felis* and “Ca. *R. asemboensis*”) (Parola, 2011; Sahni et al., 2013). Here, we report the detection of “Ca. *R. asemboensis*” for the first time in Brazil. Moreover, it is the first evidence of “Ca. *R. asemboensis*” in ticks.

2. Materials and methods

From February to March 2015, we performed tick collections on stray dogs from Tapes municipality (30°40'25"S 51°23'56"W), Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. This area was chosen because cases of fever of unknown origin were recently reported, including one suspected human spotted fever fatal case.

Ticks identification was performed according Barros-Battesti et al. (2006). Total genomic DNA was extracted from samples

* Corresponding author at: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde, 6000, Eldorado do Sul, 92990-000, RS, Brazil.

E-mail address: jose.reck@gmail.com (J. Reck).

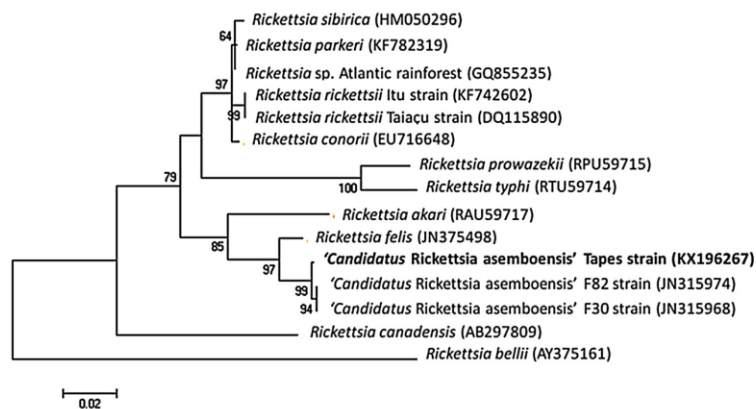


Fig. 1. Phylogenetic analysis of the *gltA* gene was performed using MEGA 7 software, using the Maximum Likelihood algorithm and Tamura-3-parameter with Gamma distribution as the DNA substitution model and 500 bootstraps for the phylogeny test.

according to the protocol published by Aljanabi and Martinez (1997). Samples were screened for *Rickettsia* spp. using a PCR assay for a 401-bp fragment of the citrate synthase (*gltA*) gene (Labruna et al., 2004). PCR amplification targeting was then performed for the Outer Membrane Protein A (*ompA*) gene, directed for Spotted Fever Group (SFG) *Rickettsia* (Oteo et al., 2004). To allow for the identification of the *Rickettsia* found, we performed three other PCR reactions, one directed to another *gltA* fragment (834 bp) (Labruna et al., 2004) and two other for the *htrA* gene (434 and 549 bp) (Labruna et al., 2004).

Sequencing of PCR products for the *gltA* and *htrA* genes was performed. Contig sequences were assembled with Geneious R9 software (Biomatters Ltd., Auckland, New Zealand), and the consensus sequences were submitted to a BLAST algorithm. The phylogenetic tree of the *gltA* gene was building using MEGA 7 software (Kumar et al., 2016). This study was approved by Ethics Committee of IPVDF (approval no. 13/2013).

3. Results and discussion

In 2015, some cases of humans showing long-term fever of unknown origin were reported in Tapes. One case fatality was registered. The fatal victim reported a “bug” bite some days before the onset of clinical findings. Local health authorities considered that spotted fever was the presumptive diagnosis associated to the fatal case. Then, we investigated the presence of *Rickettsia* spp. in ticks from dogs of this locality. A total of 63 *Rhipicephalus sanguineus* ticks (two larvae, 30 nymphs, 15 females and 16 males) were collected from 14 stray dogs. No fleas or other ectoparasites were found in sampled dogs.

One *R. sanguineus* male tick was positive in the screening PCR for *Rickettsia* spp. for *gltA* gene. The sample was negative in the PCR for the *ompA* gene, indicating that it was not SFG *Rickettsia*. The sample was positive in all three PCR reactions (*gltA* fragment 834 bp and *htrA* fragment 434 and 549 bp). BLAST analysis showed 99% and 100% identity with “Ca. *R. asemboensis*” isolate F30 (GenBank: JN315968 and JN315969) for the *gltA* and *htrA* genes, respectively. The sequences of *gltA* and *htrA* genes from samples of this work were deposited in Genbank under accession numbers KX196267 and KX196268, respectively. The phylogenetic tree of the *gltA* gene (Fig. 1) showed that the DNA sequence of “Ca. *R. asemboensis*” from Tapes, Brazil, was close to that of “Ca. *R. asemboensis*” from Kenya, and both were placed together with *R. felis* and *R. akari* in a clade of the Transitional Group *Rickettsia*. The sequence of “Ca. *R. asemboensis*” is also highly similar (99%) to that of *Rickettsia* sp. strain

RF2125, a member of the *R. felis*-like genotype group that circulates in fleas from Uruguay (Venzal et al., 2006).

This is the first report of “Ca. *R. asemboensis*” infection in ticks. Also, it is the first detection of “Ca. *R. asemboensis*” in Brazil. This rickettsia is genetically similar to *Rickettsia felis*, a flea-associated *Rickettsia* considered pathogenic for humans (Raoult et al., 2001). Regardless of the vast literature on Spotted Fever Group *Rickettsia* spp. from Brazil (for a comprehensive review see Szabó et al., 2013), data on *R. felis*-related species are scarce. The detection of *Rickettsia* spp. in *R. sanguineus* draws attention since it is the most widespread tick in the world (Dantas-Torres, 2010; Szabó et al., 2010). In this sense, further studies are needed to address the potential involvement of ticks in “Ca. *R. asemboensis*” infection and transmission.

It is possible that “Ca. *R. asemboensis*” could be present in other South American countries, as well as in other Brazilian regions. These data increase the geographical distribution of this *R. felis*-like agent. Further studies must address the association of “Ca. *R. asemboensis*” with Brazilian cases of rickettsiosis and infection prevalence.

Acknowledgments

We thank to staff of Secretaria Municipal da Saúde de Tapes, Rio Grande do Sul, Brazil for help in field work. We also thank to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

References

- Aljanabi, S.M., Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25 (22), 4692–4693.
- Angelakis, E., Mediannikov, O., Parola, P., Raoult, D., 2016. *Rickettsia felis*: the complex journey of an emergent human pathogen. *Trends Parasitol.* 32 (7), 554–564.
- Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H., 2006. Carrapatos De Importância Médico-Veterinária Da Região Neotropical: Um Guia Ilustrado Para Identificação De Espécies. Vox/ICTD-3/Butantan, São Paulo.
- Billeter, S.A., Diniz, P.P., Jett, L.A., Wournell, A.L., Kjemtrup, A.M., Padgett, K.A., et al., 2016. Detection of *Rickettsia* species in fleas collected from cats in regions endemic and nonendemic for flea-borne Rickettsioses in California. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 16 (3), 151–156.
- Dantas-Torres, F., 2010. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites Vectors* 3, 26.
- Faccini-Martínez, Á.A., Ramírez-Hernández, A., Forero-Becerra, E., Cortés-Vecino, J.A., Escandón, P., Rodas, J.D., et al., 2016. Molecular evidence of different *Rickettsia* species in Villeta, Colombia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 16 (2), 85–87.
- Jiang, J., Maina, A.N., Knobel, D.L., Cleaveland, S., LaDiso, A., Wamburu, K., et al., 2013. Molecular detection of *Rickettsia felis* and *Candidatus Rickettsia*

- asemboensis in fleas from human habitats, Asembo, Kenya. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 13 (8), 550–558.
- Kolo, A.O., Sibeko-Matjila, K.P., Maina, A.N., Richards, A.L., Knobel, D.L., Matjila, P.T., 2016. Molecular detection of zoonotic Rickettsiae and *Anaplasma* spp. in domestic dogs and their ectoparasites in Bushbuckridge, South Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 16 (4), 245–252.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33 (7), 1870–1874.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Horta, M.C., Bouyer, D.H., McBride, J.W., Pinter, A., et al., 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J. Clin. Microbiol.* 42 (1), 90–98.
- Labruna, M.B., Pacheco, R.C., Richtzenhain, L.J., Szabó, M.P., 2007. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (3), 869–873.
- Oteo, J.A., Portillo, A., Blanco, J.R., Ibarra, V., Santibáñez, S., 2004. *Rickettsia africae* infection. Three cases confirmed by PCR. *Med. Clin. (Barc.)* 122 (20), 786–788.
- Oteo, J.A., Portillo, A., Portero, F., Zavala-Castro, J., Venzal, J.M., Labruna, M.B., 2014. 'Candidatus *Rickettsia asemboensis*' and *Wolbachia* spp., *Ctenocephalides felis* and *Pulex irritans* fleas removed from dogs in Ecuador. *Parasit. Vector* 7, 455.
- Parola, P., 2011. *Rickettsia felis*: from a rare disease in the USA to a common cause of fever in Sub-Saharan Africa. *Clin. Microbiol. Infect.* 17 (7), 996–1000.
- Raoult, D., La Scola, B., Enea, M., Fournier, P.E., Roux, V., Fenollar, F., et al., 2001. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg. Infect. Dis.* 7 (1), 73–81.
- Rzotkiewicz, S., Gutiérrez, R., Krasnov, B.R., Morick, D., Khokhlova, I.S., Nachum-Biala, Y., et al., 2015. Novel evidence suggests that a '*Rickettsia felis*-like' organism is an endosymbiont of the desert flea, *Xenopsylla ramesis*. *Mol. Ecol.* 24 (6), 1364–1373.
- Sahni, S.K., Narra, H.P., Sahni, A., Walker, D.H., 2013. Recent molecular insights into rickettsial pathogenesis and immunity. *Future Microbiol.* 8 (10), 1265–1288.
- Szabó, M.P., de Souza, L.G., Olegário, M.M., Ferreira, F.A., de Albuquerque Pajuaba Neto, A., 2010. Ticks (Acari: Ixodidae) on dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Transbound. Emerg. Dis.* 57 (1–2), 72–74.
- Szabó, M.P., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3, 27.
- Venzal, J.M., Pérez-Martínez, L., Félix, M.L., Portillo, A., Blanco, J.R., Oteo, J.A., 2006. Prevalence of *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from Uruguay. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 305–308.

Apêndice 2

Artigo Científico

***Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes longiscutatus* ticks from Brazilian Pampa**

Artigo científico publicado no periódico científico *Ticks and Tick-borne Diseases* publicado pela Elsevier.

Fator de impacto: 2.612



Contents lists available at ScienceDirect

Ticks and Tick-borne Diseases

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

Original article

***Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes longiscutatus* ticks from Brazilian Pampa**

Bruno Dall'Agnol^{a,b}, Thaís Michel^a, Bárbara Weck^a, Ugo Araújo Souza^a, Anelise Webster^a, Bruna Ferreira Leal^{a,b}, Guilherme Marcondes Klafke^a, João Ricardo Martins^a, Ricardo Ott^c, José Manuel Venzal^d, Carlos Alexandre Sanchez Ferreira^b, José Reck^{a,*}

^a Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde, 6000, Eldorado do Sul, 92990-000, RS, Brazil

^b Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Av. Ipiranga, 6681, Porto Alegre, 90619-900, RS, Brazil

^c Museu de Ciências Naturais (MCN), Fundação Zoobotânica (FZB), Rua Salvador França, 1427, Porto Alegre, 90690-000, RS, Brazil

^d Universidad de la Republica (UDELAR), Rivera 1350, Salto, 50000, Uruguay

ARTICLE INFO

Keywords:

Borreliosis

Bacteria

Vector-borne infection

Brazil

Rio Grande do Sul

Lyme disease

ABSTRACT

Borrelia burgdorferi sensu lato (s.l.) complex includes the agents of Lyme disease/borreliosis in North America, Europe, and Asia, such *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, *Borrelia afzelii*, *Borrelia garinii*, *Borrelia bavariensis*, *Borrelia spielmanii*, *Borrelia bissetiae*, and *Borrelia mayonii*. In 2013 *B. burgdorferi* s.l. was reported for the first time in the Neotropical region, from *Ixodes aragaoi* ticks in Uruguayan Pampa. In addition, from 2011 to 2016, 17 suspected human cases of borreliosis-like syndrome were reported in Rio Grande do Sul (RS) state, Brazil, which contains only part of country in the Pampa biome. The goal of this work is to report the results of a state surveillance program conducted in order to investigate the presence of *B. burgdorferi* s.l. in its classic vector, *Ixodes* spp. ticks, from the Brazilian Pampa. For this, we searched for *Ixodes* spp. ticks in 307 rodents from 11 municipalities of RS state. We then tested the ticks for the presence of *B. burgdorferi* s.l. DNA using PCR analysis. Of 35 *Ixodes* spp. ticks tested, one larva and one nymph of *Ixodes longiscutatus* ticks tested positive for *Borrelia* sp. DNA. The phylogenetic analysis of the *flaB* fragment grouped our samples (referred as *Borrelia* sp. haplotype Pampa) into *B. burgdorferi* s.l. group in a particular branch with other South American haplotypes, and this group was close to *Borrelia carolinensis*, *B. bissetiae*, and *Borrelia californiensis*. This is the first evidence of *B. burgdorferi* s.l. circulation in ticks of the genus *Ixodes* in Brazil. These results highlight the need for the implementation of public health policies for the diagnosis and prevention of potential cases of human borreliosis in Brazil. Further studies are needed to fill the gaps in our knowledge of the distribution, pathogenicity, reservoirs, and vectors of these emerging South American *B. burgdorferi* s.l. haplotypes.

1. Introduction

Since the first isolation of the Gram-negative spirochete *Borrelia burgdorferi* from *Ixodes* spp. ticks and its association in the etiology of Lyme Disease (LD) (Burgdorfer et al., 1982), several other members of the Spirochaetaceae family have been identified throughout the world as emergent vector-borne bacteria. Among these bacteria, some *Borrelia* species and a set of still unnamed haplotypes of *Borrelia* species that are genetically related to *Borrelia burgdorferi* have been grouped into the *Borrelia burgdorferi* sensu lato (s.l.) complex (Postic et al., 2007). In addition to *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (s.s.), the agent of LD in North America, the complex also comprises the other Lyme borreliosis agents in Europe and Asia, *Borrelia afzelii* and *Borrelia garinii*, respectively (Steere et al., 2016); as well as other emerging pathogens,

including *Borrelia bissetiae*, *Borrelia spielmanii*, and *Borrelia bavariensis* (Collares-Pereira et al., 2004; Rudenko et al., 2011, 2008). Due to the emergence of new species and variants, it is likely that the number of members of *B. burgdorferi* s.l. complex will increase during next few years.

In general, *B. burgdorferi* s.l. is maintained in nature through complex interactions among ticks, particularly *Ixodes* spp., and a variety of vertebrate hosts. As a rule, *B. burgdorferi* s.l. has been detected in ticks only from the Northern Hemisphere. In 2013, *B. burgdorferi* s.l. was reported for the first time in the Neotropical region (Barbieri et al., 2013). However, borreliosis cannot be dismissed as a neglected public health issue in this region. Indeed, during 2009–2016, Brazil registered 4078 suspected cases of borreliosis-like disease, also known as Baggio-Yoshinari syndrome. Of those cases, 679 people were positive for

* Corresponding author at: Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), Estrada do Conde, 6000, Eldorado do Sul, 92990-000, RS, Brazil.
E-mail address: jose.reck@gmail.com (J. Reck).

Borrelia spp. by Western blotting and enzyme immunoassay tests (Oliveira et al., 2017). Moreover, despite the fact that since 1992 there are reports of LD-like syndrome in Brazil, to date *Borrelia* spp. has never been detected in *Ixodes* spp. ticks in that country, and there is no conclusive evidence regarding the potential tick species associated with the transmission of Baggio-Yoshinari syndrome (Basile et al., 2017).

Rio Grande do Sul (RS), the southernmost state of Brazil, is the only part of the country that contains the Pampa biome; which also occurs in Uruguay and in part of Argentina. From 2011–2016, 17 suspected human cases of Lyme-like borreliosis were recorded in 11 municipalities of RS, including one patient with positive serology to *B. burgdorferi* (data kindly provided by Dr. Stefan Vilges de Oliveira, Secretaria de Vigilância em Saúde, Brazilian Health Ministry). Taking into account the first epidemiological evidences of human borreliosis cases in RS state (Oliveira et al., 2017), it is plausible to hypothesize that *Borrelia* spp. may circulate in ticks from southern Brazil. This hypothesis is reinforced by the recent reports of *B. burgdorferi* s.l. in *Ixodes aragaoi* ticks from the nearby areas of RS, as Uruguay (Barbieri et al., 2013). Thus, the aim of this work is to report the results of a state surveillance program conducted in order to determine whether *B. burgdorferi* s.l. occurs in its classic vector, *Ixodes* spp. ticks, in the Brazilian Pampa.

2. Materials and methods

2.1. Study area and sample collection

The study area consisted in 11 municipalities of RS state: Barra do Quaraí (30°11'32.67"S/57°31'22.17"W), Chuí (33°43'57.37"S/53°22'12.96"W), Herval (32°01'42.19"S/53°23'37.62"W), Porto Alegre (30°03'05.70"S/51°10'50.65"W), Santa Maria (29°39'38"S/53°49'8"W), Santa Vitória do Palmar (32°30'44.50"S/52°32'47.39"W), Santana da Boa Vista (30°51'59.94"S/53°12'00.87"W), Santana do Livramento (30°48'31.35"S/55°37'19.97"W), São Francisco de Assis (29°32'40.33"S/55°07'37.61"W), São Francisco de Paula (29°30'15.01"S/50°13'05.54"W) and Uruguai (29°45'38.78"S/57°05'12.82"W).

Ticks were obtained from wild rodents (Rodentia), since they are considered to be the main reservoirs of Neotropical *Ixodes* species (Barros-Battesti et al., 2006). Between 2014 and 2016 small rodents were sampled using live traps (Sherman and Tomahawk) and traps of interception and fall (pitfall traps with drift fences). Briefly, the captured animals were sedated with ketamine hydrochloride and xylazine hydrochloride for collection of ectoparasites, and to collect biometric data and photographic recordings for taxonomical identification. All procedures described in this study were approved by our Institutional Animal Care Committee (number 14/13 CEUA-IPVDF) and by Brazilian Biodiversity Guidelines (numbers 39496-2 and 43919-3, SISBIO). More information on the captured rodents and a full record of their ectoparasites are shown elsewhere (Michel, 2016). Ticks were also obtained by direct collection from vegetation. For this, the flagging/dragging technique was used (Sonenshine, 1993). Briefly, white flannel cotton cloths (90 × 70 cm) were dragged along the soil and shrubby vegetation in forested areas.

2.2. Tick identification

Ticks were collected and stored individually in 96% ethanol and transferred to the laboratory for taxonomic determination. The identification of ticks was carried out by morphology (Barros-Battesti et al., 2006; Durden and Keirans, 1996; Marques et al., 2004; Nava et al., 2017; Onofrio et al., 2009, 2014; Venzal et al., 2005, 2008).

2.3. Molecular detection of *Borrelia* spp. and phylogenetic analysis

After taxonomic identification of ticks, genomic DNA was extracted from individual specimens using the protocol according to Aljanabi and

Martinez (1997). The investigation of *Borrelia* spp. DNA was performed using two Polymerase Chain Reaction (PCR) assays, as reported by Barbieri et al. (2013). Briefly, nested-PCR was performed targeting the Flagellin B gene (*flaB*) of *Borrelia* spp. Positive samples were further used to amplify a fragment of the *rrfA-rrlB* intergenic spacer region (IGS). PCR products of these reactions that matched the expected size were purified, sequenced, and then compared with sequences available in GenBank using BLAST algorithm. A phylogenetic tree of the *flaB* gene was constructed using MEGA 7 software (Kumar et al., 2016); the Maximum Likelihood algorithm and Kimura-2-parameter with gamma distribution served as the DNA substitution model, and 1000 bootstraps were used for the phylogeny test.

3. Results

Of the 307 rodents investigated, 17 were parasitized by *Ixodes* spp. ticks. A total of 35 *Ixodes* spp. ticks were collected from rodents and vegetation, as follows: *I. aragaoi* (one nymph, one larva), *Ixodes longiscutatus* (one female, five nymphs, one larva), *Ixodes fuscipes* (one nymph), *Ixodes loricatus* (three nymphs), *Ixodes auritulus* (two nymphs), and *Ixodes* sp. (20 larvae).

The molecular analysis of these ticks showed that one larva and one nymph of *I. longiscutatus* (Fig. 1) tested positive for the presence of *Borrelia* spp. DNA using *flaB* nested-PCR and IGS PCR. These ticks were collected from *Oxymycterus nasutus* and *Oligoryzomys nigripes* (Rodentia: Cricetidae) from Chuí and Santa Vitória do Palmar municipalities, respectively. Fig. 2 summarizes the distribution of *Ixodes* spp. ticks and *Borrelia* sp. in the investigated areas.

The amplified fragment sequences from both positive samples were identical. The BLAST analysis of the partial sequence of the *flaB* gene revealed 100% of identity to the sequence of uncultured *Borrelia* sp. clone C (GenBank JX082313), a member of the *B. burgdorferi* s.l. group, detected in *I. aragaoi* (previously classified as *Ixodes parvicornis*) ticks from Uruguay. The analysis of the IGS fragment showed 99% identity (best match) to *Borrelia* sp. SCW-30 h (GenBank AF221673), a member of the *B. burgdorferi* s.l. group, genospecies *B. bissetiae*, detected in an *Ixodes minor* nymph tick from South Carolina, USA. The sequences of *flaB* (KY657353) and IGS (KY657352) fragments were deposited in GenBank as *Borrelia* sp. haplotype Pampa. The phylogenetic analysis of the *flaB* fragment (Fig. 3) showed that *Borrelia* sp. haplotype Pampa was grouped together with the *Borrelia* species of the *B. burgdorferi* s.l. group, which includes LD spirochetes. Indeed, it seems that *Borrelia* sp. haplotype Pampa clusters in a particular interior branch with *Borrelia* sp. clones A, B and C from Uruguay, close to *Borrelia carolinensis*, *B. bissetiae* and *Borrelia californiensis*.

4. Discussion and conclusion

Since the first report of *B. burgdorferi* s.l. in ticks of the genus *Ixodes* in South America in 2013 (Barbieri et al., 2013), molecular surveys conducted in other countries have provided evidence of the transboundary circulation of *Borrelia* spp. across the continent. Several haplotypes of *B. burgdorferi* s.l. have recently been registered in *I. parvicornis*, *Ixodes cf. neuquenensis* and *Ixodes sigelos* ticks from Argentina (Nava et al., 2014; Saracho Bottero et al., 2017; Sebastian et al., 2016). Also, DNA of *Borrelia chilensis* was detected in samples of *Ixodes stilesi* ticks from Chile (Ivanova et al., 2014; Verdugo et al., 2017).

Here, we show for the first time evidence of the presence of *B. burgdorferi* s.l. in its classic vector, *Ixodes* spp. ticks, in Brazil. The DNA of *Borrelia* sp. haplotype Pampa was found only in one species of tick, *I. longiscutatus*. In general, *B. burgdorferi* s.l. has been reported in ticks belonging to the *Ixodes ricinus* complex (e.g., *Ixodes scapularis* and *I. aragaoi*). However, considering the reports from Chile and Argentina, it seems that tick species unrelated to the *I. ricinus* complex (such as *I. stilesi* and *I. sigelos*) might be associated with *B. burgdorferi* s.l. in South America. Indeed, *I. longiscutatus* is not genetically related to the *I. ricinus*

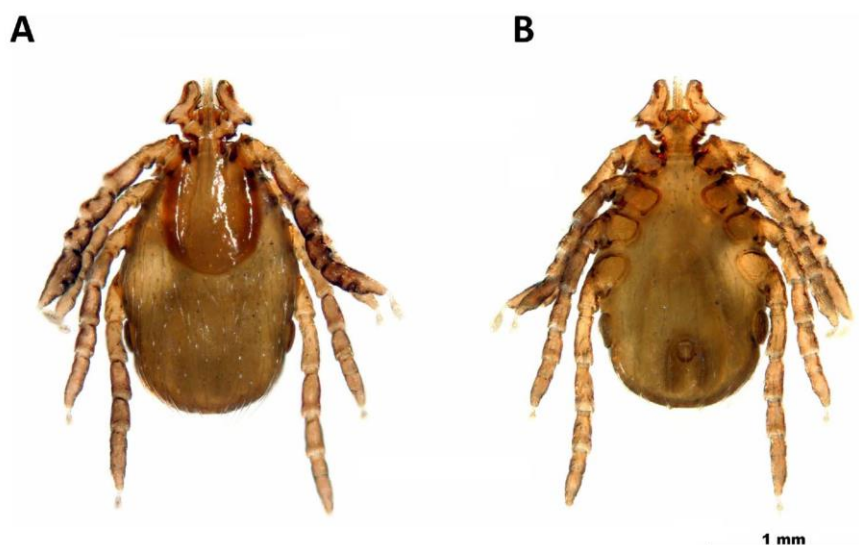


Fig. 1. *Ixodes longiscutatus* nymph. Panel A, dorsal view. Panel B, ventral view.

complex and is considered a monophyletic tick species (Guglielmone et al., 2005, 2006). It was previously assumed that this tick species was restricted to Argentina and Uruguay (Venzal et al., 2008), since it was just recently reported for Brazil (Michel, 2016). To date, little is known about *I. longiscutatus* hosts and distribution in Brazil.

Borrelia sp. haplotype Pampa seems to be closely related to other *Borrelia* spp. haplotypes previously identified in *I. aragaoi* from Uruguayan Pampa. Indeed, in our work, positive samples for *Borrelia* sp. were found only in the southern part of RS state that borders Uruguay. These haplotypes may represent a novel clade of *Borrelia* spp., that has an unknown pathogenicity and naturally circulates in both *Ixodes* species (*I. longiscutatus* and *I. aragaoi*) and wild rodents in South America. It is important to note that southern RS and Uruguay share the Pampa biome and that there are no naturally defined borders (rivers or mountains) between Brazil (RS) and Uruguay. In actuality, in the South American Pampa, *I. longiscutatus* and *I. aragaoi* ticks occur sympatrically and both of these species can share the same rodent hosts (Venzal et al.,

2005, 2008; Onofrio et al., 2014).

Although, there are no confirmed cases of human parasitism by *I. longiscutatus* to date, it is noteworthy that, in some areas, the majority of ticks that serve as maintenance vectors of *B. burgdorferi* s.l. usually do not bite humans. Nevertheless, these species appear to be more important in the enzootic cycle of borreliosis than the “bridge” vectors, i.e., those that feed on vertebrate reservoirs and humans (Oliver, 1996).

Despite hundreds of human cases of Baggio-Yoshinari borreliosis-like syndrome in Brazil during the past few years, the country is not considered a traditional risk area for human borreliosis. It could be explained because, to date, *B. burgdorferi* s.l. was never isolated from human patients or even detected in its classic vector, *Ixodes* spp. ticks, in Brazil. However, the lack of reports of *B. burgdorferi* s.l. in ticks in Brazil may be due to the absence of a sound surveillance program or surveys focused on *Borrelia* spp. detection.

Although it is not possible, at this point, to determine whether an association between *Borrelia* sp. haplotype Pampa and human

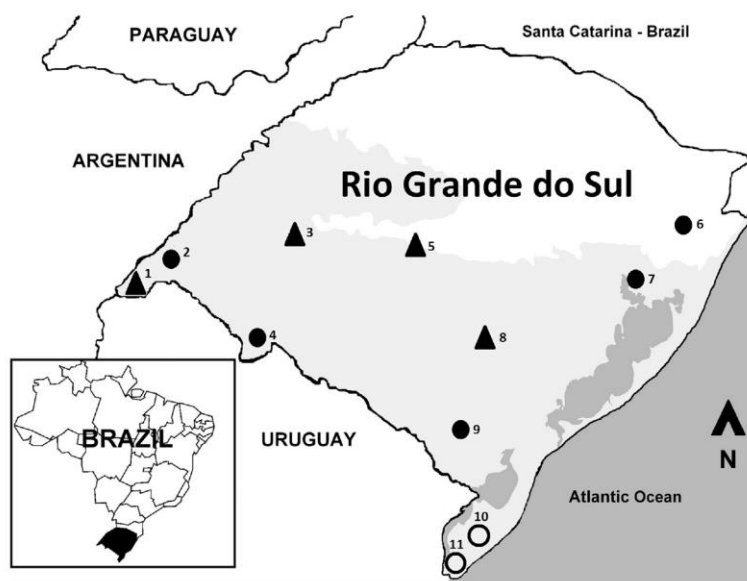


Fig. 2. Setting for investigation of tick infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato in Rio Grande do Sul state, Brazil, 2014–2016. Rio Grande do Sul state, Brazil, and neighboring countries. Light gray shading indicates the Pampa biome; dark gray shading indicates water bodies. Black triangles indicate sampled places in which *Ixodes* spp. ticks were not found; black circles indicate sampled places in which *Ixodes* spp. ticks negative to *Borrelia* sp. were collected; and open circles indicate sampled places in which *Ixodes longiscutatus* ticks positive to *Borrelia* sp. were collected. Numbers indicate the sampled municipalities, as following: Barra do Quaraí (1), Uruguaiana (2), São Francisco de Assis (3), Santana do Livramento (4), Santa Maria (5), São Francisco de Paula (6), Porto Alegre (7), Santana da Boa Vista (8), Herval (9), Santa Vitória do Palmar (10), and Chuí (11).

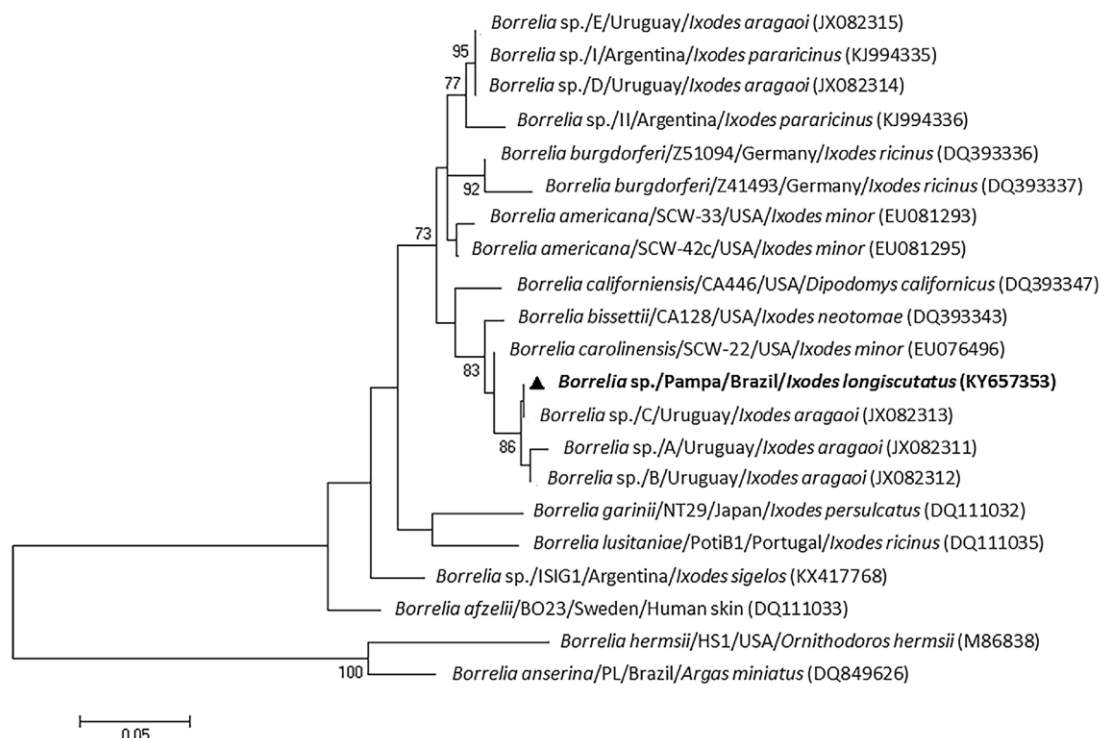


Fig. 3. Maximum likelihood-based phylogenetic tree of *Borrelia* spp. *flaB* gene. The sequence described in this study is showed in bold and indicated by a black triangle. For each sequence presented the following information is provided: species/strain/country/host (GenBank accession number).

borreliosis-like cases exists in Southern Brazil; the first detection of the genetic material from *B. burgdorferi* s.l. in ticks of the genus *Ixodes* in Brazil draws attention to a wider circulation of these bacteria in the Neotropics than was previously assumed. The set of results presented here, in addition to the lack of investigation of suspected human cases of borreliosis, highlights the need for the implementation of public health policies for the diagnosis and prevention of human borreliosis in Brazil. Additionally, further studies are needed to fill the gaps in the distribution, pathogenicity, potential vertebrate reservoirs and vectors of the South American haplotypes of *B. burgdorferi* s.l.

Acknowledgments

This work was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), INCT Entomologia Molecular, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Special thanks to Felipe Peters, BSc., André Luza, BSc., Marcelo Becker, DVM, Alexandre Christoff, PhD, Márcia Maria de Assis Jardim, PhD, Tatiane Campos Trigo, PhD and Mr. Mariano Cordeiro Pairet, Jr. for help in the field work; and Stefan Vilges de Oliveira, PhD (Ministério da Saúde, Brazil) for the information sent about suspected human cases of borreliosis in Rio Grande do Sul state.

References

- Aljanabi, S.M., Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25, 4692–4693. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/25.22.4692>.
- Barbieri, A.M., Venzal, M., Marcili, A., Almeida, A.P., Labruna, M.B., 2013. *Borrelia burgdorferi* sensu lato infecting ticks of the *Ixodes ricinus* complex in Uruguay: first report for the southern hemisphere. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 13, 147–153. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2012.1102>.
- Barros-Battesti, D.M., Arzua, M., Bechara, G.H., 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.

- Vol/ICTTD-3/Butantan, São Paulo.
- Basile, R.C., Yoshinari, N.H., Mantovani, E., Bonoldi, V.N., Macoris, D., da, G., de Queiroz-Neto, A., 2017. Brazilian borreliosis with special emphasis on humans and horses. *Braz. J. Microbiol.* 48, 167–172. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.09.005>.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L., Grunwaldt, E., Davis, J.P., 1982. Lyme disease – a tick-borne spirochetosis? *Science* 216, 1317–1319.
- Collares-Pereira, M., Couceiro, S., Franca, I., Kurtenbach, K., Schäfer, S.M., Vitorino, L., Gonçalves, L., Baptista, S., Vieira, M.L., Cunha, C., 2004. First isolation of *Borrelia lusitanae* from a human patient. *J. Clin. Microbiol.* 42, 1316–1318. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.42.3.1316-1318.2004>.
- Durden, L.A., Keirans, J.E., 1996. Nymphs of the Genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae) of the United States: Taxonomy, Identification Key, Distribution, Hosts, and Medical/veterinary importance. Entomological Society of America, Lanham, MD.
- Guglielmo, A.A., González-Acuña, D., Autino, A.G., Venzal, J.M., Nava, S., Mangold, A.J., 2005. *Ixodes sigelos* Keirans, Clifford & Corwin, 1976 (Acari: Ixodidae) in Argentina and Southern Chile. *Syst. Appl. Acarol.* 10, 37–40. <http://dx.doi.org/10.11158/saa.10.1.7>.
- Guglielmo, A.A., Venzal, J.M., González-Acuña, D., Nava, S., Hinojosa, A., Mangold, A.J., 2006. The phylogenetic position of *Ixodes stilesi* Neumann, 1911 (Acari: Ixodidae): morphological and preliminary molecular evidences from 16S rDNA sequences. *Syst. Parasitol.* 65, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1007/s11230-005-9024-4>.
- Ivanova, L.B., Tomova, A., González-Acuña, D., Murúa, R., Moreno, C.X., Hernández, C., Cabello, J., Cabello, C., Daniels, T.J., Godfrey, H.P., Cabello, F.C., 2014. *Borrelia chilensis*, a new member of the *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex that extends the range of this genospecies in the Southern Hemisphere. *Environ. Microbiol.* 16, 1069–1080. <http://dx.doi.org/10.1111/1462-2920.12310>.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33, 1870–1874. <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- Marques, S., Barros-Battesti, D.M., Onofrio, V.C., Farnadas, K.M., Faccini, J.L.H., Keirans, J.E., 2004. Redescription of larva, nymph and adults of *Ixodes (I.) loricatus* Neumann, 1899 (Acari: Ixodidae) based on light and scanning electron microscopy. *Syst. Parasitol.* 59, 135–146. <http://dx.doi.org/10.1023/B:SYPA.0000044430.05551.44>.
- Michel, T., 2016. Diversidade de carrapatos de roedores silvestres (Rodentia: Cricetidae) no Rio Grande do Sul – Atualização do gênero Ixodes (Acari: Ixodidae). Fundação Estadual de Pesquisa Agropecuária Master's dissertation in animal health.
- Nava, S., Barbieri, A.M., Maya, L., Colina, R., Mangold, A.J., Labruna, M.B., Venzal, J.M., 2014. *Borrelia* infection in *Ixodes parvicornis* ticks (Acari: Ixodidae) from north-western Argentina. *Acta Trop.* 139, 1–4. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2014.06.010>.
- Nava, S., Venzal, J.M., González-Acuña, D., Martins, T.F., Guglielmo, A.A., 2017. Ticks of the Southern Cone of America. Diagnosis, Distribution, and Hosts with

- Taxonomy, Ecology and Sanitary Importance, 1st editio ed. Academic Press.
- Oliveira, S.V., De Oliveira, K.H.C., de Santos, J.P., dos Gazeta, G.S., 2017. Geographical distribution of lyme-like borreliosis in Brazil: hot spots for research and surveillance. *J. Parasit. Dis. Diagn. Ther.* 2, 1–2.
- Oliver, J.H., 1996. Lyme borreliosis in the southern United States: a review. *J. Parasitol.* 82, 926–935.
- Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., Faccini, J.L.H., 2009. Diagnoses of and illustrated key to the species of *Ixodes* Latreille, 1795 (Acari: ixodidae) from Brazil. *Syst. Parasitol.* 72, 143–157. <http://dx.doi.org/10.1007/s11230-008-9169-z>.
- Onofrio, V.C., Ramirez, D.G., Giovanni, D.N.S., Marcili, A., Mangold, A.J., Venzal, J.M., Mendonça, R.Z., Labruna, M.B., Barros-Battesti, D.M., 2014. Validation of the taxon *Ixodes aragai* Fonseca (Acari: ixodidae) based on morphological and molecular data. *Zootaxa* 3860, 361–370. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3860.4.4>.
- Postic, D., Garnier, M., Baranton, G., 2007. Multilocus sequence analysis of atypical *Borrelia burgdorferi* sensu lato isolates – description of *Borrelia californiensis* sp. nov., and genomospecies 1 and 2. *Int. J. Med. Microbiol.* 297, 263–271. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijmm.2007.01.006>.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Mokráček, A., Piskunová, N., Ruzek, D., Mallatová, N., Grubhoffer, L., 2008. Detection of *Borrelia bissettii* in cardiac valve tissue of a patient with endocarditis and aortic valve stenosis in the Czech Republic. *J. Clin. Microbiol.* 46, 3540–3543. <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.01032-08>.
- Rudenko, N., Golovchenko, M., Grubhoffer, L., Oliver, J.H., 2011. Updates on *Borrelia burgdorferi* sensu lato complex with respect to public health. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 2, 123–128. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2011.04.002>.
- Saracho Bottero, M.N., Sebastian, P.S., Carvalho, L.A., Claps, L.G., Mastropaolo, M., Mangold, A.J., Venzal, J.M., Nava, S., 2017. Presence of *Borrelia* in different populations of *Ixodes parvicinus* from northwestern Argentina. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 6–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.008>.
- Sebastian, P.S., Bottero, M.N.S., Carvalho, L., Mackenstedt, U., Lareschi, M., Venzal, J.M., Nava, S., 2016. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes cf. neuquenensis* and *Ixodes sigelos* ticks from the Patagonian region of Argentina. *Acta Trop.* 162, 218–221. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.06.030>.
- Sonenshine, D.E., 1993. *Biology of Ticks*, vol. 2 Oxford University Press, New York.
- Steere, A.C., Strle, F., Wormser, G.P., Hu, L.T., Branda, J.A., Hovius, J.W.R., Li, X., Mead, P.S., 2016. Lyme borreliosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2, 16090. <http://dx.doi.org/10.1038/nrdp.2016.90>.
- Venzal, J.M., Estrada-Peña, A., Barros-Battesti, D.M., Onofrio, V.C., Beldoménico, P.M., 2005. *Ixodes (Ixodes) parvicinus* Keirans & Clifford, 1985 (Acari: ixodidae): description of the immature stages, distribution, hosts and medical/veterinary importance. *Syst. Parasitol.* 60, 225–234. <http://dx.doi.org/10.1007/s11230-004-6351-9>.
- Venzal, J.M., Nava, S., Beldomenico, P.M., Barros-Battesti, D.M., Estrada-Peña, A., Guglielmone, A.A., 2008. Hosts and distribution of *Ixodes longiscutatus* Boero, 1944 (Acari: ixodidae). *Syst. Appl. Acarol.* 13, 102–108. <http://dx.doi.org/10.11158/saa.13.2.2>.
- Verdugo, C., Jiménez, O., Hernández, C., Álvarez, P., Espinoza, A., González-Acuña, D., 2017. Infection with *Borrelia chilensis* in *Ixodes stilesi* ticks collected from Pudu puda deer. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 733–740. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.05.007>.