Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

**Caracterização filogenética de cepas *Rickettsia parkeri*
em carrapatos e sua dispersão em áreas endêmicas do
Estado de São Paulo**

Michellin Pereira de Albuquerque

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Saúde Pública para
obtenção do título de Mestre em Ciências.**

Área de Concentração: Saúde Pública

**Orientador: Prof. Dr. Adriano Pinter dos
Santos**

**Coorientadora: Dr^a Nicole Oliveira de
Moura Martiniano**

**São Paulo
2021**

Caracterização filogenética de cepas *Rickettsia parkeri* em carrapatos e sua dispersão em áreas endêmicas do Estado de São Paulo

Michellin Pereira de Albuquerque

Dissertação apresentada Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Entomologia em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Adriano Pinter dos Santos

Coorientadora: Dr^a Nicole Oliveira de Moura Martiniano

**Versão Corrigida
São Paulo
2021**

Michellin Pereira de Albuquerque

**Caracterização filogenética de cepas *Rickettsia parkeri*
em carrapatos e sua dispersão em áreas endêmicas do
Estado de São Paulo**

Dissertação apresentada Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Entomologia em Saúde

Orientador: Prof. Dr. Adriano Pinter dos Santos

Coorientadora: Dr^a Nicole Oliveira de Moura Martiniano

São Paulo

Data: ____/____/____

Assinatura do 1º membro da banca

Assinatura do 2º membro da banca

Assinatura do 3º membro da banca

AGRADECIMENTOS

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

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

Agradeço ao meu orientador Dr Adriano Pinter pela oportunidade de desenvolver este trabalho, e não só por isto, mas por acreditar que eu seria capaz desenvolvê-lo, entregá-lo no prazo e por me trazer tranquilidade em diversos momentos turbulentos.

Também agradeço a Dr^a Nicole Moura Martiniano, que além de co-orientadora, se tornou uma amiga. Costumo dizer que ela teve um papel fundamental na minha trajetória, pois foi uma grande incentivadora desde a especialização durante as aulas biologia molecular na disciplina de acarologia. Desde, sempre me motivou em seguir para o mestrado, e que aceitou o desafio de me co-orientar à distância, e assim fez da maneira pôde durante todo o desenvolvimento do projeto.

Também agradeço ao grupo da Dr^a Karin Kirchgatter pelo acolhimento e suporte nos experimentos realizado no Departamento de Laboratório Especializados (DELABE) da SUCEN. Sou imensamente grata a todos vocês!

À Daniele, Gabriela e Cláudia pelo momentos de parceria em seus trabalhos e também por sempre estarem dispostas a me ajudar durante todo esse período. De alguma forma cada pedacinho deste trabalho tem a contribuição de vocês! Muito obrigada por tudo meninas!

E não menos importante que os outros, agradeço a Sâmel e Carla que também suportaram meus momentos de ansiedade e nervosismo, sem contar os dias de mal humor que tive devido as noite mal dormidas e as passei em claro escrevendo essa dissertação. Elas mais do que ninguém sabem dos obstáculos que foram para chegar até aqui, e eu agradeço muito toda a cumplicidade e apoio!

E por fim, estendo meus agradecimentos à todos que também contribuíram de forma direta ou indireta pela conclusão deste trabalho.

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Caracterização filogenética de cepas *Rickettsia parkeri* em carrapatos e sua dispersão em áreas endêmicas do Estado de São Paulo

RESUMO

A Febre Maculosa é uma doença infecciosa febril aguda, com gravidade variável. Em algumas regiões das Américas, uma forma mais branda da doença é causada pela espécie *Rickettsia parkeri* que é caracterizada por manifestações clínicas mais leves. Atualmente são poucos os estudos epidemiológicos sobre a doença e seu agente etiológico. **Objetivo** Realizar um levantamento filogenético transversal de cepas de *R. parkeri* obtidas de carrapatos *Amblyomma ovale* e sua dispersão em diferentes áreas endêmicas do Estado de São Paulo. **Métodos** - Foram realizadas coletas de carrapatos em cães, identificação de espécies de carrapatos, e posterior detecção molecular, análise filogenética, estudo de diversidade genética intraespecífica de *Rickettsia parkeri* e comparação geoespacial e paisagística entre os diferentes locais de amostragem, no litoral Paulista. **Resultados** – *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica foi indentificada em três áreas do litoral. O estudo de diversidade genética demonstrou não ser significativo, sugerindo que exista um fluxo gênico entre as cepas dessa localidade e demonstrando que há conexão entre as áreas. **Conclusões** - O presente estudo mostra que a conexão estrutural e funcional entre diferentes locais em áreas costeiras pode desempenhar um papel importante como via e transportar o fluxo genético de populações de carrapatos e, conseqüentemente, riquetsias.

Palavras chaves: Febre Maculosa; *Rickettsia parkeri*; Modelagem de nicho; MaxEnt; filogenética.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Phylogenetic characterization of *Rickettsia parkeri* strains in ticks and their dispersion in endemic areas of the State of São Paulo

ABSTRACT

Spotted Fever is an infectious disease with acute severity, with varying severity. In some regions of the Americas, a milder form of the disease is caused by the species *Rickettsia parkeri*, which is characterized by milder clinical manifestations. Currently, there are few epidemiological studies on the disease and its etiological agent. **Objective** - This was a transversal phylogenetic survey of *Rickettsia parkeri* strains displaced from *Amblyomma ovale* ticks and their dispersion in different endemic areas of the State of São Paulo. **Methods** - Tick collections in dogs, identification of tick species, and subsequent molecular detection, phylogenetic analysis, intraspecific genetic diversity study of *Rickettsia parkeri* and geospatial and landscape comparison between the different sampling sites on the coast of São Paulo were carried out. **Results** - *Rickettsia parkeri* strain Atlantic Rainforest was identified in three coastal areas. The study of genetic diversity is not significant, suggesting that there is a generic flow between the strains of this locality and demonstrating that there is a connection between the areas. **Conclusions** - The present study shows that the structural and functional connection between different locations in coastal areas can insert an important role as a route and transport the genetic flow of tick populations and, consequently, rickettsiae.

Keywords: Spotted fever; *Rickettsia parkeri*; Niche modeling; MaxEnt; phylogenetic.

SUMÁRIO

RESUMO	VI
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	XII
1. APRESENTAÇÃO	1
2. INTRODUÇÃO	2
2.1. BREVE HISTÓRICO DA FEBRE MACULOSA NO BRASIL.....	2
2.2. CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DE RIQUÉTSIAS	4
2.3. FEBRE MACULOSA BRANDA	6
2.4. VETORES DE <i>Rickettsia parkeri</i>	7
2.5. <i>Amblyomma ovale</i> KOCH 1844.....	8
2.6. APLICAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES EM PESQUISA DE RIQUÉTSIAS	11
3. OBJETIVOS	14
3.1. OBJETIVO GERAL	14
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1. DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	15
4.2. ÁREA DE ESTUDO.....	15
4.3. COLETA DE IXODÍDEOS E AMOSTRAGEM DE HOSPEDEIROS....	16
4.4. IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS.....	17

4.5. LISE DE IXODÍDEOS E EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL.....	18
4.6. IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE <i>Rickettsia parkeri</i> , ANÁLISE FILOGÉNICA E ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAESPECÍFICA	18
4.7. SEQUENCIAMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS	19
4.8. ANÁLISE DAS SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS.....	19
4.9. ANÁLISES FILOGÉNICAS	20
4.10. MODELAGEM PREDITIVA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE ESPÉCIES	21
4.11. ANÁLISES ESTATÍSTICAS	23
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	24
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXO A - Ficha de coleta.....	60
ANEXO B – Ficha de consentimento do proprietário do animal.....	61
ANEXO C – Comprovante de submissão do Artigo.....	62
ANEXO D – Comprovante de artigo feito no período.....	63
ANEXO E – Currículo Lattes (Orientador).....	64
ANEXO F – Currículo Lattes (Mestranda)	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a pesquisa de *Rickettsia parkeri*.19

Tabela 2. Variáveis bioclimáticas extraídas do WordClim versão 2.1 para modelagem preditiva de espécies..... 21

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema de distribuição de *Amblyomma ovale* pelo biomas brasileiro. 9

Figura 2. Ciclo de vida *Amblyomma ovale*. Fonte: Imagem cedida pela SUCEN, 2020.
..... 10

Figura 3. Áreas de coleta de carrapatos: 1-Cubatão; 2-Peruíbe; 3-São Sebastião; 4-
Cananéia; 5-Ilhabela; 6-Ubatuba. Fonte: próprio autor, 2021..... 16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μL - Microlitro

16S rDNA – Gene Mitocondrial 16S DNA ribossômico

23S rRNA

BLASTN – Do inglês, “Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide”

CO₂ – Dióxido de Carbono (gás carbônico)

COI – Gene Citocromo Oxidase Subunidade I

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

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

Dnase- Desoxirribonuclease

FM - Febre Maculosa

FMB - Febre Maculosa Brasileira

GA – Grupo Ancestral

GenBank – Do inglês, “Banco de Genes”

GFM- Grupo Febre Maculosa

gltA – Gene Citrato Sintase

GT- Grupo Tifo

H₂O – Água

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

M - Molar

Mg - Magnésio

mg – Miligrama

mL – Mililitro

mM – miliMolar

mm - Milímetro

° C – Graus Celsius

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

P.A.- Para Análise

pb – Pares de base

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

pH – potencial Hidrogeniônico

Rnases - Ribonucleases

rpm – Rotações por minuto

sp.- Espécie

spp.- Espécies

SUCEN – Superintendência de Controle de Endemias

TAE- Tris-acetato-EDTA

Taq- *Thermus aquaticus*

1 APRESENTAÇÃO

Atualmente, a riquetsiose causada por *Rickettsia parkeri* é reconhecida como a segunda doença associada a carrapatos mais prevalente nas Américas, no qual duas cepas (*R. parkeri* sensu stricto e *R. parkeri* cepa Mata Atlântica) foram relacionadas a infecções humanas vinculadas ao gênero *Amblyomma*. No Brasil, o primeiro caso humano relatado e confirmado ocorreu em área de Mata atlântica no litoral de São Paulo no ano de 2010, com quadro clínico clássico de febre e a escara de inoculação. Desde então casos associados ao bioagente *R. parkeri* têm sido frequentemente relatados em regiões de Mata Atlântica em diferentes áreas do litoral do estado de São Paulo, e, em outras regiões do país onde esse bioma ocorre. Vale ressaltar, que frequentemente é relatado o parasitismo pelo carrapato adulto em cães domésticos que frequentam ou são mantidos em áreas adjacentes a região de Mata Atlântica, e que consequentemente, carregam esses ectoparasitas para as residências podendo ocorrer o parasitismo humano. Além disso, estudos filogenéticos recém publicados, relatam a existência de múltiplas cepas de *R. parkeri* no Novo Mundo, sendo pelo menos seis linhagens de *R. parkeri* isoladas de carrapatos oriundos do Brasil, e todas associadas ao gênero *Amblyomma*.

Assim, diante da importância da doença para Saúde Pública e da evidência de múltiplas cepas relacionadas a infecções humanas causada pela riquetsiose em questão, a presente dissertação de mestrado teve por objetivo fazer um estudo descritivo transversal sobre a ocorrência de fluxo genético entre diferentes cepas de *R. parkeri* e correlação com sua dispersão em áreas endêmicas do estado de São Paulo. Deste modo, visando contribuir para o entendimento da distribuição, circulação e epidemiologia do patógeno nas áreas endêmicas, o presente trabalho apresenta-se por meio de um capítulo composto por um artigo submetido a revista Medical and Veterinary Entomology, como artigo original.

2 INTRODUÇÃO

As riquetsioses, doenças causadas por bactérias do gênero *Rickettsia*, são consideradas zoonoses emergentes ou reemergentes vinculadas a vetores ápteros (e.g. piolhos, ácaros, carrapatos e pulgas) possuindo crescentes relatos em caráter global, e está presente em todos os continentes, exceto a Antártica (WOOD & ARTSOB, 2012; ABDAD et al., 2018). Dentre as riquetsioses já descritas, a Febre Maculosa (FM) é a principal zoonose associada a carrapatos no Brasil, no qual o Grupo Febre Maculosa (GFM) é o grupo antigênico mais estudado e que possui um crescente número de espécies de bactérias patogênicas (PINTER et al., 2011; MEIRA et al., 2013; MOERBECK et al., 2016).

No Brasil, apesar da riquetsiose por *Rickettsia rickettsii* apresentar grande importância médico-veterinária, principalmente na região Sudeste, onde se concentra a maior parte dos casos confirmados e de óbitos, sabe-se que esta não é a única riquetsia patogênica no país (OLIVEIRA et al., 2016a). Outra riquetsiose emergente tem sido reportada, há mais de uma década, com ocorrência de duas cepas patogênicas: *Rickettsia parkeri* sensu stricto e *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, descritas em regiões diferentes do país e com transmissão associada a carrapatos do gênero *Amblyomma* (SILVA-RAMOS et al., 2021). Sobre esta riquetsiose ainda há pouco conhecimento, portanto, este estudo destina-se a contribuir para o conhecimento da epidemiologia da Febre Maculosa causada por *R. parkeri*, que ainda é incipiente.

2.1 BREVE HISTÓRICO DA FEBRE MACULOSA NO BRASIL

No Brasil, a febre maculosa foi descrita pela primeira vez em São Paulo (SP) no ano de 1929, e posteriormente em outras regiões do país. Inicialmente, foi denominada como “Tifo Exantemático de São Paulo” e, subsequentemente, teve o agente etiológico identificado como

Rickettsia rickettsii e seu vetor, identificado como *Amblyomma aureulatum*. A partir de 1937, a doença foi denominada como FMB (MEIRA et al., 2013; PINTER et al., 2016). Apesar da descoberta, nos anos subsequentes a doença passou por um período de aparente "silêncio epidemiológico" e reemergiu na década de 1980 com a ocorrência de casos. Diante da sua importância para a Saúde Pública, a FMB passou a ser considerada doença de notificação compulsória em todo o país e, a partir de 2001, as notificações dos casos passaram a integrar o Sistema Nacional de Agravos de Notificação (SINAN) (ANGERAMI et al., 2015; PINTER et al., 2016).

Até 2009, a principal e única riquetsiose, reconhecida no Brasil, era a Febre Maculosa Brasileira causada pelo bioagente *R. rickettsii*, que é uma doença infecciosa febril aguda com gravidade variável, apresentando desde formas leves e atípicas até formas graves (BRASIL, 2017; SILVA-RAMOS et al., 2021). Os sintomas iniciais ocorrem de forma abrupta e inespecífica, com febre elevada, cefaleia, mialgia intensa e/ou prostração, sendo o quadro semelhante ao gripal, a leptospirose, dengue, erliquiose, erupções virais, dentre outras doenças (BRASIL, 2015). A FMB é caracterizada pela erupção cutânea maculopapular que tipicamente surge no quinto dia de infecção (BARROS-SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016a). A ausência desse sinal clínico interfere no diagnóstico diferencial, e a FMB pode ser confundida com outras doenças citadas acima. Nesse contexto, a piora do prognóstico é em decorrência da dificuldade de aplicação de um tratamento adequado (BARROS-SILVA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2016a). Dentre as infecções humanas é considerada a mais virulenta devido a sua elevada taxa de letalidade, apresentando percentuais de letalidade entre 25% a 80% (CHIKEKA & DUMLER, 2015). Os casos de infecção por *R. rickettsii* ocorrem com maior frequência na região Sudeste do Brasil; porém, também há casos registrados no Norte do Paraná e alguns Estados do Norte e Centro-Oeste do país (OLIVEIRA et al., 2016a; OLIVEIRA et al., 2016b).

Em 2009, um caso febril exantemático com quadro clínico mais leve que o observado na FMB, foi reportado após o indivíduo ter sido parasitado por um carrapato em área de reserva de Mata Atlântica litorânea no estado de São Paulo. Curiosamente, uma análise molecular de amostras de pele do local da picada, identificou uma nova cepa do grupo da febre maculosa intimamente relacionada com *Rickettsia africae*, *R. parkeri* e *R. sibirica* (SPOLIDORIO et al., 2010). Desta maneira, uma nova riquetsiose humana foi diagnosticada e, inicialmente, chamada de febre maculosa da Mata Atlântica e o novo agente foi denominado como *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. Além disso, neste mesmo ano, Angerami e colaboradores (2009), observaram diferenças clínicas entre 126 casos humanos de riquetsiose por *R. rickettsii* no estado de São Paulo e 61 casos humanos no estado de Santa Catarina por uma riquetsiose desconhecida (ANGERAMI et al., 2009), que mais tarde foi atribuída a infecções por *R. parkeri* em um estudo subsequente (BARBIERI et al., 2014).

Em um estudo mais recente, Nieri-Bastos e colaboradores (2018), evidenciaram a existência múltiplas cepas de *R. parkeri* no Novo Mundo isoladas de carrapatos oriundos do Brasil, no qual *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica foi identificada como *R. parkeri* cepa Mata Atlântica e passou a ser assim chamada (NIERI-BASTOS et al., 2018)

2.2 CARACTERÍSTICAS E CLASSIFICAÇÃO FILOGENÉTICA DE RIQUÉTSIAS

As riquétsias são bactérias intracelulares obrigatórias de aproximadamente 0,7–1,0 µm de comprimento e 0,3–0,5 µm de largura. Morfologicamente são considerada como cocobacilo gram negativo pleomórfico e classificada como alfa-proteobactéria (PAROLA et al., 2013; FOURNIER & RAOULT, 2019).

Essas bactérias pertencem à ordem Rickettsiales, que compreende três famílias: Holosporaceae, Anaplasmataceae e Rickettsiaceae, sendo o gênero *Rickettsia* pertencente a

última família citada (FOURNIER & RAOULT, 2019). Este gênero se divide em quatro grupos: Grupo Ancestral (GA) – composto por riquetsias de patogenicidade desconhecida, como a *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montei* e *Rickettsia canadensis*; Grupo Transicional - composto por *Rickettsia akari* (transmitida por ácaros), *Rickettsia australis* (transmitida por carrapatos), *Rickettsia asemboensis* (transmitida por pulgas) e *Rickettsia felis* (transmitida por pulgas e carrapatos); e com mais de 20 espécies no Grupo Tifo (GT) e Grupo Febre Maculosa (GFM) – compostos, por exemplo, por *Rickettsia prowazekii* (transmitida por piolhos) e *Rickettsia rickettsii* (transmitida por carrapatos), respectivamente (MEIRA et al., 2013; ANGERAMI et al., 2015; BLANTON, 2019).

Com o avanço das técnicas moleculares, outras espécies de riquetsias têm sido identificadas, totalizando até o momento 31 espécies dentro do gênero *Rickettsia* (FOURNIER & RAOULT, 2019), sendo a grande maioria de patogenicidade desconhecida. Entretanto, um grande número de espécies do GFM são patogênicas e cada espécie varia em patogenicidade (CHIKEKA & DUMLER, 2015; BLANTON, 2019). Os mecanismos patôgenicos de algumas espécies ainda são pouco esclarecidos, mas sabe-se que a patogenia associada ao grupo está atrelado à infecção de células endoteliais, ocasionando vasculite e o aumento da permeabilidade vascular do indivíduo (CHIKEKA & DUMLER, 2015).

As espécies do GFMs de maior importância podem ser listadas de acordo com a sua severidade, destacando-se: *R. rickettsii*, pela sua alta severidade diante demais riquetsias do grupo; seguido por, *Rickettsia conorii* com severidade consideravelmente elevada; *R. parkeri*, *Rickettsia sibirica*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica* e *Rickettsia heilongjiangensis*, que possuem severidade moderada. As demais possuem baixa severidade, como por exemplo, *Rickettsia slovaca* (BLANTON, 2019).

Nas Américas, pelo menos cinco espécies de riquetsias do GFM foram reportadas na literatura: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *Rickettsia amblyommatis*, *Rickettsia massiliae* e *Rickettsia*

hipicephali (PAROLA et al., 2005; LABRUNA et al., 2009; PINTER et al., 2008; MONJE et al., 2016; BLANTON, 2019). Porém, até o momento apenas duas dessas espécies possuem importância comprovada, a espécie *R. rickettsii* que é a mais patogênica das riquetsioses que ocorrem no país, e *R. parkeri* que é de caráter mais brando (PINTER et al., 2016; MARTÍNEZ-FACCINI et al., 2018), ambas possuem manifestações clínicas e gravidade distintas.

2.3 FEBRE MACULOSA BRANDA

É uma riquetsiose emergente de ocorrência nas Américas, e há mais de uma década casos mais brandos de FM ocorridos no Sul, Sudeste e Nordeste do país têm sido associada a *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011; LABRUNA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016; KRAWCZAK et al., 2016; DA PAIXÃO SEVÁ et al., 2018; MOURA-MARTINIANO et al., (no prelo)).

Os casos de FM por *R. parkeri* relatados, apresentam manifestações clínicas características, como linfadenopatia e escara de inoculação (OLIVEIRA et al., 2016; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018). Por se tratar de uma doença aguda com manifestações clínicas leves, pode ser confundida com a FMB, devido à reatividade cruzada e do uso comum do antígeno *R. rickettsii* para o diagnóstico sorológico da FM causada por *R. parkeri* (SILVEIRA et al., 2007; ANGERAMI et al., 2009; BARBIERI et al., 2014).

Mesmo não apresentando letalidade conhecida, esta riquetsiose emergente possui grande impacto em Saúde Pública, tendo em vista que a doença pode estar sendo subnotificada ou não detectada pela falta de diagnóstico clínico-laboratorial correto.

2.4 VETORES DE *Rickettsia parkeri*

Os carrapatos, são ectoparasitos estritamente hematófagos e podem atuar como vetores de diversos patógenos para uma grande variedade animais, incluindo os seres humanos (CAMARGO-NEVES et al., 2004). As riquetsias do GFM são patógenos transmitidos por artrópode, que podem permanecer infectados por todo seu ciclo de vida e ainda mantêm a circulação de riquetsia através de transmissão transovariana e/ou perpetuação transestadial, sendo assim considerados como reservatórios, amplificadores e principais vetores desse bioagente (CAMARGO-NEVES et al., 2004). A transmissão do bioagente está relacionada a presença e distribuição geográfica de carrapatos vetores, variáveis ecológicas e a abundância de hospedeiros animais envolvidos no ciclo das riquetsias na natureza (SZABÓ et al., 2013).

No Brasil, os carrapatos encontram-se distribuídos em todos os biomas, sendo ao todo 70 espécies descritas até o momento (SZABÓ et al., 2013; DANTAS-TORRES et al., 2019). Cada espécie possui suas particularidades, sendo umas mais cosmopolitas e outras mais restritas em alguns ecótopos, e isso tem sua importância para entendimento da história natural da doença (NAVA et al., 2017). As características biológicas são fatores importantes que auxiliam no entendimento do potencial de transmissão de bioagentes patogênicos por esses artrópodes, como, por exemplo, carrapatos monoxenos estão associados à manutenção do ciclo enzoótico de patógenos, já os carrapatos heteroxenos e antropofílicos são relacionados à formação de ciclos epidêmicos por transmitirem facilmente o patógeno entre diferentes hospedeiros (MOURA, 2011; CAMARGO-NEVES et al., 2004).

Diante das possibilidades de vetores, espécies de riquetsias, e com o avanço das técnicas de biologia molecular, o cenário da FM atualmente é complexo no Brasil. A transmissão está associada a fatores ecológicos específicos, no qual a distribuição geográfica e microambiental

de cada espécie de vetor e a abundância de hospedeiros animais envolvidos no ciclo das riquetsias na natureza estão relacionados à epidemiologia da doença (SZABÓ et al., 2013).

De acordo com alguns estudos, espécies de carrapatos como: *Amblyomma aureolatum* Pallas 1772, *Amblyomma ovale* Koch 1844, *Amblyomma tigrinum* Koch 1844, *Amblyomma triste* Koch 1844 e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille 1806, foram encontrados infectados por *R. parkeri* em condições naturais na América do Sul (PAROLA et al., 2013; MONJE et al., 2016; FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018). Porém, o vetor incriminado no ciclo de transmissão dos casos acometidos por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica é o carrapato *A. ovale* (SZABÓ et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2016a; OLIVEIRA et al., 2016b).

2.5 *Amblyomma ovale* KOCH 1844

Biogeograficamente, o carrapato *A. ovale* encontra-se distribuído nos seguintes biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Pantanal e Cerrado (FACCINI-MARTÍNEZ et al., 2018), havendo relatos da ocorrência em diversos Estados dos país, como: Amazonas, Acre Bahia, Ceará, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Pernambuco, Pará, Paraná, Rio de Janeiro, Rondônia, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo (BARROS-BETTESTI et al., 2006; ANDREOTTI et al., 2018) (Figura 1).

Esta espécie de carrapato possui hábitos silvestres, ocorrendo principalmente em áreas de baixa altitude, e, raramente encontrada em áreas urbanas (SABATINI et al., 2010; BARBIERI et al., 2015). Quanto aos hábitos alimentares, em fases imaturas, parasitam uma grande gama de hospedeiros; porém, são frequentemente encontrados em roedores cricetídeos, estes são considerados os principais hospedeiros para essas fases. Há registro de pássaros sendo parasitados por *A. ovale* (OGRZEWSKA et al., 2009a; LUZ et al., 2012; PACHECO et al., 2012; RAMOS et al., 2015), porém seu papel como hospedeiro não está claro. Entretanto, em

áreas de floresta litorânea do estado de São Paulo, onde *A. ovale* comumente parasita cães domésticos, pássaros selvagens parecem possuir relevância para estágios imaturos (OGRZEWALSKA, et al 2016). Já em fase adulta, são encontrados com maior frequência em carnívoros silvestres, principalmente em cães domésticos que adentram na mata. Também há relatos de parasitismo humano (GUGLIELMONE et al., 2006; DANTAS-TORRES et al., 2019) (Figura 2).

Figura 1. Esquema de distribuição de *Amblyomma ovale* pelos biomas brasileiro.

Em áreas de Mata Atlântica das regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil, essa espécie tem sido encontrada infectada naturalmente com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (FACCINI-MARTINEZ et al, 2018; BITTENCOURTH et al., 2019). Adicionalmente, foi demonstrado em condições laboratoriais, a eficiência vetorial de *A. ovale* na transmissão de *R. parkeri* cepa Mata

Atlântica. A espécie possui capacidade vetorial para fazer a perpetuação transestadial e a transmissão transovariana do bioagente, o que indica que *A. ovale* é reservatório de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica na natureza (KRAWCZAK et al., 2016). Portanto, o carrapato *A. ovale* é apontado como responsável pela disseminação do bioagente (SABATINI et al, 2010; SZABÓ et al., 2013; BARBIERI et al., 2015; KRAWCZAK et al 2016; MOERBECK et al., 2016; NIERI-BASTOS et al., 2018).

Figura 2. Ciclo de vida *Amblyomma ovale*. Fonte: Imagem cedida pela SUCEN, 2020.

Espécies amplamente distribuídas tendem a ter variações no nível de especiação e na capacidade vetorial, devido a adaptações aos fatores bióticos e abióticos existentes nas áreas que ocorrem (BARROS-BETTESTI et al., 2006; MCLAIN et al, 1995). Além disso, de acordo com MCLAIN et al 1995, a distância genética entre populações e a fragmentação e desconexão da floresta impedem o fluxo de hospedeiros selvagens, resultando em variações genéticas

intraespecíficas, que podem influenciar na capacidade de carreamento do patógeno, levando a formação de focos ou riscos de infecção (MCLAIN et al, 1995).

Outro fator que pode influenciar na capacidade de carreamento do patógeno e na competência vetorial, é a composição da microbiota desses vetores. Foi demonstrado, que pesquisas de bactérias baseadas em sequências de genes 16S rRNA são úteis para identificação de comunidades bacterianas existentes na microbiota de carrapatos (PAVANELO et al., 2020; ANDREOTTI et al., 2011) e sugere-se que os componentes da microbiota estejam favorecendo a colonização de *R. rickettsii* em *Amblyomma* spp. (PAVANELO et al., 2020).

No Estado de São Paulo há poucos estudos com relação à diversidade genética, distribuição e à pesquisa de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica nesse ixodídeo. Devido a sua importância para Saúde Pública, faz-se necessário estudos neste sentido, que contribuam para o melhor entendimento da variabilidade genética e o seu papel no ciclo dessa riquetsiose em áreas endêmicas de SP.

2.6 APLICAÇÃO DOS MÉTODOS MOLECULARES EM PESQUISA DE RIQUETSIAS

Métodos moleculares têm sido utilizados para fins diagnósticos e em pesquisas científicas, nos quais a detecção e identificação de riquetsias é feita através da amplificação de segmentos do genoma comuns ao gênero (JADO et al, 2006; ANGERAMI et al., 2015). Para entender as relações entre as espécies de riquetsias, os alvos comumente utilizados são regiões estáveis do genoma, consideradas conservadas, que codificam proteínas importantes como: citrato sintase (*glTA*); o gene da proteína externa de membrana A (*ompA*- outer membrane protein A); o gene da proteína de superfície de 17 kilodaltons (*htrA*); o gene da proteína externa de membrana B (*ompB*- outer membrane protein B) e o Gene D ou antígeno de superfície celular

4 (*sca4*- surface cell antigen 4) (ANGERAMI et al., 2015). De acordo com Fournier e colaboradores (2004), as sequências codificantes são úteis para classificação filogenética e genotípica interespecies (FOURNIER et al., 2004).

Em estudos filogenéticos, as regiões intergênicas têm sido utilizadas para identificar variações genéticas intraespecies de riquetsias (FOURNIER et al., 2004; VITORINO et al., 2007; NIERI-BASTOS et al., 2018). Essas regiões sofrem menor pressão seletiva, uma vez que são regiões não codificantes do genoma, ou seja, suas sequências não codificam proteínas, portanto, variam mais se comparadas com regiões codificantes (GONZÁLEZ et al., 2003; JADO et al., 2006). Deste modo, as sequências não codificantes podem ser mais variadas entre as linhagens da mesma espécie, sendo assim, são úteis na diferenciação de cepas.

A caracterização molecular de bactérias contribui para o estudo epidemiológico ou para o monitoramento de populações bacterianas que com o tempo sofrem mudanças, e também auxiliam no rastreamento de cepas que causam surtos em determinadas regiões (FOURNIER et al., 2004).

Em um estudo recente, Nieri-Bastos et al (2018) evidenciaram a existência de múltiplas cepas de *R. parkeri* no Novo Mundo, sendo pelo menos seis linhagens de *R. parkeri* isoladas de carrapatos oriundos do Brasil, e todas associadas a carrapatos do gênero *Amblyomma*. As linhagens encontradas foram: *R. parkeri sensu stricto* em *Amblyomma triste*, *R. parkeri* cepa NOD em *Amblyomma nodosum*, *R. parkeri* cepa Mata Atlântica em *A. ovale*, *R. parkeri* cepa ApPR em *Amblyomma parkeri*, *R. parkeri* cepa Cooperi em *Amblyomma dubitatum* e *R. parkeri* cepa PA em *Amblyomma naponense* (NIERI-BASTOS et al., 2018).

Diante desse cenário, em que estudos em áreas endêmicas ainda são incipientes, pesquisas sobre a diversidade de cepas de *R. parkeri* no Estado de SP, e sua dispersão em regiões onde há casos humanos relatados e carrapatos encontrados naturalmente infectados são relevantes. Tais pesquisas são necessárias para entender a epidemiologia da Febre Maculosa,

tendo em vista que essa pode ser subdiagnosticada ou diagnosticada erroneamente como outras doenças agudas leves.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo descritivo transversal sobre a ocorrência de fluxo genético entre diferentes cepas de *R. parkeri* e correlacionar com sua dispersão em áreas endêmicas do Estado de São Paulo.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar coletas de ixodídeos em seis áreas no litoral do estado de São Paulo;
2. Investigar a presença de *R. parkeri* em carrapatos *Ambloymma ovale* coletados em cães;
3. Investigar a variabilidade genética em cepas de *Rickettsia parkeri*;
4. Correlacionar as análises filogenéticas com a distribuição espacial e potencial dispersão dos vetores e bioagentes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo epidemiológico de teste de hipótese do tipo transversal com levantamento da diversidade de cepas de *R. parkeri* em municípios litorâneos do Estado de São Paulo, e o teste da hipótese nula de que há divergência genética significativa entre cepas de *R. parkeri* detectadas em carrapatos coletados em áreas geograficamente dispostas em um estrato de isolamento. O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Animal da Superintendência de Controle de Endemias, sob a supervisão do Dr. Adriano Pinter dos Santos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da Superintendência de Controle de Endemias processo CEUA-SUCEN No. 0003.

4.2 ÁREA DE ESTUDO

Os ixodídeos foram coletados em área de Floresta Atlântica ombrófila densa litorânea do estado de São Paulo, região sudeste do Brasil. As áreas foram selecionadas de acordo com o perfil de degradação ou continuidade de Mata Atlântica da região, com ou sem isolamento geográfico, com presença de *A. ovale* relatada no município e/ ou ocorrência de casos humanos que coincidem com quadro de Febre Maculosa branda. Sendo assim, seis áreas foram selecionadas dentre os municípios do Litoral Paulista: Cananéia, Ilha Bela, Peruíbe, São Sebastião, Cubatão e Ubatuba (Figura 3).

Figura 3. Áreas de coleta de carrapatos: 1-Cubatão; 2-Peruíbe; 3-São Sebastião; 4- Cananéia; 5-Ilhabela; 6-Ubatuba. Fonte: próprio autor, 2021.

4.3 COLETA DE IXODÍDEOS E AMOSTRAGEM DE HOSPEDEIROS

A coleta dos ixodídeos foi realizada em comunidades adjacentes a fragmentos de mata nos municípios litorâneos do Estado de São Paulo. Os vetores foram coletados por busca ativa, diretamente em hospedeiros caninos domiciliados, sendo retirados por torção contínua em torno do próprio eixo longitudinal do idiossoma (CAMARGO-NEVES et al., 2004).

Os cães foram selecionados de acordo com os seguintes critérios, como sugerido por Pinter et al. (2008):

- Residir na área por pelo menos um ano;
- Ter entre 1 a 10 anos de idade;

- Não ter sinais clínicos de quaisquer doença;
- Nunca ter saído da área;
- Residir ou ter acesso irrestrito e em abundância aos interiores da mata.

Foram examinados pelo menos 30 cães por área, sendo um total de 151 cães examinados em cinco áreas investigadas.

Cada carrapato coletado foi acondicionado vivo a tubos de plástico e encaminhados ao Laboratório de Biologia Animal da Superintendência de Controle de Endemias, juntamente com as fichas de coleta e o termo de consentimento do proprietário do animal (ANEXO A e B).

Os carrapatos foram individualmente desinfetados em solução de álcool iodado 25% por 5 min, lavados abundantemente com água Milli-Q e congelados em freezer -80 °C para pesquisa molecular de riquetsias (CAMARGO-NEVES et al., 2004).

4.4 IDENTIFICAÇÃO DE IXODÍDEOS

Os carrapatos coletados foram identificados morfológicamente em mesa fria (em temperatura -8°C) utilizando estereomicroscópio e com o auxílio de chaves dicotômicas descritas por Martins et al. (2010) para ninfas de carrapatos, Aragão e Fonseca (1961) e Barros-Battesti et al. (2006) para adultos de ixodídeo. Em seguida, cada carrapato adulto identificado foi cortado longitudinalmente, da porção inicial do gnatossoma até o final do idiossoma, e cada corte foi separado em tubos individuais (de acordo a sua espécie, estágio e a identificação recebida) sendo destinado um corte para análises moleculares e outro armazenado para posterior isolamento de *R. parkeri*. As larvas e ninfas foram utilizadas apenas para análises moleculares, assim foram feitas alíquotas individuais para ninfas e *pool* de no máximo 10 espécimes para larvas.

4.5 LISE DE IXODÍDEOS E EXTRAÇÃO DE DNA TOTAL

As alíquotas foram submetidas a lise mecânica em equipamento com sistema FastPrep® (MP Biomedicals, LLC) a extração de DNA total foi realizada por kit comercial da QIAGEN – DNAeasy Blood & Tissue Kit® (QIAGEN – Maryland, EUA). A lise dos ixodídeos foi feita em tubos de tampa rosca de 2mL, contendo uma esfera de aço inoxidável de 5,5mm, 180µL de tampão ATL e 20µL de proteinase K, em seguida, mantidos sob agitação por 120 segundos a 16000rpm em equipamento FastPrep®.

4.6 IDENTIFICAÇÃO MOLECULAR DE *Rickettsia parkeri*, ANÁLISE FILOGÊNÉTICA E ESTUDO DE DIVERSIDADE GENÉTICA INTRAESPECÍFICA

Todas as amostras que tiveram seu DNA genômico extraído foram submetidas a pesquisa de *R. parkeri* através de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e posterior visualização dos fragmentos de DNA amplificados. Inicialmente foram analisados utilizando os oligonucleotídeo para os genes de identificação de gênero específico e do GFM, utilizando os oligonucleotídeos *gltA* (CS2) e *ompA*, respectivamente (tabela 1).

Uma vez positivas na triagem, as amostras foram testadas para outros marcadores com o intuito de realizar a análise filogenética e um estudo da diversidade intraespecífica. Para isto, utilizamos oligonucleotídeos iniciadores para alvos polimórficos (*rpmE-tRNA*, *rrl-rrf-ITS* e *23S rRNA*) que possibilitam identificar as variações genéticas dentro da espécie (tabela 1). Como controle positivo foi utilizado DNA de *R. parkeri* e água miliQ livre de DNA como controle negativo.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para a pesquisa de *Rickettsia parkeri*.

	Gene	Iniciador	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência
Genes Conservados	<i>gltA</i>	CS2 – 78 CS2 - 323	5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3' 5'-GCTTCCTTAAAAATCAATAAATCAGGAT-3'	401	Labruna et al., 2004
	<i>ompA</i>	Rr 190.70p Rr 190.602n	5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3' 5'-GTTCGGTTAATGGCAGCATCT-3'	532	Regnery et al., 1991
	<i>htrA</i>	17k-5 17k-3	5'-CGTTTACAAAATCTAAAAACCATATA-3' 5'-TGTCTATCAATTCATCAACTTGCC-3'	549	Labruna et al., 2004b
Genes não conservados	<i>23S-5S rRNA</i>	RCK /23-5-F RCK /23-5-R	5'-GATAGGTCRGRGTGTGGAAGCAC-3' 5'-TCGGGAYGGGATCGTGTGTTTC-3'	388	Jado el at., 2006
	<i>rmpE-tRNA</i>	Forward Reverse	5'-TTCCGGAAATGTAGTAAATCAATC-3' 5'-TCAGGTTAATGAGCCTGACGA-3'	144	Fournier et al., 2004
	<i>mppA-purC</i>	Forward Reverse	5'-GCAATTATCGGTCCGAATG-3' 5'-TTTCATTATTGTCTCAAAATCA-3'	160	Fournier., 2007

4.7 SEQUENCIAMENTO DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS

Todos os produtos de PCR obtidos, tanto de genes conservados como os não conservados, que corresponderam ao tamanho esperado, foram purificados utilizando o método de purificação de produtos de PCR com ExoSAP-IT™ (©2017 Thermo Fisher Scientific) de acordo com as informações do manual do fabricante, posteriormente foram sequenciados pelo método de Sanger. O sequenciamento foi realizado pelo Laboratório de Genoma Humano IMT/USP.

4.8 ANÁLISE DAS SEQUENCIAS NUCLEOTÍDICAS

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

através do algoritmo de alinhamento múltiplo ClustalW (Thompson et al. 1994), disponível no programa MEGA X (Tamura et al. 2013). Todos os alinhamentos foram inspecionados manualmente para assegurar o alinhamento das sequências, em seguida, o alinhamento dos genes investigados de cada organismo estudado foi concatenado utilizado o programa SeaView (GOUY et al., 2009).

4.9 ANÁLISES FILOGÊNETICAS

A abordagem multigênica tem sido utilizada para caracterização de espécies de riquetsias (VITORINO et al, 2007). De acordo com Stackebrandt e colaboradores (2002) a utilização de múltiplos genes do genoma bacteriano tornam os dados filogenéticos mais refinados, melhorando a discriminação e a robustez das relações filogenéticas. Portanto, as sequências obtidas para riquetsias foram submetidas a reconstrução filogenética através de análise de parcimônia e de máxima verossimilhança no programa Seaview para comparar a topologia entre as árvores geradas. Foi utilizado o modelo evolutivo que melhor se ajustou ao conjunto de dados analisados indicado pelo programa MODELTEST 2.1.10.

Para avaliar as divergências genéticas entre as populações de *R. parkeri* oriundas das áreas estudadas no Litoral Paulista, foram construídas duas árvores de associação de vizinhos não enraizadas e as porcentagens de identidades genéticas foram calculadas sobre os alinhamentos resultantes usando Arlequin V (KEARSE et al. 2012).

Para visualizar a frequência e a distribuição espacial dos haplótipos, foi empregado um algoritmo de junção mediana (MJ), baseado em critérios de parcimônia (BANDELT et al. 1999) e foi comparado com a distribuição espacial das amostras com auxílio do programa Quantum Gis (QGis).

4.10 MODELAGEM PREDITIVA DE DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DE ESPÉCIES

Para avaliar a potencial distribuição de *A. ovale* nos municípios do litoral do estado de São Paulo, dados sobre a presença de carrapatos foram obtidos a partir de carrapatos coletados durante o estudo, literatura publicada e banco de dados no site “SpeciesLink” (www.splink.org.br). Além disso, dados ambientais foram usados para modelagem preditiva de distribuição de espécies, no qual consistiram de dados de clima e elevação obtidos no site “WorldClim” (www.worldclim.org). Os dados climáticos do WorldClim consistem em médias para os anos 1970-2000 de dados meteorológicos mensais com resolução espacial de 30 segundos (aproximadamente 1 km) (FICK, SE & HIJMANS RJ, 2017). Os dados de elevação, na mesma resolução, também foram baixados do site do WorldClim e derivados dos conjuntos de dados de elevação da SRTM. Com isso, no total, 19 variáveis bioclimáticas e elevação foram extraídas do WordClim v2.1 (<http://www.worldclim.com/version2>) (Tabela 2).

Tabela 2. Variáveis bioclimáticas extraídas do WordClim versão 2.1 para modelagem preditiva de espécies.

SIGLA	VARIÁVEIS BIOCLIMÁTICAS
BIO1	Temperatura Média Anual
BIO2	Variação diária média (média mensal (max temp - min temp))
BIO3	Isotermalidade (BIO2/BIO7) ($\times 100$)
BIO4	Sazonalidade da temperatura (desvio padrão $\times 100$)
BIO5	Temperatura máxima no mês mais quente

BIO6	Temperatura mínima no mês mais frio
BIO7	Variação anual da temperatura (BIO5-BIO6)
BIO8	Temperatura média no trimestre mais úmido
BIO9	Temperatura média no trimestre mais seco
BIO10	Temperatura média no trimestre mais quente
BIO11	Temperatura média no trimestre mais frio
BIO12	Precipitação anual
BIO13	Precipitação do mês mais úmido
BIO14	Precipitação do mês mais seco
BIO15	Sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação)
BIO16	Precipitação do trimestre mais úmido
BIO17	Precipitação do trimestre mais seco
BIO18	Precipitação do trimestre mais quente
BIO19	Precipitação do trimestre mais frio
ALT	Elevação

A modelagem foi realizada no programa MaxEnt, no qual utiliza o algoritmo da máxima entropia em dados de presença (longitude, latitude e espécies de interesse) para estimar um conjunto de funções que se relacionam com variáveis ambientais do habitat com a finalidade de aproximar-se da distribuição geográfica potencial das espécies (Phillips et al. 2006). O método parte do pressuposto que a distribuição conhecida de uma espécie é a representação

adequada do seu nicho ecológico. Assim, são atribuídos valores de zero a um para os demais quadrantes (pixels) da área geográfica, identificando o quanto de erro estão em relação ao modelo ideal. Por este motivo, para reduzir os efeitos do viés de amostragem no conjunto de dados, a configuração do programa “remover registros de presença duplicados” foi utilizada. Garantindo que apenas um único ponto de registro de espécie caísse dentro da extensão de cada célula da grade nos dados ambientais, reduzindo a sobreamostragem, que poderia produzir probabilidades altas de presença em regiões sob amostragem e probabilidades baixas de presença em áreas que foram sub-amostradas.

4.11 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi implementada para testar a hipótese nula de que há divergência genética significativa entre cepas de *R. parkeri* detectadas em carrapatos coletados em áreas geograficamente dispostas (EXCOFFIER et al., 1992). As populações também foram testadas quanto à estabilidade demográfica e seleção de antecedentes, usando o teste da neutralidade genética das seqüências de D de Tajima (TAJIMA, 1989) e F_s de Fu (FU, 1997), com 1000 gerações aleatórias. Os índices foram baseados no padrão observado de variação alélica, que pode ser influenciado por processos demográficos, (BALLARD & WHITLOCK, 2004). Os testes AMOVA e teste de neutralidade genética foram realizados no programa Arlequin.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O texto a seguir, se refere ao manuscrito submetido a revista “Medical and Veterinary Entomology”.

Characterization of strains *Rickettsia parkeri* in an edemic area of the coastal of São Paulo, Brazil

M. P. Albuquerque¹, G. A. C. G. Takeda¹, D. R. Xavier¹, C. Scinachi¹, N. O. Moura-Martiniano³, A. Pinter^{1;2}

¹Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública, São Paulo, SP, Brazil.

²Superintendência de Controle de Endemias - SUCEN, São Paulo, SP, Brazil.

³Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Correspondence: Rua Paula Sousa, 166 - São Paulo/SP , Brazil - CEP:01027-000. Tel.: 11 3311-1194; E-mail: michellin@usp.br

Running head: Characterization *R. parkeri*

Abstract

Spotted Fever is an acute febrile infectious disease, with varying severity. In some regions of the Americas, a milder form of the disease is caused by the species *Rickettsia parkeri*, which is characterized by milder clinical manifestations. Currently, there are few epidemiological studies on the disease and its etiological agent. This work aims to better understand the epidemiology of the disease by conducting a transversal phylogenetic survey in different strains of *Rickettsia parkeri* of ticks and their dispersion in different endemic areas of the State of São Paulo. Tick collections were made in dogs, identification of tick species, and subsequent molecular detection, phylogenetic analysis, a study of inter and intraspecific genetic diversity of *Rickettsia parkeri* and geospatial and landscape comparison between the different sampling sites. This results contributes to a better understanding of the genetic distribution and flow between different strains of *Rickettsia parkeri* existing in these regions and helps to elucidate their frequency and distribution, and consequently, contributing to the knowledge of the epidemiology of mild spotted fever, which is still incipient.

Introduction

Spotted fever (SF) is a tick-borne-disease caused by bacteria of the genus *Rickettsia* that belong to the Spotted Fever Group (SFG). In Brazil, *Rickettsia* species of the SFG have been receiving special attention of several research groups, what has been promoting the increasing number of description of pathogenic bacteria species (MOURA-MARTINIANO et al., 2014). SF is the main zoonosis associated with ticks in Brazil (BLANTON, 2019). Because of the development of molecular techniques, several species of rickettsiae have been identified, up to 31 species within the Genus *Rickettsia* (FOURNIER & RAOULT, 2019), even though the pathogenicity of the vast majority of those species is unknown. When it comes to SFG, a large

number of species have been described as pathogenic in different levels (CHIKEKA & DUMLER, 2015; BLANTON, 2019).

In Brazil, among the described rickettsioses, the emerging spotted fever disease caused by *Rickettsia parkeri* have been reported predominantly in areas of Atlantic Rainforest of Brazilian South, Southeast and Northeast regions (FACCINI-MARTINEZ et al, 2018). Over a decade, it has been characterized by causing mild and non-lethal human cases of the disease (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011; LABRUNA et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2016; KRAWCZAK et al., 2016; PAIXÃO-SEVÁ et al., 2019). In fact, in the last decade, a specific strain of *R. parkeri* has been described in southeastern Brazil and related to the human cases, and the tick *Amblyomma ovale* determined as the vector (KRAWCZAK et al., 2016).

A. ovale is one of the most widely distributed ticks in Brazil, and in a common species in the state of São Paulo (southeastern Brazil), as a particularity, in the State of São Paulo, this tick species is only found below 600 meters of altitude (BARBIERI et al., 2015) and most of the report were made parasitizing carnivores in their adult stages and associated with rodents and other small warm-blooded vertebrates in their immature stages (SZABÓ et al., 2013; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016). Moreover, the genetic distance among different tick populations from fragmented and not structurally connected forest patches seems to be caused by a low movement of wild hosts, resulting in important intraspecific genetic variations, which is very likely to influence the carrying capacity of the pathogen and the potentially formation of foci of higher risk of pathogens circulation (MCLAIN et al, 1995).

The use of genetic evaluation methods alongside with phylogenetic analysis has helped understanding the diversity of rickettsiae species, in which, targeted conserved regions of the genome are used. Those regions code functional important proteins, such as: citrate synthase (gene *gltA*), the outer membrane protein A (gene *ompA*), and the 17 kilodalton surface protein (gene *htrA*) (JADO et al, 2006). Intergenic regions have also been used to identify intraspecies

genetic variations of rickettsiae (FOURNIER et al., 2004; VITORINO et al, 2007; NIERI-BASTOS et al., 2018), these regions undergo lesser selective pressure since they are non-coding regions of the genome, therefore, there are more incorporation of mutation, insertions and deletions when compared to more conserved regions (GONZÁLEZ et al., 2003; JADO et al., 2006). Thus, the non-coding sequences are more likely to vary among strains of a single species, consequently, it is an important tool for differentiating of strains, whereas protein coding sequences are more useful for interspecies phylogenetic and genotypic classification (FOURNIER et al., 2004).

The multigenic analysis approach has been used to characterize species of rickettsiae (VITORINO et al, 2007). According to Stackebrandt and collaborators (2002), the use of multiple genes in the bacterial genome refines the phylogenetic data, improving the discrimination and the robustness of phylogenetic relationships. Furthermore, a study using a multigenic analysis approach showed the existence of multiple strains of *R. parkeri* in the New World, where several strains of *R. parkeri* were isolated from ticks from Brazil, and all associated with ticks of the genus *Amblyomma*, such as *R. parkeri* sensu stricto from *Amblyomma triste* tick, *R. parkeri* strain NOD from *Amblyomma nodosum* tick, and *R. parkeri* strain Rain Forest from *A. ovale* (NIERI-BASTOS et al., 2018). In another recent study from southern Brazil, Weck and collaborators (2020) identified *R. parkeri* ss from *Amblyomma tigrinum* collected from domestic dogs also using multigene molecular characterization.

The territorial circulation of *R. parkeri* is dependent upon the movimentation of the reservoir tick *A. ovale*. Therefore to determinate the geographical distribution of this tick species and identification of potential functional and structural ecological corridors is fundamental for identification of territorial connectivity among different populations of ticks and *R. parkeri*.

In this context, the characterization of *R. parkeri* strains and geographical favorability for *A. ovale* occurrence became relevant to understand the distribution, circulation and epidemiology of this pathogen in endemic areas in the State of São Paulo. In this study, we performed a field study on different coastal areas in the State of São Paulo aiming to identify *R. parkeri* natural infected *A. ovale* ticks and carry out a multigenic molecular characterization in order to detect whether there is any genetic flow among *R. parkeri* stains collected from geographically distant areas as well as an assay for habitat favorability modeling, in order to contribute to the knowledge of the occurrence and epidemiology of the mild Spotted Fever on the coast of São Paulo, which is still incipient.

Materials and Methods

An epidemiological cross-sectional study was carried out with a hypothesis that there was a genetic flow among different samples of *R. parkeri* collected from different places in the natural occurrence area in the state of São Paulo State coastal counties, so being the null hypothesis test that there is significant genetic divergence between *R. parkeri* strains detected in ticks collected in areas geographically located at least 60 km distance from each other. This study was developed at the Endemic Diseases Control Superintendence (SUCEN), and approved by the internal Animal Use Ethics Committee, process CEUA-SUCEN No. 0003.

Collection and sampling of the dogs

Ixodid collection was carried out on years 2019 and 2020 in communities adjacent to dense Atlantic Rainforest areas in the São Paulo State's coastal counties, southeastern Brazil, except for the ticks from Ubatuba area which specimens were previously obtained from dogs by the State Public Health acarological surveillance service in 2010 and have been kept in -80°C. Five areas were chosen as sites for tick collection in six different municipalities (A1 to

A5) plus the Ubatuba area (A6), to know: Cubatão (A1), Peruíbe (A2), São Sebastião (A3), Cananéia (A4), Ilha Bela (A5), and Ubatuba (A6) (Figure 1).

Semi-domiciled dogs were fiscally contained and a investigator searched the fur for ticks during five minutes for each animal. Only ticks of the genus *Amblyomma* were collected, detected specimens were removed by continuous torsion around the longitudinal axis of the idiosome until release (CAMARGO-NEVES et al., 2004). The sampled dogs were selected according to the following criteria, as suggested by Pinter et al. (2008): Being born and raised in the area; residing in the area for at least one year; being between 1 and 10 years old; having no clinical signs of any disease; specimen that had never left the area; residing or have unrestricted and abundant access to the interior of the forest.

Identification of ixodids

The collected ticks were kept alive and placed into a plastic through the working day and eventually stocked at -80°C till use. Thereafter each individual tick was taken from the -80°C and directly placed on a glass plate on a cold table (at -8°C) for morphologically identification, using a stereomicroscope and with the aid of dichotomous keys described by Martins et al. (2010) for tick nymphs, Aragão and Fonseca (1961) and Barros-Battesti et al. (2006) for adults.

Then, each identified adult tick was cut longitudinally with a disposable sterile steel blade, from the initial portion of the gnathosome to the end of the idiosome, and each cut was separated into individual tubes. One half was returned to -80°C and the other half was used for genetic analyzes. Larvae and nymphs were used whole for molecular analysis.

Ixodid lysis and total DNA extraction

One half of each adult tick specimen was subjected to mechanical lysis through FastPrep® system (MP Biomedicals, LLC) and the total DNA extraction was carried out by a commercial kit from QIAGEN - DNAeasy Blood & Tissue Kit® (QIAGEN - Maryland, USA) as suggested in the product protocol. Lysis step of the ixodids was performed in 2mL microtubes, containing 15.5mm stainless steel beads, 180µL of kit ATL buffer, and 20µL of proteinase K, then kept under agitation for 120 seconds at 16000rpm in FastPrep® equipment.

Molecular analyzes

The genomic DNA extracted of each tick specimen was subjected to detection of *R. parkeri* through Polymerase Chain Reaction technique (PCR) using the DreamTaq Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) and subsequent visualization of any amplified DNA fragments in electrophoresis in 2% agarose gel stained with UniSafe Dye® (UNISCIENCE Corp.). Initially, all samples were screened using oligonucleotides targeting specific genes for the genus and also for Spotted Fever Group (SFG) identification. The use oligonucleotides were : *gltA* (*cs2*) *htrA* and *ompA* (REGNERY et al., 1991; LABRUNA et al., 2004a; LABRUNA et al., 2004b).

The samples that yield positive results were run for new round of PCR for genomic targets in order to perform phylogenetic analysis and the study of intraspecific diversity. In this case, it was used oligonucleotides primers for polymorphic targets (*mppA-purC*, *rpmE*-tRNA^{fMet}, 23SrRNA- 5SrRNA) that can provide data about genetic variations within the species (FOURNIER et al., 2004, 2007 ; JADO et al., 2006). As a positive control for the reaction it was used *R. parkeri* DNA and DNA-free milliQ water was set as a negative control.

All obtained PCR products, both from conserved and non-conserved genes, corresponding to the expected size, were purified using the PCR product purification method

with ExoSAP-IT™ (©Affymetrix), according to the information in the manufacturer's handbook, and were subsequently sequenced by the Sanger method.

All obtained sequences were edited manually and the consensus sequences were generated with the aid of the ChromasPro 1.5 program. (Technelysium Pty Ltd, Tewantin, Qld, Australia). The DNA sequences were identified by similarity evaluation, through comparative analysis with the sequences deposited in GenBank, with the aid of BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool- Nucleotide) and automatically aligned through the ClustalW multiple alignment algorithm (THOMPSON et al. 1994), available in the MEGA 6.0 program (Tamura et al. 2013). All alignments were manually inspected to ensure sequence alignment, and the SeaView 5.0 program (GOUY et al., 2009) was additionally used to concatenate the investigated gene alignments obtained from each organism in the studied areas.

The obtained sequences were submitted to phylogenetic reconstruction by maximum likelihood analysis in the Seaview 5.0 program, using the GTR evolutionary model with a 70% cut-off that best fits the analyzed dataset indicated by the Modeltest 2.1.10 program.

Modeling potential habitat for *Amblyomma ovale*

Aiming to evaluate the potential distribution for *A. ovale* in the São Paulo State's coastal area, data on ticks presence were obtained geolocating ixodids collected during this study, plus public data published in literature and also from database "SpeciesLink" (www.splink.org.br). In addition, environmental data were used to the predictive modeling of species distribution, which consisted of climate and elevation data obtained from the "WorldClim" website (www.worldclim.org), consisting of monthly weather data averages within years 1970-2000 with a geographical resolution of 30 seconds (resolution of approximately 1 km) (FICK, SE & HIJMANS RJ, 2017). Elevation data, in the same resolution, was also downloaded from the WorldClim website and derived from Shuttle Radar Topography Mission (SRTM) elevation

data sets. Forecast variables included 19 bioclimatic variables and elevation extracted from WorldClim v2.1 (<http://www.worldclim.com/version2>) from WorldClim. To analyze the performance of the models was used MaxEnt program v 3.4.4, in which it uses the algorithm of maximum entropy in presence data (longitude, latitude and species of interest) to estimate a set of functions that relate to environmental variables of the habitat in order to approximate the potential geographic distribution of the species (PHILLIPS et al. 2006). the dataset was divided into a “training” and a “testing” group. Bootstrap models was generated for every species to predict the accuracy of the model as a result of the training data. Probably 75% of the dataset will be used to train the model (training) and 25% to estimate the performance Furthermore, the area under the curve (AUC) of all algorithms was calculated for each area. The AUC is an indicator for the quality of the model (FICK, SE & HIJMANS RJ, 2017). The AUC has a value between 0 and 1 by which a value of 1 indicates a perfect model and 0.5 represents bad model, not better than a random guess. The results of the models for the area study are presented in maps compared with the species spatial distribution using Quantum GIS v.3.2.1.

GenBank accession number(s)

The GenBank accession numbers for the DNA sequences generated in this study for the rickettsial isolates are the following: *gltA* gene, MZ719016 to MZ719032; *ompA* gene, MZ712115 to MZ712126; *htrA* gene, MZ720750 to MZ720759; *mppA-purC* intergenic spacer, MZ773960 to MZ773970; *rpmE-tRNA^{fMet}* intergenic spacer, MZ773971 to MZ773980 and 23SrRNA- 5SrRNA intergenic spacer, MZ773981 to MZ773989.

Results

A total of 124 ticks (4 larvae, 3 nymphs, 70 male, and 47 female) were collected on twenty-one dogs, from the 151 dogs examined. Out of the 124 ticks obtained in the present

study, two *Amblyomma* species were identified: *A. ovale* (95.97% - 2 nymphs, 70 male, and 47 female) and *Amblyomma naponense* (4.03% - 4 larvae and 1 nymph).

The majority of sampled ticks were collected from dogs belonging to the area A3 with 54.03% (67/124) of obtained specimens. From the total of samples, 19.35% (24/124) of ticks were collected in area A1; while in the area A6, 16.13% (20/124) of the ticks were obtained. In the areas A4 and A2 5.65% (7/124) and 4.84% (6/124) ticks were obtained, respectively. However, none ticks were found on the 30 examined dogs in area A5 (Table 1).

Among the 124 collected ticks in the studied areas, a total of 113 adult *A. ovale* ticks were submitted to molecular analysis and were assessed for rickettsial presence using conserved genes' targets, from which it was possible to detect the partial sequences of at least one of these three genes, being 17 partial sequences of the *gltA* gene (350 bp), 10 of the *htrA* gene (497 bp), 12 of the *ompA* gene (497 bp) from the areas A1 (7), A3 (7) and A6 (3). Partial sequences of three intergenic spacers (*mppA*-*purC*, *rpmE*-*tRNA^{fMet}*, 23S rRNA- 5S rRNA) were obtained for eleven samples (Table 3). For each one of the eleven samples at least two intergenic spacers markers were amplified. Amplification was detected as follows: 11 samples for *mppA*-*purC*, 11 samples for *rpmE*-*tRNA^{fMet}* and 9 samples for 23S rRNA- 5S rRNA (Table 3).

The sequence of the *gltA* gene fragment of samples of four ticks from area A1 (0104E, 0104I, 0105A and 0104N) and one samples from a tick in area A6 (0615) showed 100% identity to *Rickettsia belli* and *Rickettsia felis*, respectively. Ticks from three areas had amplified DNA sequences generated for the *gltA*, *ompA* and *htrA* genes with 100% identity to *R. parkeri* strain Atlantic Rainforest (CP040325).

The sequencing and phylogenetic analysis of the amplicons were performed for three protein-coding genes and three intergenic spacers. In the phylogenetic analysis, DNA sequences of each of the six molecular markers were concatenated for each isolated and aligned with sequences of rickettsial species deposited in the Genbank. The final alignment for protein-

coding genes with 42 rickettsial included 1345 nucleotides, while the final alignment for *ompA* and the intergenic spacers were obtained for the 29 rickettsial included 1201 nucleotides (Table 3). The 23S rRNA- 5S rRNA gene fragment yielded higher polymorphism than the *mppA-purC* and *rpmE*-tRNA^{fMet} gene, with 54 and 22 variable sites, respectively (Table 3). Haplotype and nucleotide diversity in *R. parkeri* isolated were high within all three analyzed tick populations.

According to the AMOVA results, only 11.85% of the variation could be attributed to the level between groups; At the level between the populations of the same group, this value is 85.95% of the molecular variation and at the intrapopulation level the value was 2.66% what demonstrates that all sampled *R. parkeri* in the three tick population shows a apparent gene flow (Table 4).

In the phylogenetic reconstruction for three protein-coding genes, these samples grouped with the same species of *Rickettsia* with which they had species identity by the BLASTN algorithm. The analysis for *ompA* and intergenic spacers, showed that the samples tested for the four markers formed a group within the *R. parkeri* strain Atlantic rainforest clade. Trees topology was generally the same for MP and ML analyses (Figure 3 e 4).

The territorial favorability analysis performed with a database comprised 45 specimens of *A. ovale*, including larvae, nymphs and adults, from 19 municipalities in the state of São Paulo. All *A. ovale* records in the state of São Paulo were from municipalities in the dense ombrophilous atlantic forest phyto-ecological region. From the initial 45 *A. ovale* geolocations, 17 were retained in the model. The model yielded an AUC of 0.855 and incorporated eleven environmental forecasting variables: minimum temperature of the coldest month (38.4%), elevation (30.6%), precipitation during the wettest month (18.9%).

Discussion

The description of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World provided genetic evidence that the isolates previously named Atlantic Forest strains, NOD and Parvitarsum, are in fact South American strains of *R. parkeri*. Moreover, each of these strains of *R. parkeri* seems to be associated with a specific group of tick species, namely, *R. parkeri* sensu stricto with the "*Amblyomma maculatum* group", *R. parkeri* strain NOD with *Amblyomma nodosum*, *R. parkeri* strain Parvitarsum with *Amblyomma parvitarsum*, and *R. parkeri* strain Atlantic Rain Forest with the "*Amblyomma ovale* group" (NIERI-BASTOS et al, 2018).

Specimens of *A. ovale* ticks, collected from dogs in the seacoast of the State of São Paulo, Brazil, were found infected with *R. parkeri* strain Atlantic Forest. Hence, domestic dogs are parasitized by *A. ovale* when they enter into Atlantic Rain Forest patches, these dogs may carry infected ticks into the household, it is suggested that the dog may play an important role in the cycle of the disease as a tick carrier (SZABÓ et al., 2013b). Furthermore, *R. felis* and *R. bellii* were also found infecting *A. ovale* ticks from two collecting sites, demonstrating the diversity of rickettsiae in circulation in the studied area.

The recent application of molecular techniques to rickettsiology has provided insightful information about its natural history and epidemiology, and to phylogenetically differentiation between rickettsiae (LABRUNA et al., 2003; FOURNIER et al., 2004; VITORINO et al., 2007; LABRUNA et al., 2014; NIERI-BASTOS et al., 2018). In the present study, the molecular characterization of the rickettsial samples through specific targets (*gltA*, *htrA* and *ompA*) in order to characterize the species of rickettsiae found in the studied areas, and polymorphic targets were used to describe the strains of *R. parkeri* found during the study. Thereby, we looked for subsequent analyzes using three intergenic spacers selected based on the previous description of genetic variability *R. parkeri* species or species phylogenetically related (FOURNIER et al., 2004, NIERI-BASTOS et al, 2018) The performed genetic analysis showed

no difference between two of the ISRs sequences: *rpmE* -tRNA^{fMet} and *mppA-purC*. On the other hand, the sequences of the region 23S rRNA-5S rRNA demonstrated a slightly different pattern in one of the samples of *R. parkeri* found in a infected ticks.

In the study conducted by Nieri-Bastos et al. (2018) it was demonstrated a subdivision of *R. parkeri* s.s., in one clade it was contained all North American isolates associated with *A. maculatum* ticks, and in another it was contained all *R. parkeri* s.s. isolates from South America region associated with *A. triste* tick (NIERI-BASTOS et al., 2018). It was suggested that this separation occurred due to a single indel at the 5' end of the partial *dnaA* sequence, this target gene was also analyzed by Weck et al. (2021), in this study the separation of this clade into two subgroups was not observed. In the present study the marker of the *dnaA* molecule was not used, but in the performed phylogenetic analysis the clade 1 did not separate into subgroups, which reinforces the explanation given by Weck et al. (2021).

In the present study, we tested the hypothesis that there might be significant genetic divergence between *R. parkeri* strains detected in ticks collected in areas geographically located apart at least 60 km distance from each other. Interestingly, the phylogenetic data generated in this study rejected this hypothesis. It was found that among the samples areas, *R. parkeri* presents low intrapopulation genetic diversity on a scale of 194.3 kilometers distance in a structural pathway between the collecting sites A1,A3 and A6, despite de distance between the farthest points A1 and A6, the results shows the absence of genetic differentiation among the analyzed samples of *R. parkeri*, what may suggest a presence of gene flow through the A1-A3-A6 areas, most likely through structural and functional ecological corridor pathway for *A. ovale* host that may carry ticks from one site to another.

The geographic and microenvironmental distribution of each vector species, and the abundance of animal hosts involved in the rickettsial cycle in nature are related to the epidemiology of the disease (SZABÓ et al., 2013). Bioclimatic factors can influence the

occurrence of *A. ovale* ticks in the Atlantic Forest biome in the state of São Paulo, and in the present study the following variables stand out with a significant contribution: minimum temperature of the coldest season, elevation, and precipitation during the wettest period of the year. According to the predictive geographic modeling for *A. ovale*, the results showed that the altitude is a negative contributing factor for the occurrence of the species, corroborating with the study by Barbieri et al, 2015, which clearly indicate the occurrence of *A. ovale* in regions of altitudes lower than 600 masl in the São Paulo State (BARBIERI et al, 2015).

In the study of Fournier et al. (2019) it was demonstrated a high gene flow in populations of *Amblyomma ovale* ticks found in different Atlantic rainforest locals, no genetic structure was found across the studied sites suggesting that there is a gene exchange among *A. ovale* tick population across a range of 45 km. According to present territorial favorability predictive modeling results, it was demonstrated that the occurrence of *A. ovale* along the sea coast is inserted in a structural and functional forest connection between areas A1-A3-A6 with almost 200 km of range (Figure 5).

Different from what is observed for several other specie of *Amblyomma* in the Atlantic Forest area, that in general uses birds as a primary host for subadult stages (OGRZEWALSKA et al. 2016; OGRZEWALSKA & PINTER, 2016), the species *A. ovale* is believed to use small rodents, in fact the lack of genetic isolation observed in the study by Fournier et al. (2019), among tick populations from different forest patches 45 km apart suggests that the host animal for *A. ovale* adult stage is the responsible to play the import role of carrying tick specimens from one area to another. Additionally, the following species of carnivores were recorded in the studied areas: *Eira barbara*, *Nasua nasua*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus* sp., *Puma concolor* and *Canis lupus familiaris* (FOURNIER et al., 2019). What is known so far is that, *A. ovale* ticks are likely brought to the edge of the forest by wild carnivores and rodents, and then use dogs as alternative hosts, without establishing distinct populations exploiting exclusively

domestic hosts (FOURNIER et al., 2019). The present study, using rickettsial DNA corroborates the conclusions of Fournier et al. (2019) made using tick DNA, furthermore, the present study shows that the tick inter-population gene flow may happen in a scale as far as 200 km.

An important result was the lack of evidence of ticks in area A5, since this area is an insular territory with no fiscal connection to the continent, further studies must be carried out to determine the real occurrence of *A. ovale* in this area.

The present study showed that the structural and functional connection between different sites in coastal areas may play an important role as a pathway and borne the genetic flow of tick populations and, consequently, rickettsiae. Future study on rickettsiae using more accurate genetic markers is needed to determine the structure on a finer scale between contiguous and isolated forest regions with or without the presence of a physical barrier, and with *R. parkeri* from *A. ovale* samples from places in a mega scale of distance, such as the Amazon forest and Pantanal regions of Brazil.

Funding

The article is part of the Master's thesis of the Postgraduate Program in Public Health of the University of São Paulo and supported by the scholarship program funded by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) process 130602/2019-1 and from the project grant FAPESP PDIP-SUCEN 2017/50345-5

Conflict of Interest Statement

The authors declare that the research was carried out without any commercial or financial relationships that could be interpreted as a potential conflict of interest.

Acknowledgments

We thank the Genomic Platform DNA Sequencing (Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia do Instituto Medicina Tropical/LIM-07) for support with sample sequencing; to Thiago Fernandes Martins for helped in identification ticks. Special thanks Luiz Eduardo Pereira Santos for revising the English grammar of this article.

Referências Bibliográficas

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

BARBIERI, JM. et al. Altitudinal assessment of *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), vectors of spotted fever group rickettsiosis in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 5, p. 1170-1174, 2015.

BARROS-BATTESTI, DM et al. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 2006.

BITENCOURTH, K. et al. Genetic diversity, population structure and rickettsias in *Amblyomma ovale* in areas of epidemiological interest for spotted fever in Brazil. **Medical and veterinary entomology**, v. 33, n. 2, p. 256-268, 2019.

BLANTON, LS. The Rickettsioses: A Practical Update. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 213-229, 2019.

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

CHIKEKA, I; DUMLER, JS. Neglected bacterial zoonoses. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 5, p. 404-415, 2015.

DA PAIXÃO SEVÁ, A. et al. A human case of spotted fever caused by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest and its association to the tick *Amblyomma ovale*. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2019.

FACCINI-MARTÍNEZ, AA. et al. Febre maculosa por *Rickettsia parkeri* no Brasil: Conduas de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 299-312, 2018.

FOURNIER, PE et al. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5757-5766, 2004.

FOURNIER, PE. & RAOULT, D. *Rickettsia*. **Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 1–43, 2019.

FOURNIER, Gislene FSR et al. A high gene flow in populations of *Amblyomma ovale* ticks found in distinct fragments of Brazilian Atlantic rainforest. **Experimental and Applied Acarology**, v. 77, n. 2, p. 215-228, 2019.

GOUY, M et al. Sea View version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2009.

GONZÁLEZ, N; ROMERO, J; ESPEJO, RT. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S–23S rRNA spacer region. **Journal of microbiological methods**, v. 55, n. 1, p. 91-97, 2003.

JADO, I et al. Molecular method for identification of Rickettsia species in clinical and environmental samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4572-4576, 2006.

KRAWCZAK, FS et al. Rickettsia sp. strain Atlantic rainforest infection in a patient from a spotted fever-endemic area in southern Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551-553, 2016.

LABRUNA, MB et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004.

LABRUNA, MB et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

MARTINS, Thiago F. et al. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 1, n. 2, p. 75-99, 2010.

MCLAIN, DK et al. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 32, n. 3, p. 353-360, 1995.

MOURA-MARTINIANO, NO et al. Rickettsia and vector biodiversity of spotted fever focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 498, 2014.

NIERI-BASTOS, FA. et al. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 84, n. 8, p. e02872-17, 2018.

OLIVEIRA, SV et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 22, 2016.

OGRZEWALSKA, M et al. Characterization of genetic variability and population structure of the Tick *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of medical entomology**, v. 53, n. 4, p. 843-850, 2016.

OGRZEWALSKA, M & PINTER, A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. 2016.

PINTER, A et al. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.

REGNERY, RL et al. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

ROUX, V et al. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 252-261, 1997.

SABATINI, GS et al. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010.

SILVA, N et al. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*, v. 17, n. 2, p. 275, 2011.

SPOLIDORIO, MG et al. "Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerging infectious diseases* vol. 16,3: 521-3, 2010.

STACKEBRANDT, E et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

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

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

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

VITORINO, L et al. Rickettsiae phylogeny: a multigenic approach. ***Microbiology***, v. 153, n. 1, p. 160-168, 2007.

Tables and legend of tables

Table 1. Species ticks identify in this study, with collection localities, host species and the number of ticks collected in São Paulo State's coastal areas, Brazil.

Area	Locality	Host	Nº Ticks collected	Species identify (Nº)
A1	Cubatão	30 dogs	24	<i>Amblyomma ovale</i> (7)
A2	Peruíbe	30 dogs	7	<i>Amblyomma ovale</i> (7)
A3	São Sebastião	31dogs	67	<i>Amblyomma ovale</i> (62) <i>Amblyomma naponense</i> (5)
A4	Cananéia	30 dogs	6	<i>Amblyomma ovale</i> (6)
A5	Ilhabela	30 dogs	0	---
A6	Ubatuba	noun count dogs	20	<i>Amblyomma ovale</i> (20)
total		151	124	

Table 2. Species of *Rickettsia* identify in this study in São Paulo State's coastal areas, Brazil.

Area	Nº ticks tested	Nº positives (%)	Species of <i>Rickettsia</i> (Nº)
A1	23	7 (30,43)	<i>R. parkeri</i> (7)
A2	6	0 (0)	---
A3	54	7 (12,96)	<i>Rickettsia parkeri</i> (3) <i>Rickettsia belli</i> (4)
A4	6	0 (0)	---
A5	---	---	---
A6	20	3 (15)	<i>Rickettsia parkeri</i> (2) <i>Rickettsia felis</i> (1)

Table 3. Number of used and concatenated sequences in intrapopulation genetic (*ompA* + intergenic spacers genes) of *Rickettsia parkeri* analyses.

Area	Number of sequences <i>ompA</i>	Number of sequences <i>mppA-purC</i>	Number of sequences <i>rpmE</i> -tRNA ^{fMet}	Number of sequences 23S RNA- 5S rRNA	Number of concatenated sequences
A1	3	3	3	3	3
A3	7	6	6	6	6
A6	2	2	2	-	1
Total	12	11	11	9	10

Table 4. AMOVA result, intra and inter-*Rickettsia parkeri* strains *ompA* and intergenic spacers.

Source of variation	d.f.	Sum of squares	Variance components	Percentage of variation
Among groups	3	28.262	0.49533 Va	11.85
Among populations within groups	4	62.167	3.57465 Vb	85.50
Within populations	27	3.000	0.11111 Vc	2.66
Total	34	93.429	4.18108	

Figures and legend of figures

Figure 1. Spatial distribution of dogs sampled in São Paulo State’s coastal areas, Brazil.

Figure 2. Phylogenetic tree of fragments of the *gltA*, *ompA*, *htrA* gene of *Rickettsia*, detected in *A. ovale* ticks collected in the São Paulo State's coastal areas, SP, Brazil, inferred by maximum likelihood analysis with GTR evolutionary model. The figures in the branches indicate values of statistical support ("70% cutoff").

Figure 3. Phylogenetic tree of fragments of the *ompA* gene and intergenic spacers of *Rickettsia parkeri*, detected in *A. ovale* ticks collected in the São Paulo State's coastal areas, SP, Brazil, inferred by maximum likelihood analysis with GTR evolutionary model. The figures in the branches indicate values of statistical support ("70% cut-off").

Figure 4. This is a representation of the Maxent model for *Amblyomma ovale*. Warmer colors show areas with better-predicted conditions, and reds dots show the presence locations in São Paulo State's coastal counties.

Figure 5. Demonstration of possible ecological corridors, according to the results of area modeling for the occurrence of *A. ovale* and identification of *R. parkeri* in the sampled areas (A1, A3 and A6)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que as conexões estrutural e funcional entre diferentes remanescentes florestais em áreas costeiras do Estado de São Paulo podem desempenhar um papel importante como corredor ecológico e suportar o fluxo genético de populações de carrapatos e, subsequentemente, de bactérias carreadas, tais como riquetsias. Estudos futuros sobre riquetsias usando marcadores genéticos com maior resolução são necessários para determinar a estrutura em uma escala mais fina entre regiões de floresta contíguas e isoladas com ou sem a presença de barreiras físicas, e comparadas com *R. parkeri* de amostras de carrapatos *A. ovale* provenientes de lugares com maior escala de distância, tais como a floresta amazônica e as regiões do Pantanal no Brasil.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDAD, MY et al. A Concise Review of the Epidemiology and Diagnostics of Rickettsioses: *Rickettsia* and *Orientia* spp. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 8, p. e01728-17, 2018.

AGUIRRE, AAR et al. New records of ticks- associated spotted fever group *Rickettsia* in Amazon-Savannah ecotone, Brazil. **Ticks Tick Borne Dis.**, 2018, 9 (4): 1038-44.

ANDREOTTI, R. et al. Museu do Carrapato da Embrapa Gado de Corte: espécimes de carrapatos descritos no Brasil e depositados na coleção até o momento. **Embrapa Gado de Corte-Documentos (INFOTECA-E)**, 2018.

ANGERAMI, R. N. et al. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. , v. 15, p. 207-208, 2009.

ANGERAMI, RN. et al. Febre Maculosa Brasileira e Outras Riquetsioses no Brasil, p.899-923. In: FOCACCIA, R. Tratado de Infectologia. 5. ed. rev. e atual. **Editora Atheneu**, 1488 f. São Paulo, 2015.

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

ARMITANO, RI et al. Fiebre manchada en Argentina. Descripción de dos casos clínicos. **Revista Argentina de Microbiología**, 2019.

BARBIERI, ARM et al. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 5, n. 6, p. 848-853, 2014.

BARBIERI, JM. et al. Altitudinal assessment of *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), vectors of spotted fever group rickettsiosis in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 52, n. 5, p. 1170-1174, 2015.

BARROS-BATTESTI, DM et al. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 2006.

BARROS-SILVA, PMR et al. Febre maculosa: uma análise epidemiológica dos registros do sistema de vigilância do Brasil. **Scientia Plena**, v. 10, n. 4 (A), 2014.

BITENCOURTH, K. et al. Genetic diversity, population structure and rickettsias in *Amblyomma ovale* in areas of epidemiological interest for spotted fever in Brazil. **Medical and veterinary entomology**, v. 33, n. 2, p. 256-268, 2019.

BLANTON, LS. The Rickettsioses: A Practical Update. **Infectious Disease Clinics**, v. 33, n. 1, p. 213-229, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. Febre maculosa brasileira e outras riquetsioses. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2015/fevereiro/06/guia-vigilancia-saude-atualizado-05-02-15.pdf>.

BUSH, AO. et al. Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. **The Journal of parasitology**, p. 575-583, 1997.

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

CHIKEKA, I; DUMLER, JS. Neglected bacterial zoonoses. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 21, n. 5, p. 404-415, 2015.

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

DANTAS-TORRES, F et al. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2019.

DA PAIXÃO SEVÁ, A. et al. A human case of spotted fever caused by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest and its association to the tick *Amblyomma ovale*. **Parasites & vectors**, v. 12, n. 1, p. 1-5, 2019.

FACCINI-MARTÍNEZ, AA. et al. Febre maculosa por *Rickettsia parkeri* no Brasil: Conduas de vigilância epidemiológica, diagnóstico e tratamento. **Journal of Health & Biological Sciences**, v. 6, n. 3, p. 299-312, 2018.

FOURNIER, PE et al. Use of highly variable intergenic spacer sequences for multispacer typing of *Rickettsia conorii* strains. **Journal of clinical microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5757-5766, 2004.

FOURNIER, PE. & RAOULT, D. *Rickettsia*. Bergey's **Manual of Systematics of Archaea and Bacteria**, 1–43, 2019.

GUGLIELMONE, AA et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental Applied Acarology**, n.40, p.83-100, 2006.

GOUY, M et al. Sea View version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 2, p. 221-224, 2009.

GONZÁLEZ, N; ROMERO, J; ESPEJO, RT. Comprehensive detection of bacterial populations by PCR amplification of the 16S–23S rRNA spacer region. **Journal of microbiological methods**, v. 55, n. 1, p. 91-97, 2003.

JADO, I et al. Molecular method for identification of *Rickettsia* species in clinical and environmental samples. **Journal of clinical microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4572-4576, 2006.

KRAWCZAK, FS et al. *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest infection in a patient from a spotted fever-endemic area in southern Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 95, n. 3, p. 551-553, 2016.

LABRUNA, MB et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p. 1073-1081, 2004.

LABRUNA, MB. et al. Ecology of rickettsia in South America. **Ann NY Acad Sci**, v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, MB et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

MANGOLD, AJ et al. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastrata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p. 478-484, 1998.

MARTINS, Thiago F. et al. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 1, n. 2, p. 75-99, 2010.

MCLAIN, DK et al. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 3, p. 353-360, 1995.

MEIRA, AM et al. Febre maculosa: dinâmica da doença, hospedeiros e vetores. ESALQ/USP. 2013.

MOERBECK, L et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) vector biodiversity in high altitude Atlantic forest fragments within a semiarid climate: a new endemic area of spotted-fever in Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 53, n. 6, p. 1458-1466, 2016.

MONJE, LD et al. Molecular detection of the human pathogenic *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in *Amblyomma dubitatum* ticks from Argentina. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 15, n. 2, p. 167-169, 2015.

MOURA, NO. Detecção e caracterização molecular de riquetsias em potenciais vetores procedentes de focos ativos de febre maculosa do Estado do Rio de Janeiro. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo. 2011.

MOURA-MARTINIANO, NO et al. *Rickettsia* and vector biodiversity of spotted fever focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 3, p. 498, 2014.

NAVA, S et al. Ticks of the southern cone of America: diagnosis, distribution, and hosts with taxonomy, ecology and sanitary importance. **Academic Press**, 2017.

NIERI-BASTOS, FA. et al. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 84, n. 8, p. e02872-17, 2018.

OLIVEIRA, SV et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 22, 2016a.

OLIVEIRA, SV et al. Vigilância de ambientes da febre maculosa: explorando as áreas silenciosas do Brasil. **Rev Pan-Amaz Saude**, v. 7, n. 3, p. 65-72. 2016b.

PAROLA, P; PADDOCK, CD.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

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

PINTER, A et al. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cadernos de saude publica**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.

PINTER A et al. Febre Maculosa Brasileira. **Bol. Epidemiol. Paulista**, 8, 1-30, 2011.

PINTER, A et al. A Febre maculosa brasileira na região Metropolitana de São Paulo. **Bol. Epidemiol. Paulista**, v. 13, p. 1-45, 2016.

REGNERY, RL et al. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

ROUX, V et al. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the rickettsiae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 47, n. 2, p. 252-261, 1997.

SABATINI, GS et al. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010.

SILVA, N et al. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 2, p. 275, 2011.

SILVEIRA, I et al. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111, 2007.

SPOLIDORIO, MG et al. "Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging infectious diseases** vol. 16,3: 521-3, 2010.

STACKEBRANDT, E et al. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, v. 52, n. 3, p. 1043-1047, 2002.

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

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

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

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

WOOD, H.; ARTSOB, H. Spotted fever group rickettsiae: a brief review and a Canadian perspective. **Zoonoses and Public Health**, v. 59, p. 65-79, 2012.

VITORINO, L et al. Rickettsiae phylogeny: a multigenic approach. **Microbiology**, v. 153, n. 1, p. 160-168, 2007.

ANEXO A - Ficha de coleta

DATA			CÓDIGO DO ANIMAL			
			ÁREA		Nº de coleta	

Nome do animal		Idade		Sexo	
----------------	--	-------	--	------	--

Tempo na área		<i>Rhipicephalus</i>		<i>Amblyomma</i>	
---------------	--	----------------------	--	------------------	--

Nome do proprietário	
----------------------	--

Endereço	
----------	--

E-mail (opcional)	
-------------------	--

Dados adicionais

ANEXO B – Ficha de consentimento do proprietário do animal

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
"SUCEN"

Eu, _____, proprietário/
responsável pelo animal _____, espécie canina, raça _____, sexo _____, autorizo aos técnicos da SUCEN coletar sangue do animal para uso em pesquisa científica soroepidemiológica.

Estou ciente que o procedimento de coleta de sangue será conduzido pelos técnicos da SUCEN, sendo que estes, primeiramente, farão a contenção física do animal, utilizando uma guia em volta do pescoço do cão, para evitar a fuga, e que o cão será amordaçado para evitar acidente por mordedura. O animal será contido por dois técnicos, um técnico irá proceder, com uma das mãos, o garrote em uma das patas dianteiras para então realizar a coleta de sangue venoso através da veia cefálica do animal, para tanto será utilizada seringa e agulha apropriada de acordo com o tamanho do cão. Serão colhidos entre 1 e 3 ml de sangue e após o procedimento, o técnico irá fazer pressão sobre a área, por um minuto, para evitar hemorragia. O animal será liberado logo após a coleta e poderá retornar às atividades normais, sem nenhuma restrição.

Após esclarecimentos prévios, estou ciente do uso do sangue e soro do animal em um projeto de pesquisa de soroepidemiologia, assim como a utilização de resultados de pesquisa obtidos pelo estudo com o animal em publicação de artigos científicos e divulgação em eventos científicos. Para fins de publicações e apresentações científicas, a identidade do proprietário deverá ser preservada.

Estou ciente que não serei gratificado monetariamente e que não receberei qualquer outro benefício pela participação na pesquisa.

Poderei receber maiores informações sobre esta pesquisa caso deseje, e também poderei esclarecer minhas dúvidas com o pesquisador responsável Adriano Pinter, através do email apin@sucen.sp.gov.br ou pelo telefone (11) 3311-1194.

Concordo em seguir corretamente todas as recomendações dos profissionais da SUCEN durante e após o procedimento com o animal. Os veterinários da SUCEN estão prontos a dar suporte em caso de complicações causadas pela contenção e coleta de sangue do animal.

Estou ciente que a coleta de sangue deve ser executada por um médico veterinário da equipe técnica da SUCEN, tendo sido nomeados responsável para esta tarefa: Adriano Pinter dos Santos (CRMV-SP 13687)

DATA: ____/____/____

Assinatura

ANEXO C – Comprovante de submissão do Artigo

Medical and Veterinary Entomology

Characterization of strains *Rickettsia parkeri* in an endemic area of the coastal of São Paulo, Brazil

Journal:	Medical and Veterinary Entomology
Manuscript ID	MVE-21-2440
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	28-May-2021
Complete List of Authors:	Albuquerque, Michellin; Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, Takeda, Gabriela; Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública Xavier, Daniele ; Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública Scinachi, Claudia; Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública Moura-Martiniano, Nicole; Instituto Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional em Vetores de Riquetsioses (LIRN) Pinter, Adriano; Universidade de São Paulo, Faculdade de Saúde Pública
Category:	Veterinary
Abstract:	Spotted Fever is an acute febrile infectious disease, with varying severity. In some regions of the Americas, a milder form of the disease is caused by the species <i>Rickettsia parkeri</i> , which is characterized by milder clinical manifestations. Currently, there are few epidemiological studies on the disease and its etiological agent. This work aims to better understand the epidemiology of the disease by conducting a transversal phylogenetic survey in different strains of <i>Rickettsia parkeri</i> of ticks and their dispersion in different endemic areas of the State of São Paulo. Tick collections were made in dogs, identification of tick species, and subsequent molecular detection, phylogenetic analysis, a study of inter and intraspecific genetic diversity of <i>R. parkeri</i> and geospatial and landscape comparison between the different sampling sites. These results contribute to a better understanding of the genetic distribution and flow between different strains of <i>R. parkeri</i> existing in these regions and helps to elucidate their frequency and distribution, and consequently, contributing to the knowledge of the epidemiology of mild spotted fever, which is still incipient.

SCHOLARONE™
Manuscripts

ANEXO D – Comprovante de artigo feito no período

Experimental and Applied Acarology

Eco-epidemiological analysis of *Rickettsia parkeri* in domestic dogs and *Amblyomma ovale* ticks in Maciço do Baturité region, Ceará State, Brazil –Manuscript Draft–

Manuscript Number:		
Full Title:	Eco-epidemiological analysis of <i>Rickettsia parkeri</i> in domestic dogs and <i>Amblyomma ovale</i> ticks in Maciço do Baturité region, Ceará State, Brazil	
Article Type:	Regular article	
Section/Category:	Ticks	
Keywords:	Eco-epidemiology, public health, serosurvey, spotted fever, tick-borne disease.	
Corresponding Author:	Michellin Pereira Albuquerque, Biomedical University of São Paulo Faculty of Public Health: Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública BRAZIL	
Corresponding Author Secondary Information:		
Corresponding Author's Institution:	University of São Paulo Faculty of Public Health: Universidade de São Paulo Faculdade de Saúde Pública	
Corresponding Author's Secondary Institution:		
First Author:	Michellin Pereira de Albuquerque, Biomedical	
First Author Secondary Information:		
Order of Authors:	Michellin Pereira de Albuquerque, Biomedical Adriano Pinter, Veterinary Daniele Rosa Xavier, Veterinary Gabriela Akemi Cardoso Gagliardi Takeda, Veterinary Ana Isabel Azeiteiro-Santos, Veterinary Thiago Fernandes Martins, Veterinary Maurício Claudio Horta, Veterinary	
Order of Authors Secondary Information:		
Funding Information:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (308668/2018-9)	Msc Michellin Pereira de Albuquerque
Abstract:	In Brazil, <i>Rickettsia parkeri</i> , a bioagent of a milder spotted fever (SF) in humans, is mainly transmitted by <i>Amblyomma ovale</i> (Ixodidae: ixodidae) Koch, 1844 in south, southeast and northeast regions of the country. Due to reported human cases of a milder SF from the Maciço do Baturité region of Ceará State, Northeast of Brazil, the present study aimed to evaluate the presence of <i>Rickettsia parkeri</i> in an Atlantic Rainforest fragmented area from the same region. Ticks and blood samples from 60 dogs were analyzed. From a total of 125 <i>A. ovale</i> ticks, three specimens yielded sequences for <i>glt A</i> , <i>omp A</i> and <i>htr A</i> . <i>R. parkeri</i> DNA. A total of 56.7% of the dogs had antibodies against <i>Rickettsia</i> sp. Risk of <i>Rickettsia</i> transmission was observed in the fragmented Atlantic Rainforest with a total of 29,732 ha of preserved area. The characteristic of the area allows semi-domiciled dogs, which have access to discontinuous forest fragments, to be commonly parasitized by <i>A. ovale</i> ticks, which may be transported into the houses, and, potentially, to be transferred and to transmit <i>R. parkeri</i> to humans.	

ANEXO E – Currículo *Lattes* (Orientador)

Adriano Pinter dos Santos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8887336916442663>

ID Lattes: 8887336916442663

Última atualização do currículo em 11/04/2021

Possui graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade de São Paulo (2000), mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses pela Universidade de São Paulo (2003) e doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses pela Universidade de São Paulo (2007). Atualmente é pesquisador científico V da Superintendência de Controle de Endemias. Tem experiência na área de Parasitologia, com ênfase em biotecnologia e epidemiologia da febre maculosa brasileira, atuando principalmente nos seguintes temas: *amblyomma cajennense*, *amblyomma aureolatum*, *ricettsia rickettsii*, biologia molecular e ecologia de doenças transmitidas por carrapatos (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Adriano Pinter dos Santos
Nome em citações bibliográficas	PINTER, ADRIANO; PINTER, A.; PINTÉR, ADRIANO
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/8887336916442663

Endereço

Endereço Profissional	Superintendência de Controle de Endemias, Superintendência, Departamento de Laboratórios Especializados. Av Paula Souza, 166 Centro 01027-000 - São Paulo, SP - Brasil Telefone: (11) 33111177 Fax: (11) 33111194 URL da Homepage: http://www.suden.sp.gov.br
------------------------------	--

Formação acadêmica/titulação

2003 - 2007	Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses (Concurso CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Aspectos ecológicos da Febre Maculosa em uma área endêmica do Estado de São Paulo., Ano de obtenção: 2007. Orientador: Marcelo Bahia Labruna. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: <i>Amblyomma aureolatum</i> ; dfo; Febre Maculosa; <i>ricettsia rickettsii</i> ; Mogi das Cruzes; Pyrglena. Grande Área: Ciências Biológicas Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Epidemiologia. Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública. Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas. Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses (Concurso CAPES 6). Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Aspectos epidemiológicos da febre maculosa em um área endêmica do município de Mogi das Cruzes (SP) e estudos em laboratório do ciclo de vida do vetor <i>Amblyomma aureolatum</i> (Acar: Ixodidae), Ano de Obtenção: 2003. Orientador: Marcelo Bahia Labruna. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil. Palavras-chave: <i>Amblyomma aureolatum</i> ; Febre Maculosa; <i>ricettsia rickettsii</i> ; Mogi das Cruzes; dfo; <i>ricettsia belli</i> . Grande Área: Ciências da Saúde Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública. Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores. Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas; Desenvolvimento Rural.
2001 - 2003	
1995 - 2000	

ANEXO F – Currículo *Lattes* (Mestranda)

Michellin Pereira de Albuquerque

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/3830169831672191>

ID Lattes: 3830169831672191

Última atualização do currículo em 11/02/2021

Bacharel em Biomedicina pela Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro (UNIRIO) (2016). Desenvolveu projetos de Sinalização de Dano DNA no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho (IBCCF/UFRJ). Atualmente é aluna de Mestrado no Programa de Pós Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo. Fez Especialização Lato sensu em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública, com ênfase em Zoonoses Virais e Rickettsioses, no Instituto Adolfo Lutz (IAL) e Especialização Lato sensu em Entomologia Médica no Instituto Oswaldo Cruz (IOC/FIOCRUZ). Tem experiência nas áreas de Biologia Molecular, Zoologia e Parasitologia (com ênfase em Entomologia e Acarologia Médica), Diagnóstico Sorológico, Etilógico e Molecular de Riquetsias. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Michellin Pereira de Albuquerque
Nome em citações bibliográficas	ALBUQUERQUE, M. P.
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/3830169831672191

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2019	Mestrado em andamento em Programa de Pós Graduação em Saúde Pública. Universidade de São Paulo, USP, Brasil. Título: Caracterização filogenética de cepas <i>Rickettsia parkeri</i> em área endêmica do Litoral Paulista. Orientador: Adriano Pinter. Coorientador: Nicole Oliveira Moura Martiniano. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2018 - 2019	Especialização em Vigilância Laboratorial em Saúde Pública. Instituto Adolfo Lutz, IAL, Brasil. Título: DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DA FEBRE MACULOSA: UMA BREVE REVISÃO SOBRE A SITUAÇÃO ATUAL E PERSPECTIVAS FUTURAS. Orientador: Fabiana Cristina Pereira dos Santos. Bolsista do(a): Secretaria Estadual de Saúde / São Paulo, SES/SP, Brasil.
2017 - 2019	Especialização em Entomologia Médica. (Carga Horária: 510h). Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Brasil. Título: Pesquisa e identificação molecular de <i>Rickettsia</i> spp. em carrapatos (Acarí: Ixodida) em área silenciosa para Febre Maculosa no bioma Mata Atlântica no Nordeste do Brasil. Orientador: Marlene Amorim.
2013 - 2016	Graduação em Biomedicina. Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, UNIRIO, Brasil. Título: Função do Domínio FHA na Estabilidade da proteína Tor1 de <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> . Orientador: Francisco Meirelles Bastos de Oliveira. Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.
2011 interrompida	Graduação interrompida em 2013 em Biomedicina. Universidade Castelo Branco, UCB/RJ, Brasil. Ano de interrupção: 2013
2008 - 2010	Ensino Médio (2º grau). Liceu Campo Grande - Mv1 Total, RJ, Brasil.