

ANA CAROLINA CASTRO SANTIAGO

**Alimentação artificial de *Ornithodoros* spp. (Acari: Argasidae),
e investigação da transmissão transestadial de *Anaplasma
marginale***

São Paulo

2020

ANA CAROLINA CASTRO SANTIAGO

**Alimentação artificial de *Ornithodoros* spp. (Acari: Argasidae),
e investigação da transmissão transestadial de *Anaplasma
marginale***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às
Zoonoses

Orientador:

Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti

De acordo: _____

Orientador

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4023
FMVZ

Santiago, Ana Carolina Castro

Alimentação artificial de *Ornithodoros* spp. (Acari: Argasidae), e investigação da transmissão transestadial de *Anaplasma marginale* / Ana Carolina Castro Santiago. – 2020. 96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2021.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Darci Moraes Barros Battesti.

1. *Ornithodoros* spp. 2. Alimentação artificial. 3. Transmissão transestadial. 4. *Anaplasma marginale*. I. Título.

Certificado CEUA



Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 29 de abril de 2020
CEUA N 9727130718

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Darci Moraes Barros Battesti
Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Título da proposta: "Alimentação artificial de *Ornithodoros* sp. (Acari: Argasidae), e investigação da transmissão transestadial de *Anaplasma marginale*".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 006169)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 31/março/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Devido a ausência de espécimes na coleta para o desenvolvimento do projeto intitulado "Aspectos biológicos do cruzamento de duas populações distintas de *Ornithodoros fonsecai* (Acari: Argasidae), em laboratório, e investigação da presença de patógenos e endossimbiontes", e como já enfatizado esse aspecto no momento da qualificação em novembro/2019 (qualificação enviada anteriormente como relatório parcial para o nº deste processo), foi sugerido e decidido pelos membros da própria banca e orientador a alteração do título do projeto a ser desenvolvido até o final do mestrado da aluna Ana Carolina, já que não haveria tempo suficiente para a realização de novas coletas da proposta inicial. É importante enfatizar que se alteraria apenas o título e alguns tópicos da metodologia, porém se manteria o uso de coelhos como hospedeiros e as demais características já autorizados nesse mesmo processo. Segue em anexo o novo projeto com o título atualizado e as demais alterações."

Comentário da CEUA: "Alteração de título aprovada."

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coodenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: Santiago, Ana Carolina Castro

Título: **Alimentação artificial de *Ornithodoros* spp. (Acari: Argasidae), e investigação da transmissão transestadial de *Anaplasma marginale***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico essa dissertação em especial ao meu pai, pois sei que onde quer que ele esteja, sinto a felicidade e o orgulho dele me guiando e dando forças para continuar nos momentos bons e ruins que passei durante essa trajetória. Para sempre sua Fifi. (In memoriam)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar à minha mãe, Ana Cristina, meu irmão, Nícolás Felipe e meus avós maternos, Edilde e Orlando, por sempre terem acreditado em mim, me incentivando a seguir, que em momento algum duvidaram da minha capacidade e jamais me abandonaram. Sou imensamente grata por tudo. Eu amo vocês.

À uma força maior que nos momentos ruins e sem saída recorri através de orações e direcionamento do melhor caminho a ser seguido.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Darci Moraes Barros Battesti, por toda ajuda, incentivos, as palavras que me renovavam e davam forças, puxões de orelha, ensinamentos, conversas, conselhos, por nunca deixar de acreditar na minha capacidade de concluir este trabalho. Meus sinceros agradecimentos.

À Leidiane Lima Duarte e Jaqueline Valeria Camargo pelo companheirismo, por todo apoio, conselhos, amizade, por compartilhar todas as aflições e angústias. Muito obrigada meninas, vocês foram essenciais para que tudo isso acontecesse.

À Prof^a Dr^a Rosângela Zacarias Machado e ao Prof. Dr. Marcos Rogério André por permitirem o desenvolvimento deste trabalho no laboratório, por todo conhecimento compartilhado, por me guiarem durante as etapas, pela ajuda e esclarecimentos. Sou profundamente grata.

À Giovanna Fernandes Ricciarelli pelas palavras de força, a amizade, ao apoio em momentos difíceis, a celebrar junto todas as minhas conquistas durante esse percurso e conselhos. Um profundo agradecimento por ser tão incrível e nunca deixar de acreditar em mim. Sua amizade é um diamante que encontrei.

À Ana Cláudia Calchi pela paciência, por todos os ensinamentos, toda ajuda, amizade e me inspirar tanto. Muito obrigada.

Ao meu companheiro João Verissiano, por ser presente, compartilhar angústias e momentos felizes e me dar força para enfrentar cada desafio, e a incrível família que ganhei durante essa etapa. Meus mais sinceros agradecimentos e respeito.

Aos demais amigos de laboratório: Lívia Perles, Mariele de Santi, Victória Valente, Maria Eduarda Furquim, Kayo Garcia, Karina Sonalio, Priscila Ikeda, Renan Amaral, Luíz Ricardo Gonçalves, Rafaela Beraldo, Laryssa Borges,

Matheus Santana, Anna Claudia Mongruel, Alinny, Alessandra Romero, Clara Morato, Thiago Merighi, Amanda Barbosa, pela ajuda, parceria e amizade.

Aos demais colegas e funcionários do Departamento de Patologia Veterinária por toda ajuda direta e indiretamente.

Às minhas amigas Nathália Passos Caputo e Cynthia Rosa, por serem tão verdadeiras e incentivo desde o início.

Aos meus amigos que estão comigo desde a graduação, em especial: Felipe Alberto Lei, Eduardo Ávila Guerra, Francisco Ozório, Leonardo Kielius, Murilo Marques, Rodrigo Bouzan e Zarife Bárbara. Mesmo distante, suas energias me inspiravam e me renovavam.

Às minhas companheiras de vida, Juliana Cuoco Badari e Mônica Peralli Broti, por sempre terem me incentivado, pelas profundas e sábias palavras em todos os momentos. Vocês me fazem forte a cada dia.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna por ceder os espécimes de *Ornithodoros fonsecai* utilizados neste estudo. Sem eles, seria inviável a realização dos experimentos. Muito obrigada.

À Coordenação do programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicadas às Zoonoses e a Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

SANTIAGO, A.C.C. **Alimentação artificial de *Ornithodoros* spp. (Acari: Argasidae), e investigação da transmissão transtadiária de *Anaplasma marginale***. 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Ornithodoros fonsecai é um carrapato argasídeo endêmico do Brasil, descrito do município de Bonito, no estado Mato Grosso do Sul. Posteriormente, alguns exemplares foram encontrados no município de Nobres, estado do Mato Grosso, e no município de Crateús, estado do Ceará. *Ornithodoros brasiliensis* é um carrapato também endêmico restrito do estado do Rio Grande do Sul. Ambas as espécies são agressivas para o homem, causando febre, dor e intensa resposta inflamatória no local da picada. O papel desses carrapatos como vetores de patógenos ainda é desconhecido, mas não deve ser descartado, uma vez que suas picadas causam lesões inflamatórias em humanos como já foi previamente reportado. *Anaplasma marginale* é uma bactéria gram-negativa, intracelular obrigatória parasita de eritrócitos causadora de anaplasmoses bovina. A diversidade genética desta bactéria vem sendo caracterizada com base na sequência das proteínas de superfície (MSPs) sendo possível identificar as diferentes estirpes geográficas de acordo com as diferenças nas sequências de aminoácidos. Para diminuir o uso de animais de laboratório, estudos têm avaliado a relação patógeno-hospedeiro e transmissão transtadiária utilizando alimentação artificial através de membranas. O presente estudo tem como objetivo geral alimentar artificialmente ninfas (N2 e N3) de *O. fonsecai* e *O. brasiliensis* utilizando sangue de bezerros naturalmente infectado com *A. marginale*, e sangue de coelhos experimentalmente infectados com a mesma bactéria a fim de verificar a capacidade de infecção desses carrapatos e a ocorrência da transmissão transtadiária do patógeno. Para o sistema de alimentação, membranas de parafilme e câmaras foram adaptadas. As ninfas foram pesadas e separadas em grupos para cada repetição do experimento. Esfregaços sanguíneos foram feitos a fim de verificar a presença de *A. marginale*. As amostras de sangue coletadas e os carrapatos, após a muda, foram submetidos à extração de DNA,

PCR convencional para seus respectivos genes endógenos, PCR em tempo real quantitativa para o gene *msp1β* e semi-nested PCR para o gene *msp1α*. Dentre as três alimentações artificiais de ninfas de *O. fonsecai* utilizando sangue de bezerros, apenas em uma foram obtidas ninfas positivas (28,5%) para *A. marginale*. Já as ninfas de *O. brasiliensis* alimentadas artificialmente submetidas apenas a uma alimentação, foram todas negativas para a bactéria. Ninfas de *O. fonsecai* e *O. brasiliensis* foram submetidas a quatro repetições de alimentação pela membrana utilizando sangue de coelhos. Vinte e cinco por cento das ninfas de *O. fonsecai* foram positivas na transmissão, enquanto 36,8% das ninfas de *O. brasiliensis* mostraram positividade para a bactéria. Conclui-se que as ninfas das espécies *O. fonsecai* e *O. brasiliensis* foram hábeis de se alimentarem artificialmente por membrana, usando sangue de bezerro e de coelho. Ambas as espécies se infectaram com *A. marginale* durante a alimentação artificial e foram capazes de transmitir o patógeno transestadialmente.

Palavras-chave: *Ornithodoros* spp., alimentação artificial, transmissão transestadial, *Anaplasma marginale*

ABSTRACT

SANTIAGO, A.C.C. **Artificial feeding of *Ornithodoros* spp. (Acari: Argasidae), and investigation of transstadial transmission of *Anaplasma marginale*.** 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Ornithodoros fonsecai is an argasid tick endemic to Brazil, described from municipality of Bonito, in the state of Mato Grosso do Sul. Later, some specimens were found in the municipality of Nobres, state of Mato Grosso, and municipality of Crateús, state of Ceará. *Ornithodoros brasiliensis* is a tick also endemic restricted to the state of Rio Grande do Sul. Both species are aggressive to humans, causing fever, pain and intense inflammatory response at the site of the bite. The role of these ticks as vectors of pathogens is still unknown, but it should not be ruled out, since their bites cause intense inflammatory lesions in humans as previously reported. *Anaplasma marginale* is a gram-negative, mandatory intracellular erythrocyte parasite that causes bovine anaplasmosis. The genetic diversity of this bacterium has been characterized based on the sequence of surface proteins (MSPs) and it is possible to identify the different geographical strains according to the differences in the amino acid sequences. To reduce the use of laboratory animals, studies evaluate the host-pathogen relationship and transstadial transmission using artificial feeding through membranes. The present study has the general objective of artificially feeding nymphs (N2 and N3) of *O. fonsecai* and *O. brasiliensis* using blood from calves naturally infected with *A. marginale*, and blood from rabbits experimentally infected with the same bacteria in order to verify the ability of these ticks to infect and the occurrence of transstadial transmission of the pathogen. For the feeding system, parafilm membranes and chambers were adapted. The nymphs were weighed and separated into groups for each repetition of the experiment. The blood samples collected and the ticks, after molting, were submitted to DNA extraction, conventional PCR for their respective endogenous genes, quantitative real-time PCR for the *msp1β* gene and semi-nested PCR for the *msp1α* gene. Among the three artificial feedings of *O. fonsecai* nymphs using blood from calves, only one was obtained positive

nymphs (28.5%) for *A. marginale*. The nymphs of *O. brasiliensis* fed artificially submitted to only one feeding, were all negative for the bacteria. Nymphs of *O. fonsecai* and *O. brasiliensis* were subjected to four repetitions of feeding through the membrane using blood from rabbits. Twenty-five percent of *O. fonsecai* nymphs were positive in transmission, while 36.8% of *O. brasiliensis* nymphs were positive for the bacterium. It was concluded that the nymphs of the species *O. fonsecai* and *O. brasiliensis* were able to feed artificially by membrane, using blood from calves and rabbits. Both species became infected with *A. marginale* during artificial feeding and were able to transmit the pathogen transstally.

Keywords: *Ornithodoros* spp., artificial feeding, transstadial transmission, *Anaplasma marginale*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - (A) Município de Nobres, localizado no estado do Mato Grosso e (B) Município de Bonito, localizado no estado do Mato Grosso do Sul, centro-oeste brasileiro	36
Figura 2 - Município de Ubajara, localizado no estado do Ceará, nordeste brasileiro	39
Figura 3 - Município de Buíque, localizado no estado de Pernambuco, nordeste brasileiro	39
Figura 4 - Município de São Francisco de Paula, localizado no estado do Rio Grande do sul, sul brasileiro.....	40
Figura 5 - Município de Jaboticabal, localizado no estado de São Paulo, sudeste brasileiro	41
Figura 6 - Coleta de sangue dos bezerros, Departamento de Bovinocultura, UNESP, Jaboticabal, São Paulo	42
Figura 7 - Sistema de alimentação	44
Figura 8 - Esquema do 1º experimento	45
Figura 9 - (A) Câmaras de contenção; (B) Câmara pronta com pelo de coelho e o sangue na parte inferior.....	47
Figura 10 - Sistema de alimentação	47
Figura 11 - Esquema do 2º experimento	48
Figura 12 - Esquema do 3º experimento	49
Figura 13 - (A) Preparação e lavagem da cepa de <i>Anaplasma marginale</i> ; (B) Pellet formado pós lavagem	50
Figura 14 - Esquema do 4º experimento	52
Figura 15 - (A) DMBB na Gruta de São Miguel, município de Bonito, Mato Grosso do Sul; (B) espécimes coletados	55
Figura 16 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene 16S rRNA mitocondrial das amostras representadas pelos números 1 e 2.....	56
Figura 17 - Cruzamento das populações de <i>Ornithodoros fonsecai</i>	57
Figura 18 - Peso e número de ovos das fêmeas de <i>Ornithodoros fonsecai</i> autogênicas de população do Ceará	60
Figura 19 - Peso e número de ovos das fêmeas de <i>Ornithodoros fonsecai</i> autogênicas de população de Pernambuco	60

Figura 20 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial das amostras representadas pelos números 1, 2 e 3	63
Figura 21 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial das amostras representadas pelos números 1 e 2	64
Figura 22 - (A, B) Eritrócitos do bezerro 1556 e (C, D) eritrócitos do bezerro 1560 infectados com <i>Anaplasma marginale</i> (setas indicando) corados com Giemsa, aumento de 1000x. Barras 10 µm.....	65
Figura 23 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial das amostras de <i>Ornithodoros fonsecai</i> representadas pelos números 1 e 2	67
Figura 24 - Banda amplificada de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial da amostra de <i>Ornithodoros brasiliensis</i> representada pelo número 1	67
Figura 25 - Eritrócitos infectados experimentalmente com <i>Anaplasma marginale</i> (setas indicando) provenientes do sangue de coelhos das quatro repetições (A, B, C e D, respectivamente) corados com Giemsa, aumento de 1000x. Barras 10 µm.....	70
Figura 26 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial; (A) <i>Ornithodoros fonsecai</i> (amostras 1 e 2) e (B) <i>Ornithodoros brasiliensis</i> (amostras 1, 2, 3 e 4)	71
Figura 27 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 de <i>Ornithodoros brasiliensis</i>	72
Figura 28 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial; (A) <i>Ornithodoros fonsecai</i> (amostras 1 e 2) e (B) <i>Ornithodoros brasiliensis</i> (amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6)	73
Figura 29 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial da amostra 1 de <i>Ornithodoros brasiliensis</i>	74
Figura 30 - Bandas amplificadas do gene <i>msh1α</i> das amostras 1 e 2 de <i>Ornithodoros fonsecai</i>	77
Figura 31 - Bandas amplificadas do gene <i>msh1α</i> da amostra 1 de <i>Ornithodoros fonsecai</i>	78
Figura 32 - (A) e (B) bandas amplificadas do gene <i>msh1α</i> das amostras de <i>Ornithodoros brasiliensis</i>	78

Figura 33 - Bandas amplificadas do gene *msp1α* da amostra 1 de *Ornithodoros brasiliensis*.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, sequências de sondas de hidrólise, genes direcionados usados em ensaios de PCR para cada agente pesquisado nas amostras	37
Tabela 2 - Peso pós muda das fêmeas de <i>Ornithodoros fonsecai</i> e período de pré-oviposição e oviposição das populações de Bonito, Ceará e Pernambuco.....	59
Tabela 3 - 1º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas de <i>Ornithodoros fonsecai</i> de cada grupo	63
Tabela 4 - 2º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas de <i>Ornithodoros fonsecai</i> cada grupo	64
Tabela 5 - 3º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas de <i>Ornithodoros fonsecai</i> de cada grupo	66
Tabela 6 - 3º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas de <i>Ornithodoros brasiliensis</i> de cada grupo	67
Tabela 7 - 4º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas dos grupos controle e experimentais da espécie <i>Ornithodoros fonsecai</i>	69
Tabela 8 - 4º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas dos grupos controle e experimentais da espécie <i>Ornithodoros brasiliensis</i>	69
Tabela 9 - Caracterização dos genótipos e estirpes das amostras positivas para o gene <i>msp1α</i> de <i>A. marginale</i> , com número do experimento, espécie do carrapato, amostra e estimativa da riquetsemia por qPCR absoluta, de acordo com o banco de dados do <i>RepeatAnalyzer</i>	79

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
2.	REVISÃO DE LITERATURA	21
2.1	Família Argasidae.....	23
2.2	<i>Ornithodoros fonsecai</i>	24
2.3	<i>Ornithodoros brasiliensis</i>	25
2.4	Autogenia	27
2.5	Alimentação artificial de argasídeos	27
2.6	Patógenos em carrapatos.....	28
2.6.1	Gênero <i>Anaplasma</i>	29
2.6.1.1	<i>Anaplasma marginale</i>	30
2.6.1.1.1	Diversidade genética de <i>A. marginale</i>	31
3.	OBJETIVOS	33
3.1	Geral.....	33
3.2	Específicos	34
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Obtenção das populações de <i>Ornithodoros fonsecai</i>).....	34
4.1.1	Reação de amplificação (gene 16S rRNA).....	35
4.1.2	Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados.....	36
4.1.3	Análise das sequências consenso baseadas no gene 16S rRNA...37	
4.2	Cruzamento das duas populações de <i>O. fonsecai</i> provenientes de Nobres, MT e de Bonito, MS	37
4.3	Doação de espécimes de outras populações de (<i>O. fonsecai</i>).....	37
4.4	Autogenia das populações	38
4.5	Colônia de <i>O. brasiliensis</i>	39
4.6	Utilização de coelhos como hospedeiros	39
4.7	Alimentação Artificial	40
4.7.1	1º experimento (<i>A. marginale</i>) - <i>O. fonsecai</i>	40
4.7.1.1	Reação de amplificação (gene <i>gapdh</i>).....	41
4.7.1.2	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	42
4.7.1.3	Nova coleta de sangue	42
4.7.1.4	Reação de amplificação (gene <i>gapdh</i>).....	42
4.7.1.5	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	42

4.7.1.6	Alimentação artificial dos carrapatos.....	43
4.7.1.7	Reação de amplificação (gene 16S rRNA).....	44
4.7.1.8	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	44
4.7.2	2º experimento (<i>A. marginale</i>) - <i>O. fonsecai</i>	44
4.7.2.1	Reação de amplificação (gene <i>gapdh</i>).....	45
4.7.2.2	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	45
4.7.2.3	Alimentação artificial dos carrapatos.....	45
4.7.2.4	Reação de amplificação (gene 16S rRNA).....	46
4.7.2.5	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	46
4.7.3	3º experimento (<i>A. marginale</i>) - <i>O. fonsecai</i> e <i>O. brasiliensis</i>	47
4.7.3.1	Avaliação de esfregaços sanguíneos corados	47
4.7.3.2	Reação de amplificação (gene <i>gapdh</i>).....	47
4.7.3.3	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	48
4.7.3.4	Alimentação artificial dos carrapatos.....	48
4.7.3.5	Reação de amplificação (gene 16S rRNA).....	48
4.7.3.6	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	48
4.7.4	4º experimento (<i>A. marginale</i>) - <i>O. fonsecai</i> e <i>O. brasiliensis</i>	49
4.7.4.1	Cepas de <i>A. marginale</i>	49
4.7.4.2	Avaliação das cepas e esfregaços corados	50
4.7.4.3	Reação de amplificação (gene <i>gapdh</i>).....	50
4.7.4.4	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	50
4.7.4.5	Alimentação artificial dos carrapatos.....	50
4.7.4.6	Reação de amplificação (gene 16S rRNA).....	50
4.7.4.7	Análise qualitativa para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1β</i>).....	51
4.8	Semi-nested PCR para <i>A. marginale</i> (gene <i>msp1α</i>).....	51
4.9	Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados	52
4.10	Análise das sequências consenso baseadas do gene <i>msp1α</i>	52
4.11	Classificação de genótipos de <i>A. marginale</i>	52
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
5.1	Populações de <i>O. fonsecai</i>	53
5.1.1	Gruta Lagoa Azul, Nobres, MT (População Nobres).....	53
5.1.1.1	Biologia da população de <i>O. fonsecai</i> de Nobres, MT (Santiago et al., 2019)	53
5.1.2	Gruta São Miguel, Bonito, MS (População Bonito)	54

5.1.2.1	Confirmação da identificação dos carrapatos	54
5.1.3	Cruzamento das populações de <i>O. fonsecai</i>	55
5.1.4	Doação de espécimes (<i>O. fonsecai</i>)	56
5.1.4.1	Gruta do Morcego Branco, Ubajara, CE (população Ceará)	56
5.1.4.2	Furna do Gato, Buíque, PE (população Pernambuco)	56
5.1.5	Autogenia das populações	57
5.1.5.1	População de <i>O. fonsecai</i> de Bonito	57
5.1.5.2	População de <i>O. fonsecai</i> do Ceará	58
5.1.5.3	População de <i>O. fonsecai</i> de Pernambuco	58
5.1.6	População de <i>O. brasiliensis</i>	61
5.2	Alimentação artificial.....	61
5.2.1	1º experimento (<i>A. marginale</i>) - <i>O. fonsecai</i>	61
5.2.2	2º experimento (<i>A. marginale</i>) - <i>O. fonsecai</i>	62
5.2.3	3º experimento (<i>A. marginale</i>) - <i>O. fonsecai</i> e <i>O. brasiliensis</i>	64
5.2.3.1	Espécie <i>O. fonsecai</i>	64
5.2.3.2	Espécie <i>O. brasiliensis</i>	65
5.2.4	4º experimento (<i>A. marginale</i>) - <i>O. fonsecai</i> e <i>O. brasiliensis</i>	67
5.2.4.1	Grupo controle	67
5.2.4.2	Alimentação artificial	68
5.2.4.2.1	1ª repetição	69
5.2.4.2.2	2ª repetição	70
5.2.4.2.3	3ª repetição	71
5.2.4.2.4	4ª repetição	72
5.3	Ensaio de cPCR para <i>A. marginale</i> baseados no gene <i>msp1α</i> e análise de identidade das sequências obtidas pela BLASTn	75
5.3.1	1º experimento	75
5.3.2	4º experimento	76
5.3.2.1	3ª repetição	76
5.3.2.2	4ª repetição	77
5.4	Classificação de genótipo de <i>A. marginale</i>	78
6.	CONCLUSÕES	78
7.	REFERÊNCIAS	80

1. INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes compreendidos na classe Arachnida, subclasse Acari e pertencentes à ordem Ixodida, que é composta por três famílias viventes: Nuttalliellidae que é monoespecífica, Ixodidae (carrapatos duros) e Argasidae (carrapatos moles) (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Membros dessas famílias são hematófagos cujos hospedeiros englobam uma vasta diversidade de animais vertebrados (anfíbios, répteis, aves e mamíferos), incluindo o homem (HOOGSTRAAL, 1985). Os carrapatos são importantes para a saúde pública e animal, pois podem transmitir agentes patogênicos, sendo apontados como o segundo grupo em importância zoonótica (SONENSHINE, 1991). Além disso, esses artrópodes causam injúrias aos hospedeiros durante a hematofagia (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Sendo assim, muitas espécies de carrapatos são mantidas e criadas em laboratórios para diversos fins de pesquisa, como taxonomia, ecologia, biologia, biotecnologia entre outros. Como são ectoparasitos hematófagos, os carrapatos necessitam de sangue para a realização de ecdise, produção e maturação dos ovos. Para manter colônias em condições laboratoriais é necessário adaptar as espécies à alimentação em animais convencionais de laboratório, como coelhos e roedores.

Vários métodos têm sido elaborados e testados para alimentar carrapatos artificialmente, com o intuito de substituir ou reduzir o número de animais de experimentação. No entanto, cada técnica tem pontos fortes e fracos e o método escolhido dependerá da questão abordada. Além disso, a influência de parâmetros relevantes para o processo de fixação e alimentação, tais como a biologia do carrapato, a composição da membrana e do anticoagulante usado, as condições ambientais e estímulos para a alimentação também devem ser levados em consideração na escolha do método. As técnicas de alimentação podem variar entre o uso de tubos capilares, membranas, artificiais ou derivadas de animais. Alguns estudos com carrapatos argasídeos já foram feitos com diversas espécies mantidas em laboratório (TARSHIS, 1958; MANGO E GALUN, 1977; HOKAMA et al., 1987; SCHWAN et al., 1991; BEN-YAKIR E GALUN, 1993; KIM et al., 2017). O anticoagulante utilizado também é de suma importância, e segundo estudos já realizados, a

heparina parece ser a mais adequada para a alimentação artificial de artrópodes (SCHWAN et al., 1991; BEN-YAKIR E GALUN, 1993; BRUNEAU et al., 2001; MONTES et al., 2002).

Uma das finalidades do uso da alimentação artificial é o estudo da interação vetor-hospedeiro uma vez que carrapatos fazem parte do ciclo natural de agentes causadores de doenças. Esses agentes podem ser transmitidos mecanicamente a qual a sequência de eventos é a ingestão de um patógeno de um hospedeiro vertebrado infectado, seu desenvolvimento nos tecidos do artrópode e sua eventual transmissão a um animal hospedeiro suscetível. O carrapato infectado por sua vez pode transmitir esse patógeno de um estágio para o outro, assim denominado de “transmissão transestadial”.

2. REVISÃO DE LITERATURA

Atualmente, a ordem Ixodida é composta por 966 espécies de carrapatos, a qual é dividida três famílias viventes: Ixodidae com 749 espécies, Argasidae com 216 espécies, Nuttalliellidae que é monoespecífica e está restrita à África do Sul e Tanzânia, representada pela espécie *Nuttalliella namaqua* Bedford, 1937. Há uma família fóssil, Deinocrotonidae, monoespecífica, representada pela espécie *Cornupalpatum burmanicum* (OLIVER, 1989; DANTAS-TORRES et al., 2019). Essa espécie foi descrita de espécimes encontrados em âmbar birmanês do Cretáceo (PEÑALVER et al., 2017).

2.1 Família Argasidae

A fauna de argasídeos é composta por cinco gêneros: *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis*, *Otobius* e *Ornithodoros*. Dentre as mais de 210 espécies válidas conhecidas mundialmente (DANTAS-TORRES, 2018; DANTAS-TORRES et al., 2019; SUN et al., 2019; MUÑOZ-LEAL et al., 2020), 94 ocorrem na região Neotropical (Caribe, Sul do México e América do Sul), e atualmente no Brasil são conhecidas 23 espécies (MUÑOZ-LEAL et al., 2019a; 2020). Esses carrapatos podem viver em diferentes ambientes como tocas, buracos, ninhos de aves, fendas nas rochas, solos soltos, cascas de árvores e cavernas, parasitando diferentes classes animais. Além disso, podem ser encontrados próximos ao homem e animais domésticos (nidícolas), habitando porões, teto,

estábulo, galinheiro, e camas rústicas. São abundantes em locais áridos e semi-áridos (ARAGÃO, 1936; VIAL, 2009; BRITES-NETO et al., 2015), mas algumas espécies são encontradas em ambientes muito úmidos parasitando anfíbios (BARROS-BATTESTI et al., 2015; MUÑOZ-LEAL et al., 2017). De forma geral, o ciclo biológico dos carrapatos argasídeos inclui: ovo, larva, dois a sete, raramente nove instares ninfais e adultos (VIAL, 2009). As fêmeas colocam vários lotes de ovos (em ciclos gonotróficos), e cada postura é normalmente precedida de repasto sanguíneo, e às vezes, de um novo acasalamento (HOOSTRAAL, 1985; VIAL, 2009; LANDULFO et al., 2012; RAMIREZ et al., 2016).

O gênero *Antricola* é composto por 17 espécies que vivem em cavernas muito quentes e úmidas da região Neotropical. No Brasil, são encontradas 3 espécies: *Antricola delacruzii* Estrada-Peña, Barros-Battesti & Venzal, 2004, *Antricola guglielmonei* Estrada-Peña, Barros-Battesti & Venzal, 2004 e *Antricola inexpectata* Estrada-Peña, Barros-Battesti & Venzal, 2004 (ESTRADA-PEÑA et al., 2004). Esses carrapatos na fase adulta possuem aparelho bucal não funcional e, portanto, não são parasitas. Porém, na fase larval e os primeiros instares ninfais são hematófagos (ESTRADA-PEÑA et al., 2008). Assim, tornam-se carrapatos autogênicos obrigatórios (BRITES-NETO et al., 2015; MUÑOZ-LEAL et al., 2016). Blomström et al. (2019) relataram uma alta diversidade de vírus através de uma investigação metagenômica em *A. delacruzii* na região amazônica ocidental do Brasil. Vários desses vírus apresentaram baixa similaridade de sequência genética com vírus já descritos, sugerindo a existência de várias espécies virais não identificadas. Esses achados certamente apontam para a necessidade de mais estudos para avaliar a diversidade de microrganismos que esses carrapatos podem carregar, bem como para investigar seu risco potencial para seus hospedeiros e, eventualmente, para humanos.

O gênero *Argas* inclui 62 espécies no mundo (BARBIER et al., 2020). Apenas uma espécie, *Argas miniatus* Koch, 1844, ocorre no Brasil. Comumente esse carrapato se alimenta do sangue de galinhas, perus, pombos e outras aves. Possui hábito noturno e ficam abrigados em ninhos de palha, fendas das paredes dos galinheiros ou sob a casca das árvores (BRITES-NETO et al., 2015). O ciclo biológico para as espécies do gênero inclui ovo, larva, 2 a 4

instares ninfais e adultos. As larvas podem se alimentar por diversos dias com exceção da espécie *Argas cucumerinus* Neumann, 1901 que se alimenta em minutos. Os outros estágios alimentam-se rapidamente (por alguns minutos), o que é comum aos carrapatos argasídeos (OLIVER, 1989).

O gênero *Nothoaspis* é composto por 3 espécies: *Nothoaspis redelli* Keirans & Clifford, 1975, *Nothoaspis amazoniensis* Nava, Venzal & Labruna, 2010 e *Nothoaspis setosus* Kohls, Clifford & Jones, 1969. A primeira espécie foi descrita das “Grutas de Xtacumbilxunam”, Campeche no México (KEIRANS E CLIFFORD, 1975). A segunda foi encontrada em duas cavernas localizadas dentro de florestas amazônicas no município de Porto Velho, e a última foi coletada entre fendas de rochas maciças no município de Monte Negro, ambas no estado de Rondônia, Brasil (NAVA et al., 2010; MUÑOZ-LEAL et al., 2019b).

Existem apenas duas espécies do gênero *Otobius* conhecidas no mundo, *Otobius megnini* (Dugès, 1883) e *Otobius lagophilus* Cooley & Kohls, 1940 (MUÑOZ-LEAL et al., 2016). Essas espécies possuem dois instares ninfais, e os adultos não se alimentam, sendo, portanto, autogênicos obrigatórios. Em geral parasitam orelhas de equinos, bovinos, ovinos, suínos, cães e até humanos. Larvas e todos os instares ninfais são hematófagos, e só abandonam o hospedeiro após atingirem o último instar ninfal. Os adultos vivem em abrigos como buracos de árvores onde ocorre a cópula e oviposição das fêmeas (BRITES-NETO et al., 2015). Embora *O. megnini* tenha sido relatado anteriormente no Brasil, esse carrapato foi retirado da lista da fauna de argasídeos devido à ausência de novos registros (DANTAS-TORRES et al., 2019).

O gênero *Ornithodoros* é o mais diversificado dentre os argasídeos com 132 representantes descritos no mundo (LABRUNA E VENZAL 2009; VIAL E CAMICAS, 2009; GUGLIELMONE et al., 2010; NAVA et al., 2010; 2013; DANTAS-TORRES et al., 2012; 2019; HEATH, 2012; VENZAL et al., 2012; 2013; 2015; TRAPE et al., 2013; BARROS-BATTESTI et al., 2015; LABRUNA et al., 2016; MUÑOZ-LEAL et al., 2017; BAKKES et al., 2018; SUN et al., 2019). Sessenta e duas espécies estão localizadas na região Neotropical (VENZAL et al., 2019; MUÑOZ-LEAL et al., 2020) e dessas, 18 estão distribuídas no Brasil. São elas: *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923; *Ornithodoros capensis* Neumann, 1901; *Ornithodoros cavernicolous* Dantas-

Torres, Venzal & Labruna, 2012; *Ornithodoros faccinii* Barros-Battesti, Landulfo & Luz, 2015; *Ornithodoros fonsecai* (LABRUNA E VENZAL, 2009); *Ornithodoros guaporensis* Nava, Venzal & Labruna, 2013; *Ornithodoros hasei* Schulze, 1935; *Ornithodoros kohlsi* Guglielmone & Keirans, 2002; *Ornithodoros marinkellei* Kohls, Clifford & Jones, 1969; *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969; *Ornithodoros peropteryx* Kohls, Clifford & Jones, 1969; *Ornithodoros rietcorreai* Labruna, Nava & Venzal, 2016; *Ornithodoros rondoniensis* Labruna, Terrassini, Camargo, Brandão, Ribeiro & Estrada-Peña, 2008; *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911; *Ornithodoros rudis* Karsh, 1880; *Ornithodoros saraivai* Muñoz-Leal & Labruna, 2017 e *Ornithodoros stageri* Cooley & Kohls, 1941 (DANTAS-TORRES et al., 2009; GUGLIELMONE et al., 2010; VENZAL et al., 2012; 2013; NAVA et al., 2013; MARTINS et al., 2014; BARROS-BATTESTI et al., 2015; LABRUNA et al., 2016; WOLF et al., 2016; MUÑOZ-LEAL et al., 2017; 2018a; DANTAS-TORRES et al., 2019). Recentemente, três espécies do gênero *Ornithodoros* foram excluídos da lista da fauna brasileira de carrapatos: *Ornithodoros jul*, *Ornithodoros nattereri* e *Ornithodoros talaje*. As duas primeiras nunca foram coletadas novamente depois de suas descrições, enquanto evidências atuais indicam fortemente que *O. talaje* não ocorre no Brasil. Assim, essa espécie também foi excluída (DANTAS-TORRES et al., 2019).

2.2 *Ornithodoros fonsecai*

Ornithodoros fonsecai é um carrapato argasídeo que parasita mamíferos da ordem Chiroptera, descrito de larvas coletadas sobre morcegos das espécies *Peropteryx macrotis* Wagner, 1843 e *Desmodus rotundus* E. Geoffroy, 1810, e de adultos coletados em fendas e paredes da caverna “São Miguel” localizada no município de Bonito, no estado Mato Grosso do Sul, habitada por esses hospedeiros (LABRUNA E VENZAL, 2009). Larvas, ninfas e adultos desta espécie foram posteriormente encontradas no Parque Estadual Gruta da Lagoa Azul, município de Nobres, estado do Mato Grosso (BARROS-BATTESTI et al., 2012). Luz et al. (2016) registraram a ocorrência de larvas desse carrapato parasitando morcegos das espécies *Carollia perspicillata* e *Trachops cirrhosus*, na Reserva Natural Serra das Almas (RPPN), município de Crateús, estado do Ceará. Pesquisadores que estiveram na caverna em

Nobres apresentaram intensas lesões inflamatórias no local da picada, semelhantes às aquelas relatadas por Labruna e Venzal (2009). Essa espécie pertence ao subgênero *Alectorobius* que inclui espécies parasitas de morcegos. Molecularmente, *O. fonsecai* é próxima a *Ornithodoros dyeri* Cooley & Kohls, 1940 e *O. rietcorraei* (MUÑOZ-LEAL et al., 2017). Morfologicamente as larvas de *O. fonsecai* assemelham-se às larvas de *Ornithodoros peruvianus* Kohls, Clifford & Jones, 1969 e *Ornithodoros pteropterox* (LABRUNA E VENZAL, 2009). O papel desses carrapatos na transmissão de patógenos é desconhecido. No entanto, algumas espécies da região neotropical, como *O. talaje* e *Ornithodoros puertoricensis* Fox, 1947, já foram associadas à transmissão da febre recorrente e da febre suína africana na América do Sul, respectivamente (HOOGSTRAAL, 1985; ENDRIS et al., 1992; LABRUNA E VENZAL, 2009). Um estudo feito por Parola et al. (2011) encontrou *Borrelia* spp. em fêmeas pertencentes ao grupo *O. talaje* na Bolívia. Recentemente foi constatada uma borrelia do grupo da febre recorrente em *O. rudis* (MUÑOZ-LEAL et al., 2018c) no estado do Maranhão. Desta maneira, embora o papel de *O. fonsecai* como transmissor de patógenos seja desconhecido, essa possibilidade não pode ser descartada uma vez que se trata de uma espécie agressiva aos humanos, e investigações sobre a presença de patógenos nesses carrapatos ainda não foi realizada.

2.3 *Ornithodoros brasiliensis*

O carrapato *Ornithodoros brasiliensis* (ARAGÃO, 1923) é argasídeo endêmico do Brasil frequentemente encontrado parasitando animais e humanos (MARTINS et al., 2011). Foi descrito pela primeira vez a partir de exemplares coletados no município de São Francisco de Paula, estado do Rio Grande do Sul (ARAGÃO, 1931). Após mais de 50 anos sem mais relatos, acreditava-se que essa espécie estava erradicada e potencialmente extinta na região. No entanto, em 2007, alguns espécimes foram identificados no mesmo município descrito originalmente, e casos de parasitismo humano foram observados (MARTINS et al., 2011). Mais tarde, um relato de caso foi publicado descrevendo achados clínicos compatíveis com a síndrome da intoxicação por carrapatos envolvendo um cão mordido por *O. brasiliensis* (RECK et al., 2011). Atualmente sua distribuição se restringe a mais dois

municípios do estado do Rio Grande do Sul: Jaquirana e Caxias do Sul (RECK et al., 2013; DALL'AGNOL et al., 2019).

Conhecido localmente como carrapato mouro ou “bicho mouro”, *O. brasiliensis* também é denominado “carrapato do solo” devido ao seu hábito de viver enterrado na areia perto de habitações hospedeiras, adegas, estábulos e até habitações humanas (EVANS et al., 2000; MARTINS et al., 2011). [Morfológica e molecularmente, adultos de *O. brasiliensis* estão intimamente relacionados a *Ornithodoros parkeri* Cooley, 1936; *Ornithodoros turicata* (Dugès, 1876); e *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 (BARROS-BATTESTI et al., 2012). Essas espécies pertencem ao subgênero *Pavlovskyella*, segundo Clifford et al. (1964), e têm ciclos de vida semelhantes com algumas diferenças, como o número de estágios ninfais, período de alimentação e ecdise sem alimentação (RAMIREZ et al., 2016).

Esta espécie é responsável por reações graves do hospedeiro em animais (RECK et al., 2011) e humanos, (RECK et al., 2013) como prurido local, lesões de cura lenta, edema e eritema locais, erupção cutânea focal, dor local, bolhas, edema de membros, mal-estar, dor de cabeça, febre transitória e dispneia (RECK et al., 2013). O parasitismo de *O. brasiliensis* está frequentemente associado a reações imediatas e graves à picada do carrapato (PINTO E DI PRIMIO, 1931; ARAGÃO, 1936; DI PRIMIO, 1937), que é um perfil clínico compatível com a definição de síndrome de intoxicação por carrapatos. Posteriormente, foi demonstrado que além dessa síndrome a ocorrência de *O. brasiliensis* pode estar associada à transmissão de patógenos, já que um microrganismo potencial transmitido por carrapatos (*Borrelia brasiliensis*) já se mostrou associado à ocorrência dessa espécie em condições de laboratório (DAVIS, 1952). Recentemente, em um estudo compilando os relatos de carrapatos em humanos entre 2004 e 2017 no estado do Rio Grande do Sul, foram registrados 4 casos de parasitismo humano, com esses carrapatos coletados diretamente das vítimas. Assim, essa espécie é importante para a saúde pública, dada a aparente alta taxa de casos humanos com lesões graves (DALL'AGNOL et al., 2019).

2.4 Autogenia

Autogenia é definida como a produção de ovos por fêmeas sem repasto sanguíneo no estágio adulto (OLIVER, 1989), e foi descrita em um estudo com *Culex pipiens molestus* (ROUBAUD, 1929). Existem poucos registros de autogenia em carrapatos em que estes são limitados apenas na família Argasidae, sendo facultativa ou obrigatória. Fatores ambientais como as condições favoráveis de umidade e temperatura podem definir a ocorrência da autogenia facultativa nas seguintes espécies de argasídeos: *Argas persicus* Oken, 1818 que se distribui na maioria dos países africanos, Austrália, China, Europa, Ásia, Oceania, Estados Unidos, Paraguai, Argentina e Chile (MUÑOZ-LEAL et al., 2018b); *Ornithodoros lahorensis* Neumann, 1908 distribuída na Europa, norte da África (CAMICAS et al., 1998) e em diversos países asiáticos (ESTRADA-PEÑA et al., 2017); *Ornithodoros tholozani* Laboulbène & Mégnin, 1882 encontrada na Rússia, Iraque, Síria, Ásia Central, Teerã (SHARMA, 1993), Europa e norte da África (CAMICAS et al., 1998); *Ornithodoros tartakovskyi* Olenov, 1931 que ocorre especificamente no Irã até oeste da China (TURELL, 2015) e *Ornithodoros parkeri* Cooley, 1936 que se distribui desde os Estados Unidos até o Caribe (BRITES-NETO et al., 2015). Os carrapatos autogênicos obrigatórios são dos gêneros *Antricola* e *Otobius* (ESTRADA-PEÑA et al., 2008). Segundo Oliver (1989) é possível que *Nothoaspis* também seja autogênico. Espécies desses gêneros, na fase adulta, possuem aparelho bucal não funcional, tornando indispensável a oviposição sem o repasto sanguíneo. Porém existem algumas exceções. Fêmeas de *O. lahorensis* são obrigatoriamente autogênicas em seu primeiro ciclo gonotrófico, mas é necessário o repasto sanguíneo prévio para as oviposições subsequentes (BALASHOV, 1972; POUND et al., 1984). Santiago et al. (2019) verificaram a ocorrência da autogenia facultativa na população de *O. fonsecai* proveniente de Nobres, Mato Grosso, sendo esse o primeiro registro desse comportamento em *Ornithodoros* no Brasil.

2.5 Alimentação artificial de argasídeos

Cada vez mais diferentes técnicas de alimentação artificial (ou alimentação in vitro) têm sido aplicadas em laboratório para uma ampla gama de artrópodes hematófagos a partir do trabalho pioneiro de Hindle e Merriman

(1912) e Rodhain et al. (1912) que estudaram a biologia, interações vetor-patógeno e manutenção de colônias. Essas técnicas usando membranas naturais ou artificiais oferecem relativa simplicidade e o potencial de reduzir ou evitar o uso de animais como cobaias na manutenção de colônias (BUTLER et al., 1984; SCHWAN et al., 1991). A maioria dos experimentos de alimentação artificial com carrapatos argasídeos utilizam variados tipos de sangue, anticoagulante, sendo em sua maioria o uso sangue desfibrinado, além de diversos aparatos de alimentação adaptados para cada espécie a ser estudada. Tarshis (1958) observou a alimentação de ninfas e adultos de *Ornithodoros savignyi* usando sangue humano com citrato e diferentes membranas derivadas de animais como coelho, rato, intestino de boi entre outros. Ninfas e adultos de *Ornithodoros moubata* já foram submetidas à alimentação utilizando membranas naturais (MANGO E GALUN, 1977) e artificiais como o parafilme (SCHWAN et al., 1991) com diferentes tipos de dieta e anticoagulantes. Esse último modelo de membrana foi usado por Hokama et al. (1987) ao alimentar ninfas e adultos de *Ornithodoros coriaceus*. Estudos com *O. turicata* verificaram o sucesso de alimentar artificialmente todos os estágios desse carrapato com membranas e anticoagulantes diversificados (BUTLER et al., 1984; ZHENG et al., 2015; KIM et al., 2017). Recentemente, Lewis et al. (2019) alimentaram adultos de *Ornithodoros tartakovskyi* utilizando sangue total desfibrinado de coelho ou cavalo.

2.6 Patógenos em carrapatos

Os carrapatos são vetores de infecções virais, bacterianas, riquetsiais e parasitárias, disseminando-se por meio de vias mecânicas e biológicas. Eles se encontram onde animais e humanos coexistem e, portanto, são considerados como problema de saúde pública em todo o mundo.

No ciclo natural de infecção de agentes de doenças transmitidas por artrópodes, a sequência de eventos é a ingestão de um patógeno de um hospedeiro vertebrado infectado, seu desenvolvimento nos tecidos do artrópode e sua eventual transmissão a um animal hospedeiro suscetível. "Transmissão transestadial" e "infecção transestadial" tem sido amplamente usadas para descrever não apenas a passagem, mas também o desenvolvimento de um patógeno de um estágio para o próximo

(BURGDORFER E VARMA, 1967). MacLeod (1961) sugeriu os termos transmissão "estágio a estágio" ou "ecdisial", se um patógeno é transportado ao longo de um estágio completo, isto é, através de duas ecdises; a maioria dos estágios intermediários pode não estar infectada.

Os carrapatos ixodídeos são mais conhecidos por serem os principais vetores de agentes patogênicos, como por exemplo de bactérias causadoras de riquetsioses e borreliososes. Em relação aos carrapatos argasídeos, poucos são os estudos correlacionando esses patógenos comparando aos ixodídeos, porém aqueles realizados demonstram que esses carrapatos também possuem importância epidemiológica. Burgdorfer e Varma (1967) demonstraram que uma variedade de carrapatos ixodídeos e argasídeos incriminados como vetores naturais ou potenciais de febre maculosa mantêm as rickettsias transestadialmente e as transmite através dos ovos até os descendentes. Algumas espécies de carrapatos do gênero *Ornithodoros* são conhecidas como vetores de agentes causadores da Febre Recorrente e de outras borreliososes para humanos (HOOGSTRAAL, 1985; LAFRI et al., 2017). Segundo esses autores, além das borreliososes, os carrapatos argasídeos transmitem microrganismos causadores de riquetsioses e arboviroses. Lane e Manweiler (1988) avaliaram a eficiência da transmissão transovariana e transestadial para manutenção e distribuição da espiroqueta *Borrelia coriaceae* em populações de *Ornithodoros coriaceus*, para determinar a sensibilidade dos testes de hemolinfa e líquido coxal na detecção dessas bactérias em ninfas e adultos, e para verificar a distribuição de *B. coriaceae* após a passagem transestadial e nas fêmeas após a oviposição.

2.6.1 Gênero *Anaplasma*

Bactérias do gênero *Anaplasma* são Gram negativas intracelulares obrigatórias de eritrócitos pertencentes à família Anaplasmataceae (KOCAN et al., 2010). Com base em análises moleculares, Dumler et al. (2001) reclassificaram a família Anaplasmataceae em quatro grupos geneticamente distintos: *Anaplasma*, *Ehrlichia*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*. Em 2004, um quinto gênero foi reconhecido para a família Anaplasmataceae, "*Candidatus* Neoehrlichia", sendo caracterizado molecularmente a partir de carrapatos do gênero *Ixodes* (Ixodidae). A bactéria foi isolada de ratos marrons capturados no

Japão e de outros hospedeiros vertebrados (KAWAHARA et al., 2004; MÜLLER et al., 2018), incluindo humanos (LI et al., 2012; MUÑOZ-LEAL et al., 2019c, ONDRUS et al., 2020). O gênero *Anaplasma* está distribuído mundialmente e apresenta grande importância para a saúde pública e veterinária por conter agentes causadores de doenças que acometem animais domésticos, e selvagens, bem como humanos (LAFRI et al., 2017). Entre os agentes etiológicos estão *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Anaplasma ovis*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Anaplasma platys* (DUMLER et al., 2001; RAR E GOLOVLJOVA, 2011). As principais doenças conhecidas por esses patógenos são a anaplasmoze granulocítica humana, causada por *A. phagocytophilum* (WOLDEHIWET et al., 2010) e a anaplasmoze bovina causada pela bactéria *A. marginale*, essa última é responsável por muitas perdas econômicas. A transmissão destas bactérias é feita por carrapatos da família Ixodidae, que são os principais vetores biológicos, infectando o hospedeiro via saliva durante a repasto sanguíneo (KOCAN et al., 2004; KERSTERS et al., 2006). Em carrapatos argasídeos, pouco é conhecido sobre a infecção por *Anaplasma*, contudo, achados feitos por Lafri et al. (2017) representam o primeiro relato de infecção de *Anaplasma* em argasídeos mais especificamente em *Argas persicus*, na Argélia, África. Porém, devido à falta de DNA, segundo esses autores, não foi possível amplificar e sequenciar outros fragmentos dos genes para melhor caracterizar genótipos.

2.6.1.1 *Anaplasma marginale*

Anaplasma marginale é intraeritrocitária obrigatória, sendo o agente causador da anaplasmoze bovina causando perdas econômicas significativas para as indústrias pecuárias, e está sendo cada vez mais detectada em outras espécies animais (KOCAN et al., 2010; DA SILVA et al., 2018). Essa bactéria faz parte do complexo de enfermidades chamada de Tristeza Parasitária Bovina (TPB), que ainda conta com protozoários como a *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* (FONSECA E BRAGA, 1924; MASSARD E FREIRE, 1985). Essa doença é dificilmente controlada devido a diversidade de estirpes de *A. marginale*.

A transmissão dessa bactéria para o hospedeiro pode ocorrer de quatro maneiras: de forma biológica realizada através de um carrapato, mecânica por meio de moscas hematófagas, por via transplacentária ou ainda por instrumentos contaminados como agulhas, seringas entre outros. Já no carrapato, esse patógeno pode ser transmitido de estágio para estágio (interestadial ou transestadial) ou dentro de um mesmo estágio (intraestadial). Até o presente momento, não foi observada a transmissão transovariana (STICH et al., 1989; KOCAN et al., 2010). A infecção consiste no momento do repasto sanguíneo do carrapato no hospedeiro e há a ingestão dos eritrócitos parasitados pela bactéria. Dentro do vetor (carrapato), *A. marginale* se instala nas células intestinais, onde se desenvolve mudando da forma vegetativa (corpúsculos reticulados) para a forma infectante (corpúsculos densos) e, em seguida, migra para outros tecidos, como a glândula salivar. Na glândula salivar do carrapato a bactéria forma colônias que podem conter centenas de organismos, que se reproduzem por divisão binária. A bactéria é capaz de sobreviver fora das células do hospedeiro por um determinado tempo até ser ingerida novamente pelo carrapato, reiniciando o ciclo (KOCAN et al., 2010). Já foram descritas pelo menos 20 espécies de carrapatos ixodídeos como vetores dessa bactéria, todas dentro dos gêneros *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, ambos distribuídos em todo o mundo (KOCAN et al., 2010). Nenhum estudo sobre *A. marginale* infectando carrapatos argasídeos foi encontrado até o momento.

2.6.1.1.1 Diversidade genética de *A. marginale*

A diversidade genética dessa bactéria vem sendo caracterizada com base na sequência das proteínas de superfície (MSPs), constituindo-se o principal foco para o desenvolvimento de vacinas (PALMER et al., 1999). São seis as principais proteínas de superfície (MSP1 α , MSP1 β , MSP2, MSP3, MSP4 e MSP5) que foram identificadas em isolados de *A. marginale* derivados de eritrócitos bovinos e de tecidos de carrapatos. Presentes na superfície da bactéria, essas proteínas são facilmente acessíveis ao sistema imune do hospedeiro, desempenhando importantes funções para a sobrevivência do parasita (ARULKANTHAN et al., 1999). Elas estão envolvidas nas interações da bactéria com seus hospedeiros vertebrados e invertebrados (DE LA FUENTE et al., 2001; 2003; 2005; KOCAN et al., 2003; 2004; BRAYTON et al.,

2005; KOCAN et al., 2010). A proteína MSP1 α demonstrou ser uma adesina para eritrócitos bovinos e células do carrapato vetor. É no complexo N-terminal dessa proteína que se encontra o domínio de adesão, que é indispensável para a invasão de células hospedeiras e transmissão de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2001). Encontrada em todos os representantes do gênero *Anaplasma*, a proteína MSP2 é codificada por grandes famílias multigênicas polimórficas (PALMER et al., 1998; BRAYTON et al., 2005). As variações antigênicas desta proteína ocorrem durante as infecções contínuas da bactéria, tanto em carrapatos quanto em bovinos (DE LA FUENTE et al., 2001; BRAYTON et al., 2005), desta forma o patógeno consegue enganar o sistema imune do hospedeiro e manter a persistência da infecção (BATTILANI et al., 2017). É possível identificar as diferentes estirpes geográficas de acordo com as diferenças nas sequências de moléculas e aminoácidos a partir da proteína MSP1 α (DE LA FUENTE et al., 2007). Enquanto o C-terminal da proteína é altamente conservado, os N-terminais são altamente variáveis, com o número e a sequência de aminoácidos constantes para uma determinada estirpe de *A. marginale* (DE LA FUENTE et al., 2001; PALMER et al., 2001; ESTRADA-PEÑA et al., 2009). Estudos feitos por Ferreira et al. (2001), Vidotto et al. (2006), de la Fuente et al. (2005), Pohl et al. (2013) e Silva et al. (2015) descreveram a diversidade genética de *A. marginale* baseada nas repetições em tandem da MSP1 α . As análises destas repetições em tandem resultaram em diferentes genótipos, nomeados A, B, C, D, E, F, G H e I, seguindo o modelo proposto por Estrada-Peña et al. (2009) onde um microssatélite é localizado na MSP1 α a 5' UTR entre a sequência putativa de Shine-Dalgarno (GTAGG) e o códon de iniciação da tradução (ATG).

O software *RepeatAnalyzer* foi desenvolvido por Catanese et al. (2016), que desempenha diversas funções. Uma delas é analisar e identificar sequências curtas repetidas, as *tandem repeats*, as quais o programa chama de SSRs. Este programa possui uma base de dados sobre todas as repetições e genótipos de *A. marginale*, assim como os locais onde foram encontradas e os trabalhos às quais pertencem. Sendo assim, o software também pode indicar onde as SSRs já foram relatadas ou se é a primeira vez que tal repetição é identificada pelo programa. Além disto, outras análises também são fornecidas, como o número de aminoácidos contidos nas sequências

depositadas, índices de repetições únicas, assim como a sua distribuição na região específica e mapas geográficos com a distribuição dos genótipos, a análise de diversidade genética de determinada região (CATANESE et al., 2016).

Diversas cepas de *A. marginale* já foram identificadas ao redor do mundo, que se diferem em sua morfologia, características antigênicas e sua capacidade de ser transmitida por carrapatos (SMITH et al., 1986; DE LA FUENTE et al., 2001; KOCAN et al., 2004; CABEZAS-CRUZ et al., 2013). Portanto, é importante conhecer cada uma delas para os estudos de epidemiologia e de estratégias de controle (CABEZAS-CRUZ E DE LA FUENTE, 2015; JAIMES-DUEÑEZ et al., 2018). Diferentes estirpes estão associadas a casos de surtos de anaplasrose no Brasil, sendo constantemente encontradas em rebanhos, como no estado de São Paulo e Goiás (MACHADO et al., 2015). Mundialmente, estirpes como a $\alpha\text{-}\beta^3\text{-}\Gamma$ e a $\Gamma\text{-}10\text{-}15$, por exemplo, já foram descritas em surtos ocorridos no México (ALMAZÁN et al., 2008) e Argentina (RUYBAL et al., 2009). Palmer et al. (2001) descreveram uma infecção persistente de *A. marginale* em rebanhos de bovinos amostrados nos Estados Unidos, os quais não apresentaram sinais clínicos da doença fazendo com que os animais desempenhassem o papel de reservatórios da bactéria, disseminando-a para carrapatos da área e contribuindo para a circulação das estirpes na região. Recentemente, um estudo feito por Souza-Ramos et al. (2019) identificou, através de ensaios de PCR baseados no gene *msp1 α* , quatorze estirpes circulantes em bezerros e vacas localizadas em diferentes fazendas no Pantanal do estado do Mato Grosso do Sul. Dentre estas, oito estirpes eram novas, não sendo relatadas na literatura anteriormente, são elas $\Gamma\text{-}10\text{-}13\text{-}13\text{-}18$; $\Gamma\text{-}27\text{-}18$; $\text{EV8}\text{-}\text{EV8}\text{-}17$; $\alpha\text{-}\beta\text{-}\beta\text{-}100$; $\text{EV7}\text{-}11\text{-}10\text{-}15$; $\Gamma\text{-}11\text{-}11\text{-}27\text{-}18$; $\Gamma\text{-}11\text{-}10\text{-}15$; $\Gamma\text{-}27\text{-}13\text{-}18$, mostrando uma alta diversidade de estirpes na região estudada.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Alimentar artificialmente ninfas das espécies *Ornithodoros fonsecai* e *Ornithodoros brasiliensis* com sangue de bovinos naturalmente infectados com *A. marginale* e de coelhos infectado experimentalmente com a cepa

Jaboticabal de *A. marginale*, para verificar a possibilidade de infecção nesses argasídeos.

3.2 Específicos

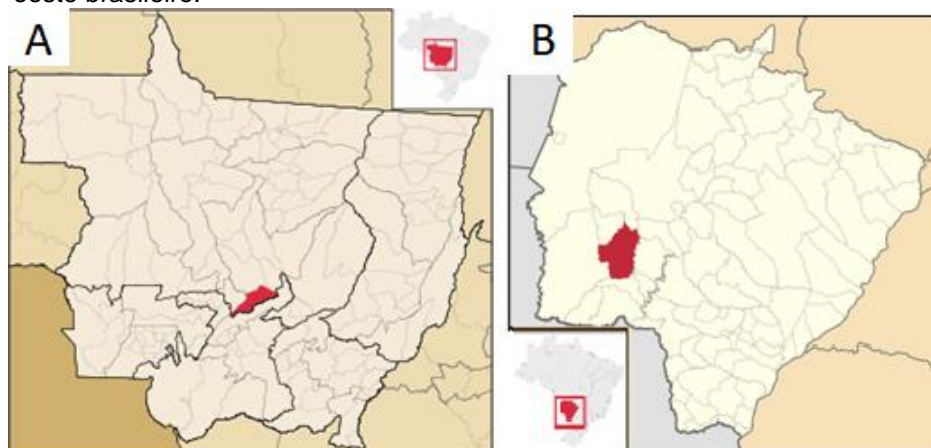
- Observar a ocorrência de autogenia na espécie *O. fonsecai* das diferentes populações (Bonito, Ceará e Pernambuco) mantidas em laboratório;
- Verificar os parâmetros como ganho de peso, tempo de muda e taxa de mortalidade das ninfas alimentadas artificialmente e ninfas alimentadas no hospedeiro;
- Averiguar se há a transmissão transestadial de *A. marginale* nas ninfas alimentadas artificialmente;
- Comparar as técnicas de alimentação artificial utilizando sangue de bezerros infectados naturalmente com *A. marginale* e de alimentação artificial com sangue de coelhos infectados experimentalmente com a cepa Jaboticabal de *A. marginale*;
- Identificar as estirpes e os genótipos de *A. marginale* nos indivíduos positivos após a muda por meio da análise das *tandem repeats* do gene *msp1α* e determinar a carga parasitária por qPCR para o gene *msp1β*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das populações de *Ornithodoros fonsecai*

Mediante a autorização concedida pela Secretaria de Meio Ambiente (SEMA) do estado do Mato Grosso sob o processo número 29368/2019, em março de 2019 foi feita a coleta na caverna “Gruta Lagoa Azul” localizada a 80 km do município de Nobres (14° 43’ 13” S, 56° 19’ 45” W) (**Figura 1**). A coleta na Gruta “São Miguel” (21° 06’ 31” S, 56° 34’ 44” W) localizada no município de Bonito, estado do Mato Grosso do Sul (**Figura 1**) foi realizada em novembro de 2019 sob o processo número 71/402627/2019 pelo Instituto de Meio Ambiente de Mato Grosso do Sul (IMASUL). A autorização para atividades com finalidade científica pelo Instituto Chico Mendes de Conservação de Biodiversidade (ICMBio) foi concedida sob o número 64351-2. Os espécimes coletados foram mantidos em laboratório em uma incubadora de demanda biológica de oxigênio (BOD) a 25°C ± 1 °C e umidade relativa de 90% ± 10%.

Figura 1 – (A) Município de Nobres, localizado no estado do Mato Grosso e (B) Município de Bonito, localizado no estado do Mato Grosso do Sul, centro-oeste brasileiro.



Fonte: Google Imagens (2020).

Após obter a autorização da Secretaria de Meio Ambiente do estado do Mato Grosso (SEMA), foi realizada uma visita para obtenção de novos indivíduos na “Gruta da Lagoa Azul” no município de Nobres, MT, porém nenhum espécime foi encontrado. A área futuramente será um ponto turístico por isso suspeita-se de que foi passado veneno para afastar os morcegos ali presentes.

Os indivíduos dessa população utilizados no presente estudo são provenientes da colônia de *O. fonsecai* já estudada e mantida no Laboratório de Parasitologia no Instituto Butantan a partir de coletas feitas por DMBB em 2012, provenientes dessa mesma caverna. Esses carrapatos (4 ninfas, 2 machos e 4 fêmeas) foram trazidos para a UNESP de Jaboticabal, e estão sob a responsabilidade de DMBB (orientadora).

4.1.1 Reação de amplificação (gene 16S rRNA)

A identidade dos carrapatos coletados foi confirmada utilizando um ensaio de PCR convencional com base no gene endógeno 16S rRNA mitocondrial (BLACK E PIESMAN, 1994). Para isso, foi extraído individualmente o DNA dos espécimes coletados usando o kit de extração de tecido DNeasy (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

Foi preparada uma mistura de 5 μ L do DNA extraído, 2,5 μ L de tampão de PCR 10X (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 2 μ L de

desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 0,75 µL de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 0,5 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, WI, EUA) q.s.p. 25 µL. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritas na **Tabela 1**. As amplificações foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de 92°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e meio, seguido de 32 ciclos 92°C por 1 minuto, 54°C por 35 segundos, 72°C por 1 minuto e meio e extensão final de 72°C por 7 minutos.

Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta usando o Image Lab Software versão 4.1 (Bio-Rad®).

Tabela 1- Sequências de oligonucleotídeos iniciadores, sequências de sondas de hidrólise, genes direcionados usados em ensaios de PCR para cada agente pesquisado nas amostras.

Agentes	Tipo PCR	Gene alvo	Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores (5'-3')	Referência
Endógeno carrapato	cPCR	16S rRNA	16S-1: CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT 16S+1: CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG	Black e Piesman, 1994
Endógeno mamífero	cPCR	<i>gapdh</i>	GAPDH-F: CCTTCATTGACCTCAACTACAT GAPDH-R: CCAAAGTTGTCATGGATGACC	Birkenheuer et al., 2003
<i>Anaplasma marginale</i>	qPCR	<i>msp1β</i>	AM-F: TTGGCAAGGCAGCAGCTT AM-R: TTCCGCGAGCATGTTGCAT sonda: 6FAM-TCGGTCTAACATCTCCAGGCTTTCAT-BHQ1	Carelli et al., 2007
<i>Anaplasma marginale</i>	Semi-nested PCR	<i>msp1α</i>	F1: GTGCTTATGGCAGACATTTCC Re: CTCAACACTCGCAACCTTGG (1° e 2° round) msp1αNF: CGCATTACACGTTCCGTATG	Castañeda-Ortiz et al., 2015

4.1.2 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

Os produtos de PCR baseados no gene 16S rRNA obtidos pela PCR convencional foram purificados utilizando-se o kit “ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent” (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante. O sequenciamento dos produtos amplificados foi realizado por meio de técnica automatizada baseada no método de terminação

de cadeia por dideoxinucleotídeos (SANGER et al., 1977) no sequenciador ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA). As reações de sequenciamento foram feitas utilizando o BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit conduzidas no Centro de Pesquisa sobre o Genoma Humano e Células-Tronco localizado no Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo.

4.1.3 Análise das sequências Consenso baseadas no gene 16S rRNA

As sequências de nucleotídeos provenientes do sequenciamento foram inseridas no programa Phred Phrap (EWING et al., 1998) para triagem e avaliação da qualidade dos eletroferogramas. Bases com qualidade acima de 20 foram consideradas confiáveis. Também no mesmo programa foram geradas as sequências Consenso. As sequências geradas foram submetidas ao programa BLASTn (ALTSCHUL et al., 1990) para determinar as semelhanças mais próximas com as sequências de 16S rRNA correspondentes disponíveis de carrapatos, depositadas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (BENSON et al., 2002).

4.2 Cruzamento das populações de *O. fonsecai* provenientes de Nobres, MT e de Bonito, MS

Com intuito de verificar a ocorrência e viabilidade da descendência entre populações, fêmeas e machos de *O. fonsecai* provenientes das coletas feitas no município de Nobres (Mato Grosso) e de Bonito (Mato Grosso do Sul) foram cruzados. Os descendentes obtidos desse cruzamento foram utilizados tanto para a realização dos experimentos de alimentação artificial quanto para a manutenção da colônia.

4.3 Doação de espécimes de outras populações de *O. fonsecai*

Devido ao baixo número de espécimes obtidos até o momento da qualificação (novembro/2019), espécimes de *O. fonsecai* de duas populações (Ceará e Bonito) foram cedidas pelo professor Dr. Marcelo Labruna (FMVZ/USP) para a realização dos experimentos até o momento da defesa da dissertação. Os indivíduos da população do Ceará foram provenientes da

“Gruta do Morcego Branco” (3° 49' 58" S, 40° 53' 32" W), localizada Parque Nacional de Ubajara, município de Ubajara, estado do Ceará (**Figura 2**).

Figura 2 - Município de Ubajara, localizado no estado do Ceará, nordeste brasileiro.



Fonte: Google Imagens (2020).

Já aqueles da população de Pernambuco foram provenientes da “Furna do Gato” (8° 24' 00" S, 37° 09' 30" W), localizada no Parque Nacional do Catimbau, município de Buíque, estado de Pernambuco (**Figura 3**). Todos os espécimes foram mantidos nas condições laboratoriais descritas no tópico 4.1.

Figura 3 - Município de Buíque, localizado no estado de Pernambuco, nordeste brasileiro.



Fonte: Google Imagens (2020).

4.4 Autogenia das populações

A fim de verificar a ocorrência de autogenia nas populações de Bonito, Ceará e Pernambuco, todas as fêmeas de cada população foram pesadas individualmente após a muda e armazenadas com um macho cada para

registrar o acasalamento. Após alguns dias, eles foram separados e cada fêmea foi isolada para observação dos ovos. Parâmetros como período de pré-oviposição, oviposição, incubação dos ovos e eclosão das larvas foram observados diariamente. Todas as fêmeas autogênicas foram pesadas após quatro dias sem mais registros de postura de ovos.

4.5 Colônia de *O. brasiliensis*

Os indivíduos de *O. brasiliensis* foram cedidos a partir de uma colônia mantida em laboratório do Departamento de Parasitologia do Instituto Butantan, estado de São Paulo, iniciada em 2012 através de uma coleta de carrapatos adultos obtidos de uma casa localizada no município de São Francisco de Paula (29° 20' 00" S; 48° 30' 21" W), estado de Rio Grande do Sul (Figura 4). Os espécimes foram alocados em uma incubadora de demanda biológica de oxigênio (BOD) a 21°C ± 1 °C e umidade relativa de 90% ± 10%.

Figura 4 - Município de São Francisco de Paula, localizado no estado do Rio Grande do Sul, sul brasileiro.



Fonte: Google Imagens (2020).

4.6 Utilização de coelhos como hospedeiros

Para a manutenção de ambas as colônias até a obtenção de um número significativo de indivíduos para os experimentos, coelhos adultos da raça Nova Zelândia (*Oryctolagus cuniculus*) com aproximadamente 2-5 kg de peso corpóreo foram utilizados como hospedeiros, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Campus de Botucatu, São Paulo. As alimentações foram realizadas no biotério do

Departamento de Patologia Veterinária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo (**Figura 5**), e foi autorizada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) nº 012623/2017 da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

Figura 5 - Município de Jaboticabal, localizado no estado de São Paulo, sudeste brasileiro.



Fonte: Google Imagens (2020).

4.7 Alimentação Artificial

4.7.1 1º experimento (*A. marginale*) – *O. fonsecai*

Através da autorização pela Comissão de Ética de Uso de Animais de número (CEUA) 01952/18 da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP, Campus de Jaboticabal, São Paulo, foi coletado 4ml de sangue de 5 bezerros (*Bos taurus taurus*) provenientes do Departamento de Bovinocultura da mesma instituição. As amostras foram colhidas via jugular dos seguintes bezerros: 1571, 1572, 1573, 1577 e 1578 (**Figura 6**), usando agulhas hipodérmicas (BD PrecisionGlide) de calibre 0,80x25 mm, seringas de 5 ml, tubos de coleta com heparina lítica de 10 ml (BD Vacutainer), algodão e álcool 70% para assepsia. O esquema do 1º experimento está demonstrado na **Figura 8**.

Figura 6 - Coleta de sangue dos bezerros, Departamento de Bovinocultura, UNESP, Jaboticabal, São Paulo.



Fonte: Ana Carolina (2019).

4.7.1.1 Reação de amplificação (gene *gapdh*)

Para verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, foi realizado um ensaio de PCR convencional para o gene endógeno gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*gapdh*) (BIRKENHEUER et al., 2003). As amostras foram processadas para extração de DNA usando o kit de extração InstaGene Matrix (Bio-Rad®), seguindo as instruções do fabricante.

Foi preparada uma mistura de 5 μ L do DNA extraído, 2,5 μ L de tampão de PCR 10X (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 0,75 μ L de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 2 μ L de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 1,25 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, WI, EUA) q.s.p. 25 μ L. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritas na **Tabela 1**. As amplificações foram realizadas com 36 ciclos de 95°C por 5 minutos, 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final a 72°C por 5 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta usando o Image Lab Software versão 4.1 (Bio-Rad®).

4.7.1.2 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

As amostras extraídas foram submetidas à reação de qPCR para *A. marginale* baseada no gene *msp1β* (CARELLI et al., 2007). A reação teve volume final de 10 µL, contendo 1 µL do DNA genômico, 0,9 µL de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,2 µL da sonda de hidrólise e 5 µL do tampão de PCR (GoTaq qPCR Master Mix, Promega®, Madison, WI, EUA) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, WI, EUA) q.s.p. 10 µL. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores e da sonda utilizados estão descritas na **Tabela 1**. Os ciclos foram realizados sob as seguintes condições: 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. Todas as amostras foram testadas em duplicatas. A quantificação do número de cópias de DNA-alvo/µL não foi realizada, pois o intuito era verificar a presença da bactéria *A. marginale*.

4.7.1.3 Nova coleta de sangue

Foi feita uma nova coleta de aproximadamente 12 ml de sangue de dois bezerros de forma que apresentassem os picos mais altos detectados na PCR em tempo real descrita anteriormente. As amostras foram colhidas seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1. Foi feita uma alíquota de cada amostra para a realização das análises moleculares.

4.7.1.4 Reação de amplificação (gene *gapdh*)

As amostras foram processadas para o ensaio de PCR convencional seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.1.

4.7.1.5 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

As amostras extraídas foram submetidas à reação de qPCR seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.2. Porém, nessa etapa foi feita a quantificação do número de cópias de DNA-alvo/µL. Para isso, a quantificação foi realizada com a utilização do plasmídeo pSMART (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, EUA) contendo a sequência alvo para amplificação do DNA de *A. marginale*.

Diluições seriadas foram realizadas a fim de construir padrões com diferentes concentrações de DNA plasmidial contendo a sequência-alvo (2,0 x

10^7 cópias/ μL a $2,0 \times 10^1$ cópias/ μL). O número de cópias de plasmídeos foi determinado de acordo com a fórmula ($X\text{g}/\mu\text{L DNA}/[\text{tamanho do plasmídeo (pb)} \times 660] \times 6.022 \times 10^{23} \times \text{cópias do plasmídeo}/\mu\text{L}$). Água estéril ultra-pura (Qiagen®, Madison, EUA) e alíquota de DNA da amostra Jaboticabal de *A. marginale* foram utilizadas como controle negativo e positivo da reação, respectivamente.

4.7.1.6 Alimentação artificial dos carrapatos

As amostras de sangue remanescentes coletadas no tópico 4.7.1.3 foram utilizadas para alimentação dos carrapatos. Foram formados dois grupos com 10 N2 cada, os quais foram alimentados com o sangue de cada bezerro. As ninfas foram pesadas em pools, antes e depois da alimentação, utilizando uma balança analítica (modelo M214AI, Bel). Aqueles que não ingurgitaram dentro de duas horas foram retirados da pesagem. O sistema usado para a alimentação foi montado com um shaker (Slow Speed Rotomix Shaker, Thermolyne) em velocidade mínima e um agitador magnético com aquecimento (modelo 752A, Fisatom) que foi pré-aquecido à 50°C minutos antes de colocar uma placa de Petri de vidro com a bolsa de sangue dentro, com as extremidades laterais comportando a placa (**Figura 7**).

Figura 7 – Sistema de alimentação



Fonte: Ana Carolina (2019).

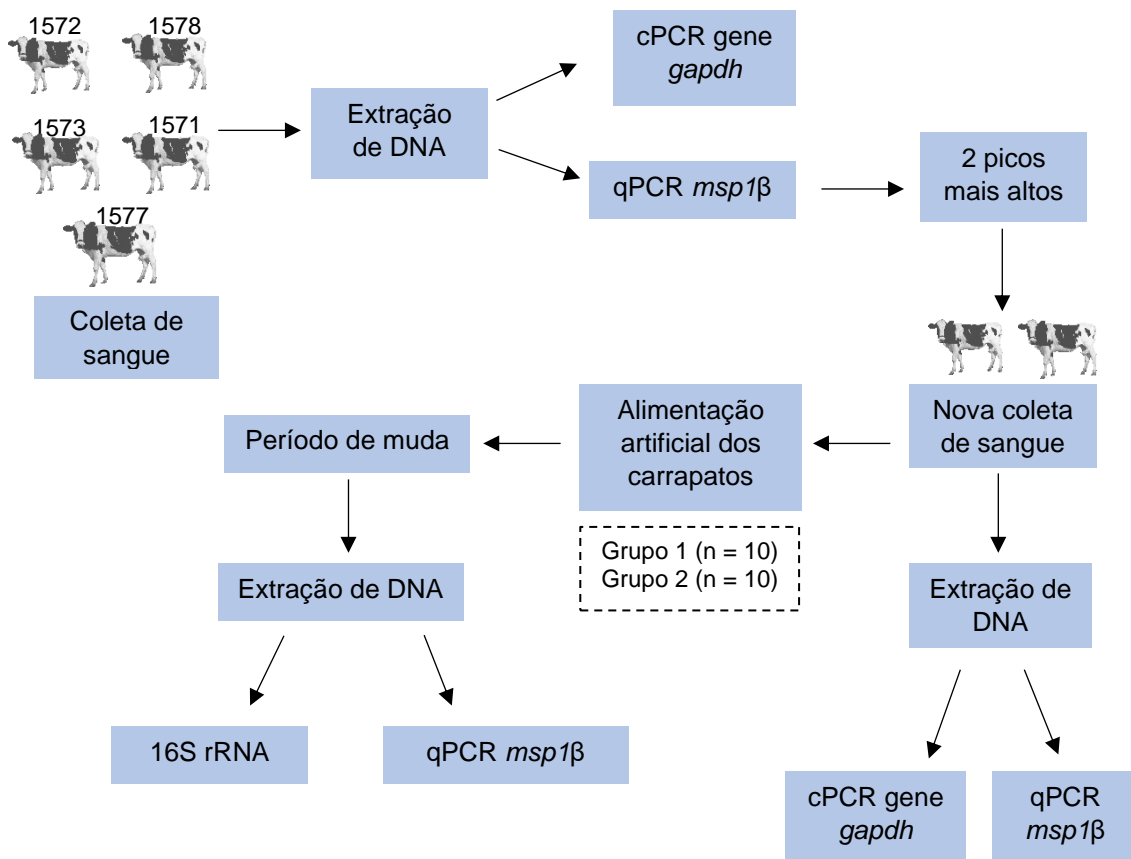
4.7.1.7 Reação de amplificação (gene 16S rRNA)

Após a muda, os carrapatos foram submetidos à extração e ao ensaio de PCR convencional descritos no tópico 4.1.1.

4.7.1.8 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

A fim de verificar a transmissão transestadial da bactéria *A. marginale* nas ninfas alimentadas artificialmente, as amostras extraídas foram submetidas à reação de qPCR seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.5.

Figura 8 - Esquema do 1º experimento.



4.7.2 2º experimento (*A. marginale*) – *O. fonsecai*

Seguindo a mesma metodologia citada no tópico 4.7.1, foi coletado cerca de 10ml de sangue dos bezerros 1556, 1560 e 1563, provenientes do departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da UNESP de Jaboticabal. O esquema do 2º experimento está demonstrado na **Figura 11**.

4.7.2.1 Reação de amplificação (gene *gapdh*)

A fim de verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, essas foram processadas para o ensaio de PCR convencional seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.1. As amostras foram processadas usando o kit de extração de sangue DNeasy (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante.

4.7.2.2 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

Depois de extraídas, as amostras foram submetidas à reação de qPCR seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.5.

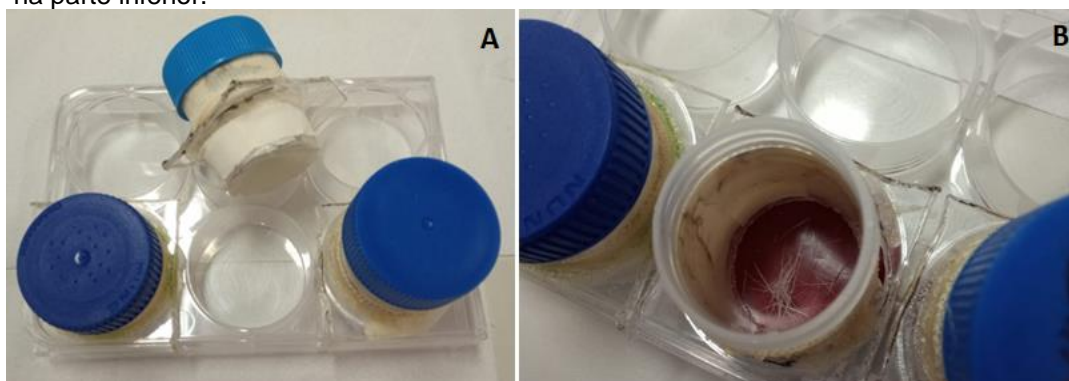
4.7.2.3 Alimentação artificial dos carrapatos

A amostra que apresentou o pico mais alto foi utilizada para alimentar os carrapatos.

Foram formados dois grupos (G1 e G2) com 5 N3 cada. As ninfas foram pesadas em pools, antes e depois da alimentação, utilizando uma balança analítica. Aqueles que não ingurgitaram dentro de duas horas foram retirados da pesagem.

Para a alimentação, foram feitas câmaras de contenção com tubos falcon de 50 ml cortados, revestido com filme de parafina plástica (Parafilm "M", Atena) vedado com esparadrapo em uma placa de 6 poços (Kasvi) (**Figura 9**). Antes de vedar as câmaras, o filme de parafina foi friccionado na pele do hospedeiro para aproximar ao ambiente natural de alimentação. Após a vedação, pelos de coelho foram espalhados em cima para maximizar a atração dos carrapatos. Cerca de 3 ml de sangue foi dispensado em cada poço (**Figura 9**). O sistema de alimentação foi composto por um shaker de bancada (RotoMix), agitador magnético com aquecimento (Cientec) e uma placa de 6 poços junto às câmaras (**Figura 10**).

Figura 9 - (A) Câmaras de contenção; (B) Câmara pronta com pelo de coelho e o sangue na parte inferior.



Fonte: Ana Carolina (2020).

Figura 10 - Sistema de alimentação



Fonte: Ana Carolina (2020).

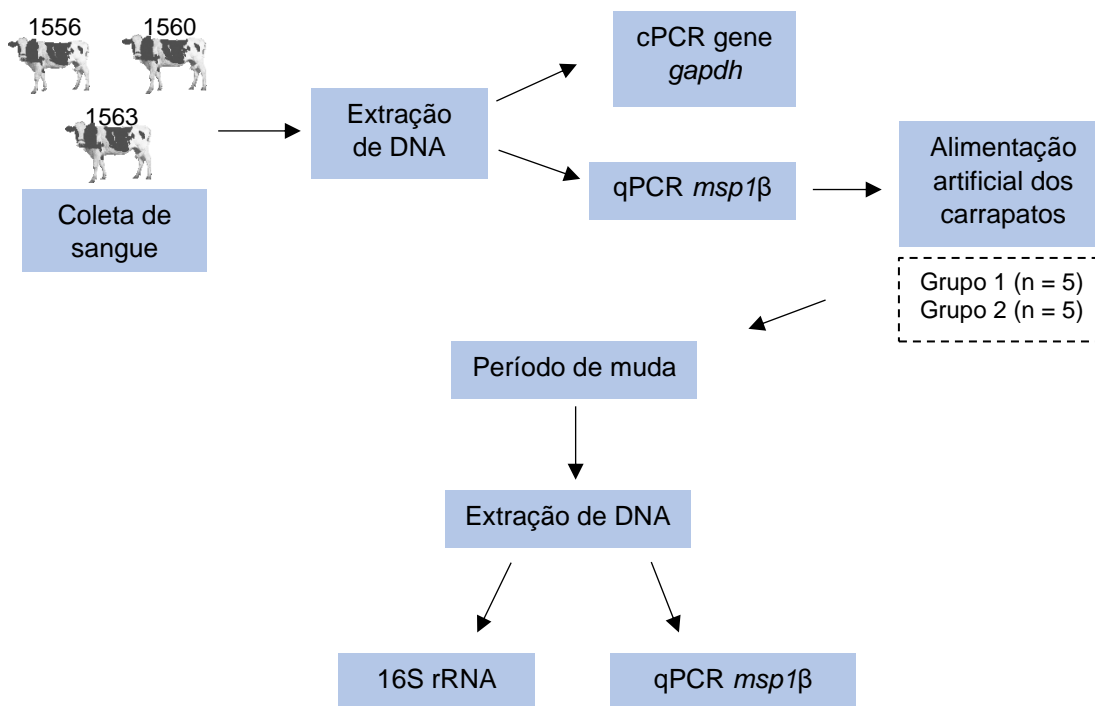
4.7.2.4 Reação de amplificação (gene 16S rRNA)

Após a muda, os carrapatos foram submetidos à extração e ao ensaio de PCR convencional descritos no tópico 4.1.1.

4.7.2.5 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

As amostras extraídas foram submetidas à reação de qPCR seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.5.

Figura 11 - Esquema do 2º experimento.



4.7.3 3º experimento (*A. marginale*) – *O. fonsecai* e *O. brasiliensis*

Seguindo a mesma metodologia citada no tópico 4.7.1, foi coletado cerca de 10ml de sangue dos bezerros 1556 e 1560 provenientes do mesmo departamento. O esquema do 3º experimento está demonstrado na **Figura 12**.

4.7.3.1 Avaliação de esfregaços sanguíneos corados

A busca por corpúsculos de *A. marginale* em eritrócitos foi realizada pela leitura de campos homogêneos de esfregaços sanguíneos corados com Giemsa (May-Grunwald-Giemsa e Wright Giemsa) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA) e previamente fixados com metanol (Synth®, São Paulo, SP), utilizando microscópio de luz (Olympus BX40) com objetiva de imersão (100X).

4.7.3.2 Reação de amplificação (gene *gapdh*)

A fim de verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, essas foram processadas para o ensaio de PCR convencional seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.1.

4.7.3.3 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

Depois de extraídas, as amostras foram submetidas à reação de qPCR seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.5.

4.7.3.4 Alimentação artificial dos carrapatos

Para a espécie *O. fonsecai*, foram formados dois grupos (G1 – sangue bezerro 1556) e (G2 – sangue bezerro 1560) com 15 ninfas N3 cada. As ninfas foram pesadas em pool, antes e depois da alimentação, e aquelas que não se alimentaram dentro de duas horas foram retiradas da pesagem final.

Para a espécie *O. brasiliensis*, foram formados dois grupos (G1 – sangue bezerro 1556) e (G2 – sangue bezerro 1560) com 6 ninfas N3 cada. As ninfas foram pesadas e alimentadas nas mesmas condições descritas no tópico 4.7.2.3.

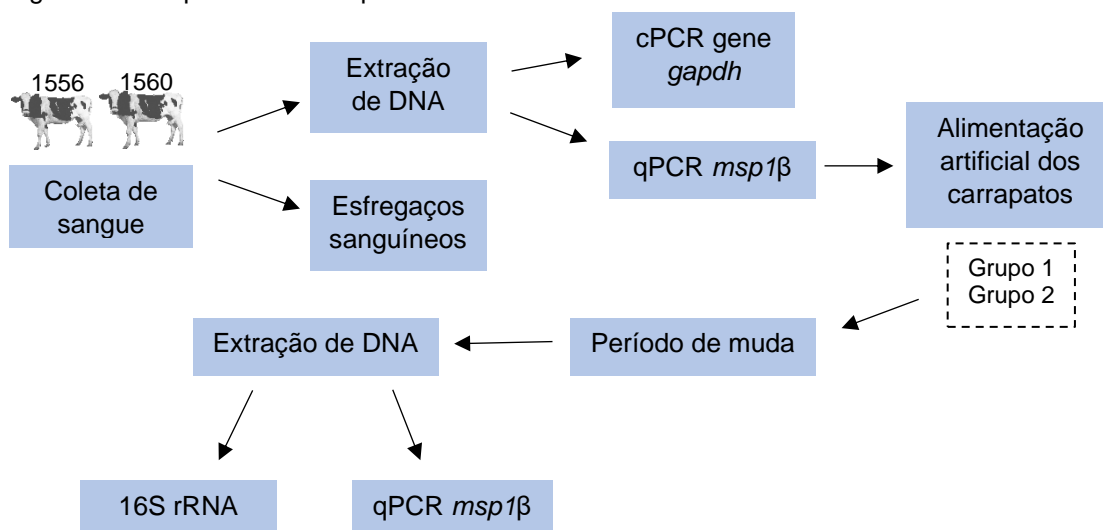
4.7.3.5 Reação de amplificação (gene 16S rRNA)

Após a muda, os carrapatos foram submetidos à extração e ao ensaio de PCR convencional descritos no tópico 4.1.1.

4.7.3.6 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

As amostras extraídas foram submetidas à reação de qPCR seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.5.

Figura 12 - Esquema do 3º experimento.



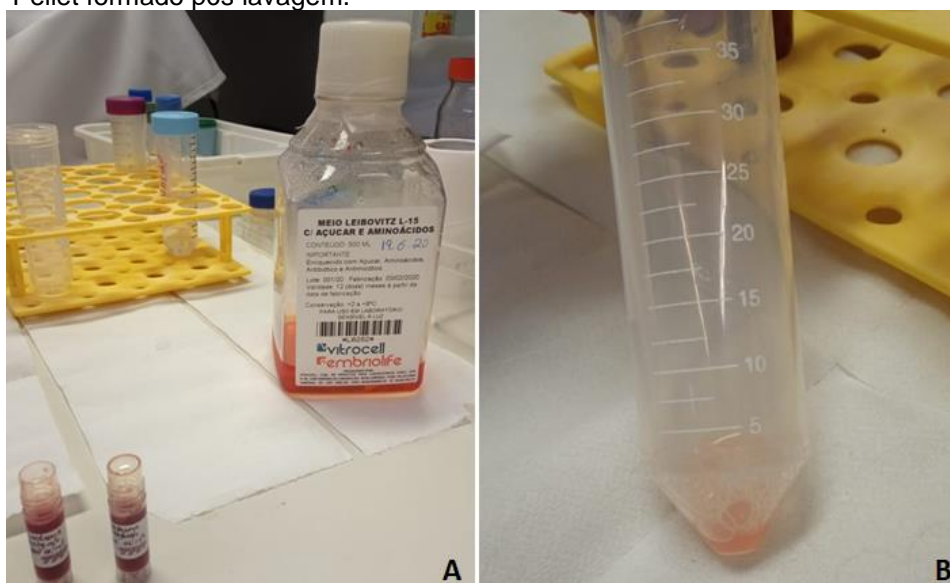
4.7.4 4º experimento (*A. marginale*) – *O. fonsecai* e *O. brasiliensis*

Para a coleta de sangue dos coelhos foram coletados 9 ml de sangue via intracardíaca utilizando agulhas hipodérmicas (BD PrecisionGlide) de calibre 0,80x25 mm e seringas de 10 ml. Foram feitas quatro repetições dessas coletas e das alimentações. O sangue foi transferido imediatamente para um tubo de coleta de sangue a vácuo com heparina de sódio de 9 ml (Vacuplast). Para assepsia, foram utilizados algodão e álcool 70%.

4.7.4.1 Cepas de *A. marginale*

Nas amostras de sangue de coelho, foi introduzida a cepa Jaboticabal de *A. marginale* para a infecção do sangue a ser utilizado na alimentação artificial. As cepas do patógeno armazenadas em criotubos de 1,5 ml (Nalgene) em nitrogênio líquido foram descongeladas manualmente. Em seguida, foram feitas duas lavagens com o meio L-15 de Leibovitz (Vitrocell) sem soro e antibiótico (**Figura 13**), com proporção 1:1, sob centrifugação à 4000g por 15 minutos à 15°C. O pellet formado foi misturado com o sangue coletado (**Figura 13**). Foi separada uma alíquota do sangue para a extração de DNA e a realização das análises moleculares. O esquema do 4º experimento está demonstrado na **Figura 14**.

Figura 13 - (A) Preparação e lavagem da cepa de *Anaplasma marginale*; (B) Pellet formado pós lavagem.



Fonte: Ana Carolina (2020).

4.7.4.2 Avaliação das cepas e esfregaços corados

Para cada repetição das alimentações, lâminas de microscopia foram preparadas antes e após cada lavagem das cepas, além de esfregaços sanguíneos a fim de verificar a presença de *A. marginale* na mistura. Todas as lâminas foram fixadas com metanol (Synth®, São Paulo, SP) e posteriormente coradas com Giemsa (May-Grunwald-Giemsa e Wright Giemsa) (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, EUA). Foi utilizado microscópio de luz (Olympus BX40) com objetiva de imersão (100X) para a observação dos esfregaços.

4.7.4.3 Reação de amplificação (gene *gapdh*)

A fim de verificar a presença de inibidores nas amostras de DNA, as alíquotas separadas foram processadas para o ensaio de PCR convencional seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.1.

4.7.4.4 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

Depois de extraídas, as amostras foram submetidas à reação de qPCR seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.5.

4.7.4.5 Alimentação artificial dos carrapatos

Foram separadas 10 ninfas N3 para os grupos controle de cada espécie para alimentação em hospedeiros (coelhos). Todas as ninfas foram pesadas em pool, antes e depois da alimentação, e aquelas que não se alimentaram dentro de duas horas foram retiradas da pesagem final.

Para as quatro repetições das alimentações, foram usados:

- 1ª repetição: *O. fonsecai* – 15 N3; *O. brasiliensis* – 15 N3;
- 2ª repetição: *O. fonsecai* – 15 N3; *O. brasiliensis* – 15 N3;
- 3ª repetição: *O. fonsecai* – 15 N3; *O. brasiliensis* – 15 N3;
- 4ª repetição: *O. fonsecai* – 15 N3 e 2 adultos; *O. brasiliensis* – 15 N3 e 4 adultos.

Para a alimentação, foi usada a metodologia descrita no tópico 4.7.2.3.

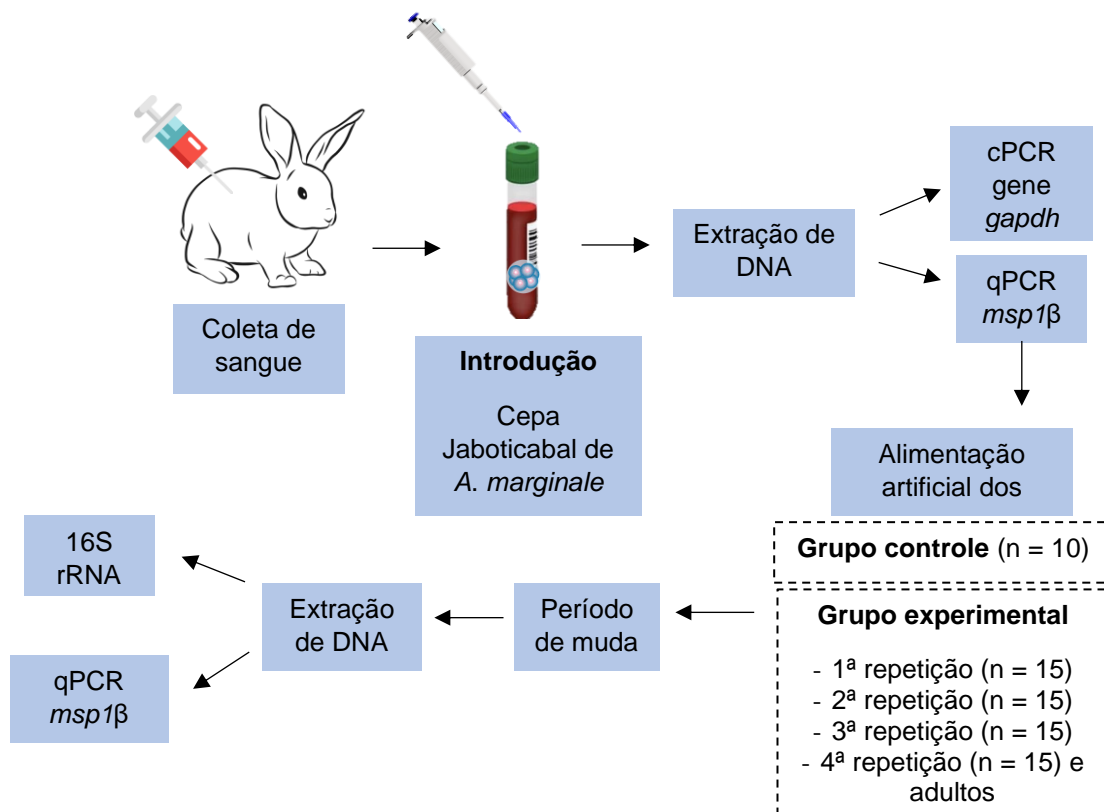
4.7.4.6 Reação de amplificação (gene 16S rRNA)

Após a muda, os carrapatos foram submetidos à extração e ao ensaio de PCR convencional descritos no tópico 4.1.1.

4.7.4.7 Análise qualitativa para *A. marginale* (gene *msp1β*)

As amostras extraídas foram submetidas à reação de qPCR seguindo a metodologia descrita no tópico 4.7.1.5.

Figura 14 – Esquema do 4º experimento.



4.8 Semi-nested PCR para *A. marginale* (gene *msp1α*)

As amostras que foram positivas para o ensaio de qPCR para *A. marginale* com base no gene *msp1β* de todos os experimentos (contando a partir do segundo), foram submetidas à snPCR com base no gene *msp1α* (CASTAÑEDA-ORTIZ et al., 2015). A primeira reação teve volume final de 25 μ L, contendo 2,5 μ L de DNA genômico, 12,5 μ L Taq PCR MasterMix (QIAGEN®), 0,5 μ L de cada oligonucleotídeo iniciador e água ultra-pura esterilizada (QIAGEN®) q.s.p. 25 μ L. A segunda reação foi realizada com volume final de 25 μ L, contendo 1 μ L de DNA amplificado na primeira reação e as mesmas concentrações dos demais reagentes anteriormente descritas. As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão descritas na **Tabela 1**. Os ciclos da primeira reação foram: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57°C por 30 segundos e 72°C por 35 segundos,

seguidos de uma extensão final a 72 °C por 7 minutos. Os ciclos da segunda reação de PCR para a amplificação do fragmento mais interno do gene *msp1α* foram: 94°C por 5 minutos, 30 ciclos de 94°C por 35 segundos, 65°C por 58 segundos e 72 °C por 30 segundos, e extensão final de 72 °C por 10 minutos. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com brometo de etídio (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA). Os géis foram fotografados sob luz ultravioleta usando o Image Lab Software versão 4.1 (Bio-Rad®).

4.9 Purificação e sequenciamento dos produtos amplificados

Os produtos de PCR baseados no gene *msp1α* obtidos pela snPCR foram submetidos à metodologia descrita no tópico 4.1.2.

4.10 Análise das sequências consenso baseadas no gene *msp1α*

As sequências de nucleotídeos provenientes do sequenciamento foram submetidas à metodologia descrita no tópico 4.1.3, para determinar as semelhanças mais próximas com as sequências do gene *msp1α*.

4.11 Classificação de genótipos de *A. marginale*

Para analisar a diversidade genética do gene *msp1α* foram utilizadas as sequências de nucleotídeos do presente estudo e sequências previamente depositadas no GenBank. Para identificar o genótipo foi feita a classificação proposta por Estrada-Peña et al. (2009) seguindo os seguintes passos: encontrou-se a região chamada de Shine-Dalgarno (GTAGG) e logo em seguida o próximo códon de iniciação da tradução (ATG). Dentro desse intervalo (GTAGG-ATG) foram contabilizados os GTT, chamando-os de “m” e os GT, chamando-os de “n”. A análise de sequências repetidas foi realizada conforme a nomenclatura proposta por De la Fuente et al. (2007). A distância SD-ATG foi calculada segundo a fórmula $(4 \times m) + (2 \times n) + 1$ descrita por Estrada-Peña et al. (2009)

As sequências Consenso obtidas foram transformadas em aminoácidos com o auxílio da ferramenta de tradução ExPaSy [<http://web.expasy.org/translate/>] do Instituto Suíço de Bioinformática, e a sua variabilidade de aminoácidos foi analisada através do Software *RepeatAnalyzer*

(CATANESE et al., 2016). O software também calculou a frequência de cada repetição (SSRs) na região estudada, mostrando quais estirpes são únicas para o estudo, comparando com estudos depositados no banco de dados.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Populações de *O. fonsecai*

5.1.1 Gruta Lagoa Azul, Nobres, MT (População Nobres)

Todas as fêmeas foram alimentadas, porém apenas duas foram mantidas juntas com machos para a cópula a fim de iniciar uma nova geração, uma vez que havia um baixo número de indivíduos. Ovos foram observados cinco meses após ao repasto sanguíneo (período de pré-oviposição). O período de oviposição foi de 10 dias, demorando aproximadamente 25 dias para o início da eclosão das larvas (período de incubação), contudo, esse lote de ovos não foi viável e os ovos secaram. As demais fêmeas foram separadas para a realização do cruzamento com machos provenientes da coleta na caverna “Gruta de São Miguel”, Bonito, MS. Todas as ninfas da população de *O. fonsecai* de Nobres mudaram para adultos resultando em três fêmeas e um macho, com períodos de muda variando entre 30-160 dias após a alimentação. Novamente, duas fêmeas foram alimentadas para o início da nova geração. O tempo de pré-oviposição foi de 9 dias, seguido por 11 e 16 dias de oviposição e eclosão, respectivamente. As larvas obtidas foram alimentadas 20 dias após a eclosão. O período de queda variou entre 7-10 dias. A primeira muda (larva para N1) foi completada 11 dias depois da queda, seguida de mais 5 dias para mudar para ninfas de segundo instar (N1 para N2) sem repasto sanguíneo. Resultou no total 43 N2 as quais foram reservadas para os experimentos de alimentação artificial.

5.1.1.1 Biologia da população de *O. fonsecai* de Nobres, MT (Santiago et al., 2019)

Os parâmetros biológicos obtidos durante 3 gerações sob condições laboratoriais da colônia mantida no Instituto Butantan (Iniciação Científica) e a ocorrência da autogenia, sendo o primeiro registro descrito no Brasil, foi publicado em agosto/2019 na revista Tick and Ticks-borne Diseases

denominado “Occurrence of autogeny in a population of *Ornithodoros fonsecai* (Acari: Argasidae)”.

5.1.2 Gruta São Miguel, Bonito, MS (População Bonito)

Foram coletados 9 espécimes sendo 7 ninfas e 2 machos (**Figura 15**). Seis ninfas e 1 macho foram alimentados em coelho, e a ninfa que não se fixou morreu. Das 6 ninfas alimentadas, uma mudou para ninfa novamente em 27 dias e 3 fêmeas entre 157-165 dias. Uma das ninfas remanescentes morreu.

Figura 15 - (A) DMBB na Gruta de São Miguel, município de Bonito, Mato Grosso do Sul; (B) espécimes coletados.

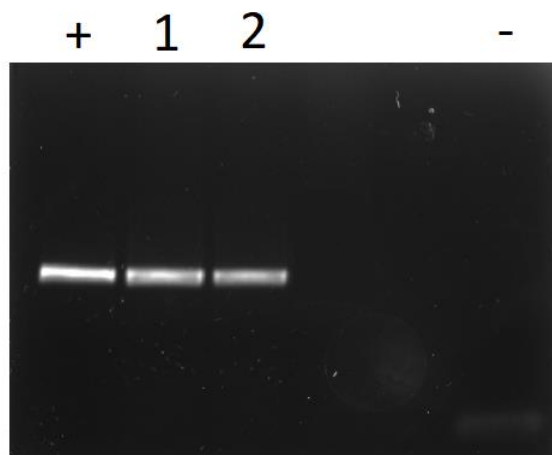


Fonte: Darci (2020).

5.1.2.1 Confirmação da identidade dos carrapatos de Bonito, MS

Após a extração do DNA, a cPCR para o gene endógeno 16S rRNA mitocondrial foi positiva para as amostras (**Figura 16**). As sequências obtidas dos espécimes coletados na gruta, quando submetidas ao BLASTn, revelaram porcentagem de identidade variando de 98,5% a 99,78% com sequência de *Carios fonsecai* (KC769597) previamente depositadas no GenBank e cobertura entre 99% a 100%.

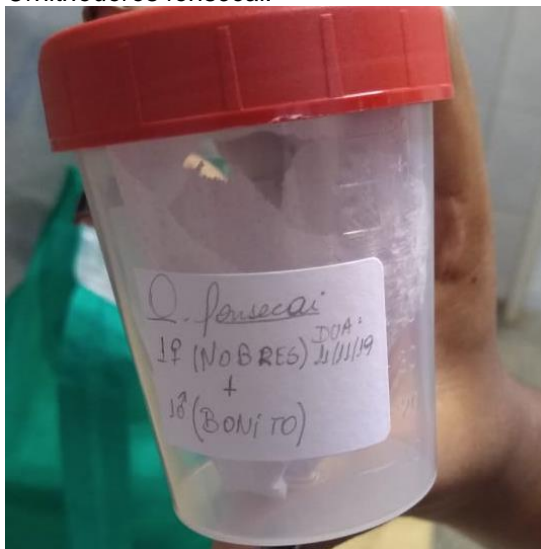
Figura 16 – Bandas amplificadas de 460 pb do gene 16S rRNA mitocondrial das amostras representadas pelos números 1 e 2.



5.1.3 Cruzamento das populações de *O. fonsecai*

Do cruzamento de um macho proveniente de Bonito com uma das fêmeas da população de Nobres (**Figura 17**), em torno de 300 ovos foram postos entre 15-25 dias após o repasto sanguíneo (pré-oviposição) da fêmea, seguido de mais 7 dias para o término da oviposição. O tempo de incubação foi de 15 dias. As larvas (total de 244) foram alimentadas e o período de queda foi entre 6-13 dias. A muda para o primeiro instar (N1) foi completada entre 4-15 dias, seguidos de mais 11-22 dias para mudarem para ninfas de segundo instar (N2) sem o repasto sanguíneo. Entre esses períodos houve mortalidade de 44 espécimes antes da muda para N2, resultando em torno de 200 ninfas N2 remanescentes. Todas foram alimentadas e mudaram para N3 entre 28-44 dias.

Figura 17 - Cruzamento das populações de *Ornithodoros fonsecai*.



Fonte: Ana Carolina (2019).

5.1.4 Doação de espécimes (*O. fonsecai*)

5.1.4.1 Gruta do Morcego Branco, Ubajara, CE (população Ceará)

Um total de 23 ninfas foram alimentadas e mudaram para N4 ($n = 11$) em 18 dias, 4 machos e 3 fêmeas emergiram entre 18-45 e 18-51 dias, respectivamente. Sete N4 morreram, restando 4 ninfas N4. Dessas, duas foram alimentadas, uma mudou para N5 em 21 dias e a outra mudou para macho em 139 dias.

5.1.4.2 Furna do Gato, Buíque, PE (população Pernambuco)

Das 18 ninfas que foram doadas, dezessete foram alimentadas e mudaram para N4 ($n = 10$) entre 18-68 dias, 4 machos emergiram entre 74-134 dias e 3 fêmeas emergiram entre 85-129 dias. Cinco ninfas morreram, permanecendo 5 N4. Dessas, quatro foram alimentadas. Uma mudou N5 em 27 dias, dois machos emergiram entre 32-60 dias e uma fêmea emergiu em 225 dias.

Notou-se a emergência tanto de machos quanto de fêmeas de *O. fonsecai* a partir do mesmo instar ninfal, nas populações de Nobres, Ceará e Pernambuco. Apenas na população de Bonito observou-se o surgimento de fêmeas antes dos machos, porém vale lembrar que esses espécimes foram trazidos diretamente de seu ambiente natural e que já havia a presença de machos, os quais também foram coletados. Esses resultados diferem daqueles

citados por Oliver (1989), que relatou que os machos geralmente emergem com um instar ninfal a menos do que as fêmeas. Também foi observada maior emergência de fêmeas do que de machos para as populações de Nobres e Bonito, com 75% e 50% das ninfas alimentadas originando fêmeas, respectivamente. Já nas demais populações, o número de fêmeas emergidas foi menor quando comparado ao de machos, sendo de 13% mudando para fêmeas a partir de N3 da população de *O. fonsecai* do Ceará e 17,6% de N3 e 20% de N4 da população de *O. fonsecai* de Pernambuco. Esses dados diferem daqueles obtidos por Pound et al. (1986) em um estudo com *O. parkeri*, cujos instares ninfais iniciais geralmente produziram mais machos do que fêmeas. É importante ressaltar que muitas variáveis estiveram envolvidas para a adaptação dos espécimes em condições de laboratório, o que pode ter influenciado nesses parâmetros.

As únicas larvas obtidas alimentadas, sem considerar aquelas emergidas do cruzamento das populações de Nobres e Bonito, permaneceram fixas no hospedeiro entre 7 a 10 dias, o que corrobora com o perfil alimentar dessa espécie anteriormente visto por Santiago et al. (2019). Além disso, foi observado que os espécimes de primeiro instar (N1) não precisaram se alimentar para mudar para N2, fato esse já relatado com as espécies *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford e Jones, 1969 (LANDULFO et al., 2012) e *Ornithodoros amblus* Chamberlin, 1920 (KHALI E HOOGSTRAAL, 1981). Esse comportamento é comumente observado entre espécies do subgênero *Alectorobius*.

5.1.5 Autogenia das populações de *O. fonsecai*

O peso das fêmeas provenientes das populações de Bonito, Ceará e Pernambuco está apresentado na **Tabela 1**.

5.1.5.1 População de *O. fonsecai* de Bonito

Por ter apenas 2 machos para acasalar, foram usadas duas fêmeas e os machos para o teste de autogenia. Eles foram deixados juntos para acasalarem por nove dias e mesmo após mais de 100 dias, nenhuma fêmea ovipôs.

5.1.5.2 População de *O. fonsecai* do Ceará

Três fêmeas e três machos foram usados para o registro autogênico. Eles foram mantidos juntos para acasalar por nove dias e duas fêmeas começaram a ovipor entre 27-42 dias (período de pré-oviposição), e o período de oviposição foi completado entre 22-29 dias (**Tabela 1**). Elas colocaram um total de 183 ovos (**Figura 18**). O período de incubação dos ovos durou entre 23-28 dias e o período de eclosão das larvas foi de 6-9 dias, com taxa de eclosão de 52%.

5.1.5.3 População de *O. fonsecai* de Pernambuco

Três fêmeas e três machos foram mantidos juntos para acasalar por nove dias. Após 16 dias (período de pré-oviposição), todas as fêmeas iniciaram a oviposição que durou 20-35 dias (**Tabela 1**), resultando em um total de 367 ovos (**Figura 19**). O período de incubação dos ovos foi de 13-14 dias. A taxa total de eclosão das larvas foi de 92%, durante um período de 9-14 dias.

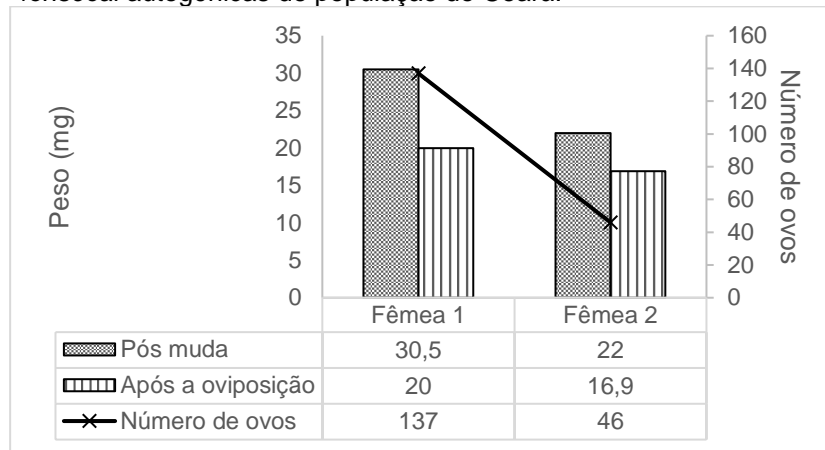
Tabela 2 - Peso pós muda das fêmeas de *Ornithodoros fonsecai* e período de pré-oviposição e oviposição das populações de Bonito, Ceará e Pernambuco.

População		Peso pós muda (mg)	Períodos (dias)	
			Pré-oviposição	Oviposição
Bonito	Fêmea 1	23,9	-	-
	Fêmea 2	25,8	-	-
Ceará	Fêmea 1	30,5	42	22
	Fêmea 2	22	27	29
	Fêmea 3	23	-	-
Pernambuco	Fêmea 1	21,3	16	20
	Fêmea 2	15,4	16	20
	Fêmea 3	46	16	35

Fonte: Santiago (2020).

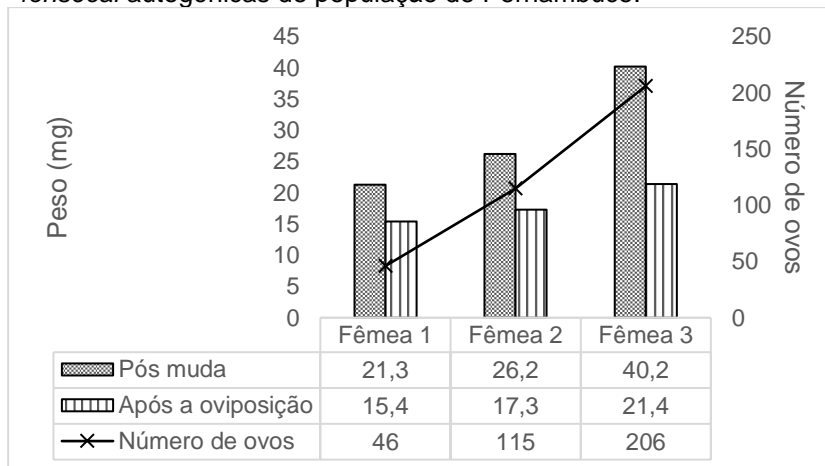
Legenda: mg: miligrama; -: amostras sem valores

Figura 18 - Peso e número de ovos das fêmeas de *Ornithodoros fonsecai* autogênicas de população do Ceará.



Legenda: mg: miligrama

Figura 19 - Peso e número de ovos das fêmeas de *Ornithodoros fonsecai* autogênicas de população de Pernambuco.



Legenda: mg: miligrama

Ainda não estão claros os fatores que determinam a ocorrência da autogenia. Feldman-Muhsam (1973) mencionou que a associação entre o tamanho da fêmea na ecdise e a autogenia, bem como o número de ovos depositados, são sugestivos que as condições ecológicas determinam a autogenia. No presente estudo, foi observado que quase todas as fêmeas de *O. fonsecai* provenientes da população do Ceará, conseguiram depositar ovos, autogenicamente inclusive uma fêmea mais leve (20 mg) que as demais. O mesmo comportamento se repetiu em fêmeas provenientes da população de Pernambuco, uma delas pesando 21,3 mg. Em ambas as populações, quanto maior a fêmea na ecdise, mais ovos foram depositados, e quanto menor, menos ovos. No entanto, estudos relataram correlação positiva entre o peso da

fêmea na ecdise e o número de ovos depositados, bem como a capacidade de serem autogênicas ou não (FELDMAN-MUHSAM, 1973; FELDMAN-MUHSAM E HAVIVI, 1973; SANTIAGO et al., 2019). Esses autores também mencionaram que não há separação clara entre os pesos das fêmeas na ecdise e autogenicidade, como mostrado em um estudo com as espécies *O. tholozani*, *O. tartakovskyi* e *O. parkeri*. No caso dessa última espécie, algumas fêmeas com baixo peso (menos de 40 mg) foram autogênicas e outras não (FELDMAN-MUHSAM, 1973). A correlação positiva entre o peso da fêmea na ecdise e a quantidade de ovos depositados também foi demonstrada. Porém essa associação talvez não seja regra no caso de autogenia. Santiago et al. (2019) mostraram que uma fêmea pesando 23,8 mg, sendo esta a mais leve entre as fêmeas autogênicas, conseguiu ovipor um número maior de ovos (n = 150 ovos) do que uma fêmea pesando 25,7 mg (n=80 ovos). No presente estudo, todas as fêmeas autogênicas em ambas as populações, (mesmo a mais leve com peso de 20 mg), foram capazes ovipor quando submetidas a 25°C. Pound et al. (1984) verificaram a influência da temperatura e do peso como reguladores da autogenia facultativa. Segundo esses autores, fêmeas de *O. parkeri* mais leves (pesando entre 11-20 mg) apresentaram parâmetros autogênicos semelhantes quando submetidas a baixas (21°C) e altas (29°C) temperaturas, enquanto aquelas com pesos maiores e médios (31-40 mg e 21-30 mg, respectivamente) não foram autogênicas a 21°C. Todas as fêmeas autogênicas de *O. fonsecai* das populações do Ceará e Pernambuco foram alimentadas uma vez como ninfas (N4) e puseram 183 ovos entre 22-29 dias e 367 ovos entre 20-35 dias, respectivamente. A importância da adaptação do espécime às condições de laboratório, como temperatura e umidade relativa do ar, deve ter influenciado os parâmetros autogênicos obtidos, uma vez que os indivíduos foram retirados do ambiente natural e submetidos a essas condições. Esses parâmetros diferem quando comparados às fêmeas autogênicas de *O. fonsecai* de Nobres, MT observadas por Santiago et al. (2019). Segundo esses autores, as fêmeas originárias da geração F2 se alimentaram duas vezes como ninfas de terceiro instar (N3) e colocaram 800 ovos entre 13-24 dias, e as fêmeas originárias da geração F3 fizeram uma refeição de sangue uma vez como ninfas de quarto instar e depositaram cerca de 900 ovos entre 9-25 dias. Ainda de acordo com esses autores, houve

correlação positiva entre a alimentação dupla como ninfas e o número de ovos depositados, bem como a importância do número de instares de ninfas antes da emergência da fêmea. Possivelmente as reservas nutricionais restantes do último estágio de ninfa proporciona maior número de ovos, bem como o número de gerações já adaptadas ao ambiente do laboratório.

5.1.6 População de *O. brasiliensis*

Em torno de 150 ninfas N2, 8 machos e 8 fêmeas foram trazidos para a UNESP de Jaboticabal, e estão sob a responsabilidade de DMBB (orientadora). Houve mortalidade de 50 espécimes, sobrando 100 N2, 3 fêmeas e 3 machos. Todas as ninfas, duas fêmeas e três machos foram alimentados e, 90 N2 mudaram para N3 entre 29-60 dias, 5 machos entre 29-40 dias e as 5 ninfas N2 remanescentes morreram. No total, resultaram 90 N3, 8 machos e 3 fêmeas. As fêmeas alimentadas foram deixadas com um macho cada por 7 dias para acasalar e após 123 dias elas começaram a ovipor. Essas ninfas foram usadas para os experimentos de alimentação artificial.

5.2 Alimentação artificial

5.2.1 1º experimento (*A. marginale*) – *O. fonsecai*

Na primeira coleta feita do sangue, todas as amostras de DNA foram positivas tanto para o ensaio de cPCR para o gene endógeno *gapdh* quanto para os ensaios de qPCR baseados no gene *msp1β*. Aquelas que apresentaram os picos mais altos foram provenientes dos bezerros de número 1573 e 1578. Após a segunda coleta de sangue e a extração do DNA desses bezerros, novamente as amostras foram positivas para cPCR para o gene endógeno *gapdh* e qPCR para o gene *msp1β*, com média de Cq de 23,21 e 22,54 para os bezerros 1573 e 1578, respectivamente. A quantificação ficou entre 10^4 e 10^5 de cópias de um fragmento de *msp1β*/μL de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR foram de 103,6% de eficiência, 0,999 de coeficiente de determinação, 3,239 para a inclinação e 39,269 no intercepto do eixo y.

Quatro das 20 ninfas N2, sendo 3 N2 do grupo 1573 e 1 N2 do grupo 1578, alimentaram artificialmente e mudaram para N3 dentro de 36 dias. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na

Tabela 3. Uma ninfa do grupo 1573 morreu alguns dias após a muda. Após a extração do DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 20**), as duas ninfas do grupo 1573 foram positivas ao ensaio de qPCR para o gene *msp1β* de *A. marginale*, enquanto aquela remanescente do grupo 1578 foi negativa. A qPCR foi realizada 30 dias após a muda, com média de Cq entre 25,13 e 27,22. A quantificação ficou entre 10^3 e 10^4 de cópias de um fragmento de *msp1β*/μL de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR foram de 92,9% de eficiência, 0,998 de coeficiente de determinação, 3,505 para a inclinação e 40,677 no intercepto do eixo y.

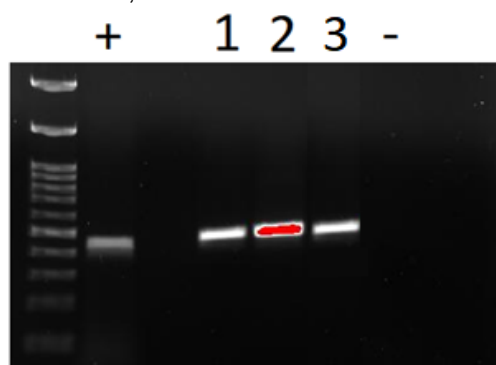
Tabela 3 - 1º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas de *Ornithodoros fonsecai* de cada grupo.

	Antes alimentação			Depois alimentação	
	Peso N=10 (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)	N alimentados	Peso total alimentadas (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)
Grupo 1573	98	9,8	3	99,1	33
Grupo 1578	103	10,3	1	41	41

Fonte: Santiago (2020).

Legenda: N: número de espécimes; mg: miligrama

Figura 20 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial das amostras representadas pelos números 1, 2 e 3.



5.2.2 2º experimento (*A. marginale*) – *O. fonsecai*

As amostras de DNA extraídas dos três bezerros foram positivas tanto para o ensaio de cPCR para o gene endógeno *gapdh* quanto nos ensaios de qPCR baseados no gene *msp1β*.

Para a alimentação a amostra que apresentou o pico mais alto foi a do bezerro de número 1556, média de Cq de 25,51. A quantificação ficou em 10^5 de cópias de um fragmento de *msp1β*/μL de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR foram de 97,3% de eficiência, 0,943 de coeficiente de determinação, 3,389 para a inclinação e 43,858 no intercepto do eixo y.

Cinco das 10 ninfas N3, sendo 2 ninfas N3 do grupo 1 e 3 ninfas N3 do grupo 2, alimentaram. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 4**. Apenas as 2 ninfas N3 do grupo 1 mudaram para um macho e uma fêmea entre 34-43 dias, e as 3 ninfas N3 do grupo 2 morreram. Após a extração do DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 21**), ambas amostras foram negativas na qPCR para *A. marginale* realizada entre 4-13 dias após a muda.

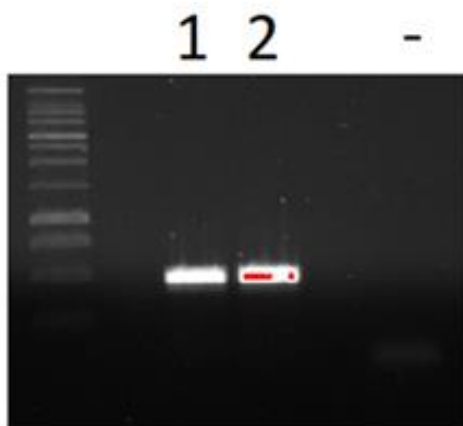
Tabela 4 - 2º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas de *Ornithodoros fonsecai* de cada grupo.

	Antes alimentação			Depois alimentação	
	Peso N=5 (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)	N alimentados	Peso total alimentadas (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)
Grupo 1	35	7	2	95	47,5
Grupo 2	31,3	6,26	3	54	18

Fonte: Santiago (2020).

Legenda: N: número de espécimes; mg: miligrama

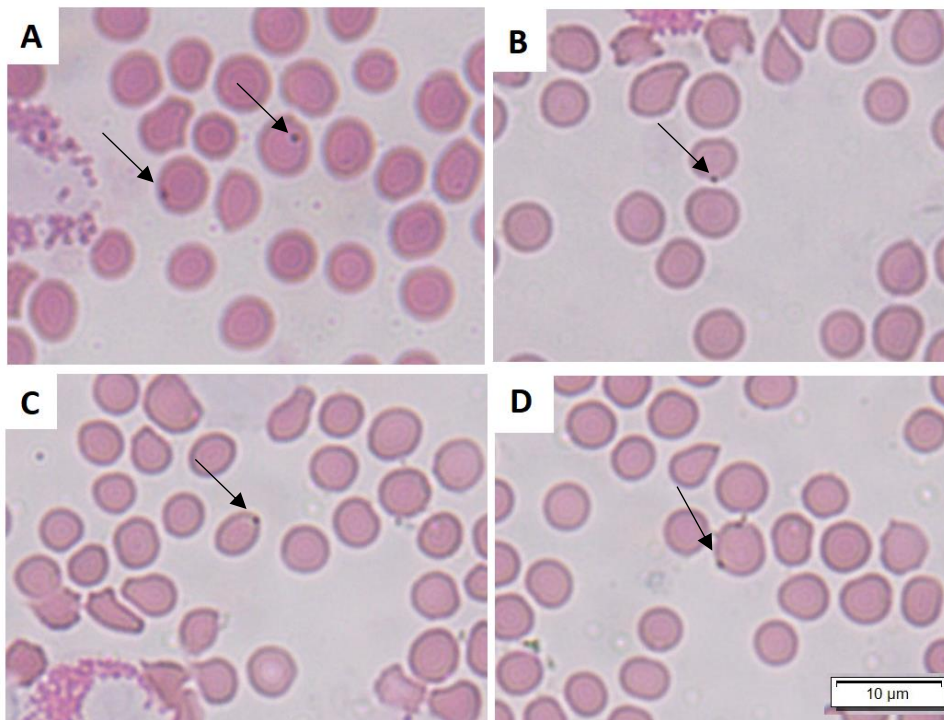
Figura 21 – Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial das amostras representadas pelos números 1 e 2.



5.2.3 3º experimento (*A. marginale*) – *O. fonsecai* e *O. brasiliensis*

Os corpúsculos de *A. marginale* presentes nas amostras de sangue coletadas dos dois bezerros estão apresentados na **Figura 22**.

Figura 22 - (A, B) Eritrócitos do bezerro 1556 e (C, D) eritrócitos do bezerro 1560 infectados com *Anaplasma marginale* (setas indicando) corados com Giemsa, aumento de 1000x. Barras 10 µm.



Fonte: Ana Carolina (2020).

Ambas as amostras extraídas dos dois bezerros foram positivas para a cPCR para o gene endógeno *gapdh* e qPCR baseados no gene *msp1β*, com média de Cq de 25,37 e 25,92 para os bezerros 1556 e 1560, respectivamente. A quantificação ficou em 10^6 de cópias de um fragmento de *msp1β*/µL de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR foram de 98,2% de eficiência, 0,979 de coeficiente de determinação, 3,367 para a inclinação e 47,388 no intercepto do eixo y.

5.2.3.1 Espécie *O. fonsecai*

- Grupo 1 (bezerro 1556) – Treze das 15 ninfas N3 alimentaram. Os pesos das ninfas antes e depois da alimentação estão apresentados na **Tabela 5**. Duas ninfas N3 mudaram para N4 entre 44-80 dias e as 11

ninfas remanescentes morreram. Após a extração do DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 23**), ambas amostras foram negativas na qPCR para *A. marginale* realizada entre 14-30 dias após a muda.

- Grupo 2 (bezerro 1560) – Doze das 15 ninfas N3 alimentaram. Os pesos das ninfas antes e depois da alimentação estão apresentados na **Tabela 5**. Onze ninfas morreram e a única ninfa restante mudou para N4 em 80 dias, mas morreu dias depois.

Tabela 5 - 3º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas de *Ornithodoros fonsecai* de cada grupo.

	Antes alimentação		N alimentados	Depois alimentação	
	Peso N=15 (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)		Peso total alimentadas (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)
Grupo 1 Bezerro 1556	20,3	1,35	13	62,7	4,82
Grupo 2 Bezerro 1560	22,9	1,53	12	54	6

Fonte: Santiago (2020).

Legenda: N: número de espécimes; mg: miligrama

5.2.3.2 Espécie *O. brasiliensis*

- Grupo 1 (bezerro 1556) – nenhuma ninfa se alimentou.
- Grupo 2 (bezerro 1560) – Duas das 6 ninfas N3 alimentaram. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 6**. Uma ninfa morreu e a outra mudou para N4 30 dias depois da alimentação. Após a extração do DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 24**), a amostra foi negativa na qPCR para *A. marginale* realizada 40 dias após a muda.

Figura 23 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial das amostras de *Ornithodoros fonsecai* representadas pelos números 1 e 2.

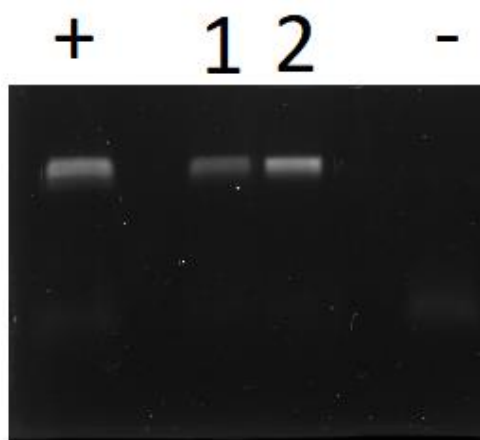


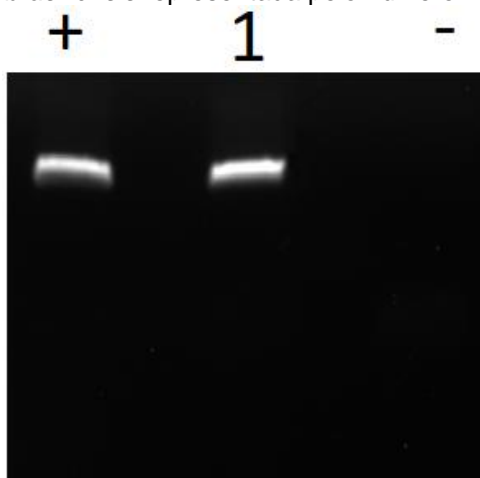
Tabela 6 - 3º experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas de *Ornithodoros brasiliensis* de cada grupo.

	Antes alimentação			Depois alimentação	
	Peso N=6 (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)	N alimentados	Peso total alimentadas (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)
Grupo 1 Bezerro 1556	31,4	5,23	-	-	-
Grupo 2 Bezerro 1560	20,3	3,38	2	13,7	6,85

Fonte: Santiago (2020).

Legenda: N: número de espécimes; mg: miligrama

Figura 24 - Banda amplificada de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial da amostra de *Ornithodoros brasiliensis* representada pelo número 1.



Referente à procedência do sangue utilizado nas alimentações, 56,6% (34/60) das ninfas N2 de *O. fonsecai* se alimentaram com sangue de bezerros naturalmente infectados com *A. marginale* (segundo, terceiro e quarto experimentos). Ao todo, 79,4% das ninfas morreram após a muda. O ganho médio de peso das ninfas foi de 38 mg e após a muda, quando submetidas a qPCR para o gene *msp1β* de *A. marginale*, 71,4% (5/7) foram negativas no momento que o ensaio foi feito entre 13-30 dias após a muda, enquanto 28,5% (2/7) foram positivas após 30 dias. Como houve positividade de *A. marginale* nas amostras submetidas ao ensaio de qPCR realizado depois de 30 dias passados da muda, infere-se que o patógeno estava em baixo número nos carrapatos nos primeiros dias e por isso não foi detectado. Portanto, é proposto que ele pode estar se multiplicando lentamente por alguma interferência que pode ser a própria imunidade do carrapato.

Com relação as ninfas de *O. brasiliensis*, alimentadas com sangue dos bezerros infectados, apenas 16,6% (2/12) se alimentaram, e destas, 50% (1/2) mudou para N4 30 dias após a alimentação e 50% (1/2) morreu. Portanto, apenas uma sobreviveu. Porém, após 40 dias da muda, a ninfa se mostrou negativa para o gene *msp1β*. O ganho médio de peso das ninfas foi de 11 mg.

5.2.4 4º experimento (*A. marginale*) – *O. fonsecai* e *O. brasiliensis*

5.2.4.1 Grupo controle

- **Espécie *O. fonsecai*** – Todas as ninfas (N3) se alimentaram e mudaram para N4 entre 32-38 dias. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 7**.
- **Espécie *O. brasiliensis*** – Nove das 10 ninfas N3 se alimentaram e mudaram para N4 dentro de 29 dias. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 8**.

Tabela 7 - 4^o experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas dos grupos controle e experimentais da espécie *Ornithodoros fonsecai*.

	Antes alimentação			Depois alimentação		
	Peso (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)	N alimentados	Peso total alimentadas (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)	
Grupo controle (n = 10)	60,3	6,03	10	160,6	16,06	
Grupos experimentais (n = 15)	1 ^a repetição	55,85	3,72	2	15,4	7,7
	2 ^a repetição	46,5	3,1	1	10,4	10,4
	3 ^a repetição	63,7	4,24	5	93,8	19,76
	4 ^a repetição	41,8	2,78	-	-	-

Fonte: Santiago (2020)

Legenda: N: número de espécimes; mg: miligrama

Tabela 8 - 4^o experimento. Peso total (em pool) e médio antes da alimentação, e peso total (em pool) e médio depois da alimentação das ninfas dos grupo controle e experimentais da espécie *Ornithodoros brasiliensis*.

	Antes alimentação			Depois alimentação		
	Peso (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)	N alimentados	Peso total alimentadas (mg)	Peso médio cada ninfa (mg)	
Grupo controle (n = 10)	81,5	8,15	9	142,9	15,87	
Grupos experimentais (n = 15)	1 ^a repetição	65,7	4,38	6	96,3	16,05
	2 ^a repetição	57,2	3,81	10	76,8	7,68
	3 ^a repetição	77,4	5,16	6	113,4	18,9
	4 ^a repetição	84,4	5,62	3	62,3	20,7

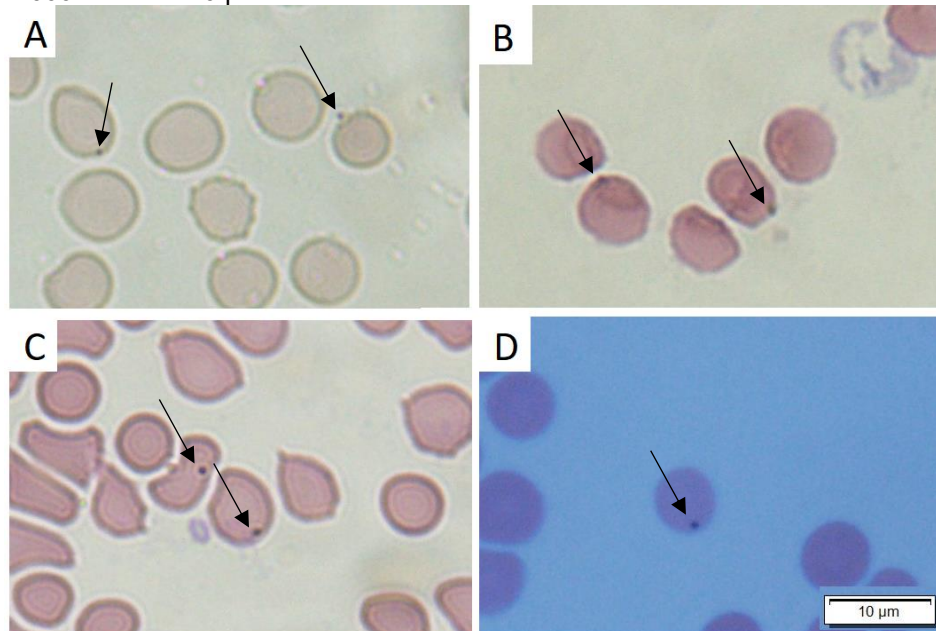
Fonte: Santiago (2020).

Legenda: N: número de espécimes; mg: miligrama

5.2.4.2 Alimentação artificial

Os corpúsculos de *A. marginale* presentes na mistura de sangue dos coelhos e as cepas nas quatro repetições estão apresentados na **Figura 25**.

Figura 25 - Eritrócitos infectados experimentalmente com *Anaplasma marginale* (setas indicando) provenientes do sangue de coelhos das quatro repetições (A, B, C e D, respectivamente) corados com Giemsa, aumento de 1000x. Barras 10 μ m.



Fonte: Ana Carolina (2020).

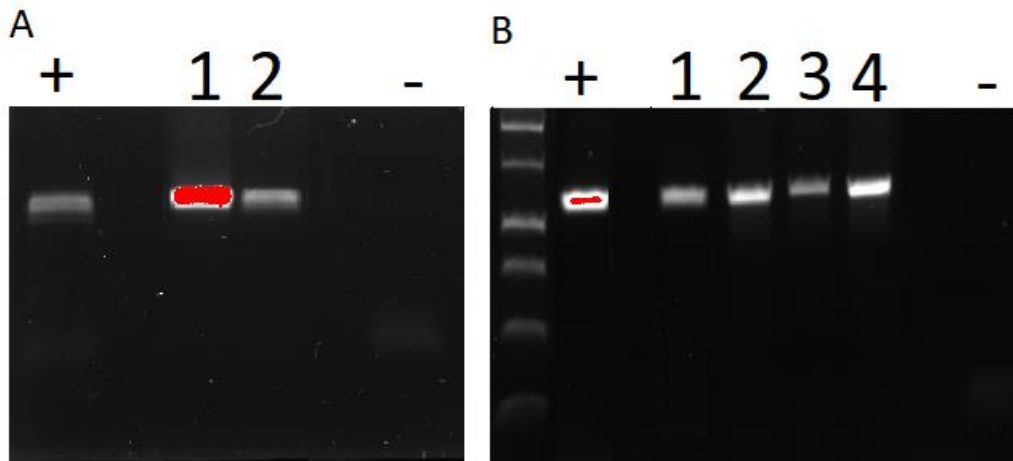
Todas as amostras (mistura sangue de coelho e as cepas) das repetições foram positivas para a cPCR para o gene endógeno *gapdh* e qPCR baseados no gene *msp1 β* , com média de Cq de 19,18; 19,45; 17,39 e 18,46 para a 1^a, 2^a, 3^a e 4^a repetição, respectivamente. A quantificação ficou em 10⁶ de cópias de um fragmento de *msp1 β* / μ L de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR foram, em média, de 95,47% de eficiência, 0,998 de coeficiente de determinação, 3,437 para a inclinação e 40,2 no intercepto do eixo y.

5.2.4.2.1 1^a repetição

- **Espécie *O. fonsecai*** - Duas das 15 ninfas N3 alimentaram. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 7**. Ambas mudaram para N4 dentro de 42 dias. Após a extração do DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 26**), ambas as amostras foram negativas na qPCR para *A. marginale* realizada 31 dias após a muda.
- **Espécie *O. brasiliensis*** - Seis das 15 ninfas N3 alimentaram. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 8**. Todas mudaram para N4 entre 28-30 dias e dessas, duas

ninfas N4 morreram em seguida. Após a extração de DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 26**), as quatro amostras foram negativas na qPCR para *A. marginale* realizada entre 20 dias após a muda.

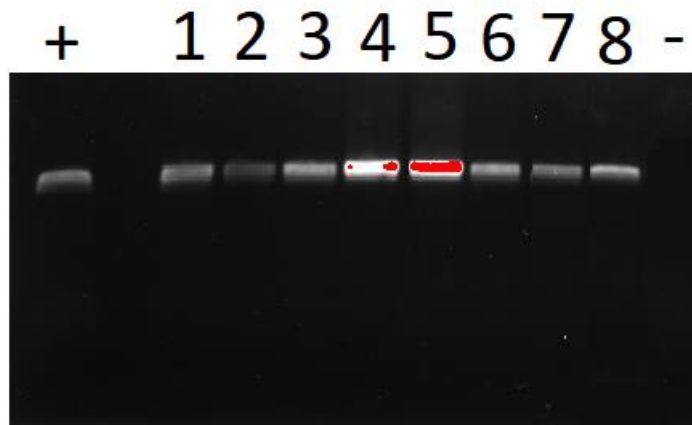
Figura 26 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial; (A) *Ornithodoros fonsecai* (amostras 1 e 2) e (B) *Ornithodoros brasiliensis* (amostras 1, 2, 3 e 4).



5.2.4.2.2 2ª repetição

- **Espécie *O. fonsecai*** – Apenas 1 ninfa N3 alimentou e morreu após 89 dias sem realizar a muda. O peso dela, antes e depois da alimentação, está apresentado na **Tabela 7**.
- **Espécie *O. brasiliensis*** – Dez ninfas N3 alimentaram e mudaram para N4 entre 29-33 dias. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 8**. Duas morreram dias depois da muda. Após a extração de DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 27**), todas as oito amostras foram negativas na qPCR para *A. marginale* realizada entre 20 dias após a muda.

Figura 27 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial das amostras 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 de *Ornithodoros brasiliensis*.

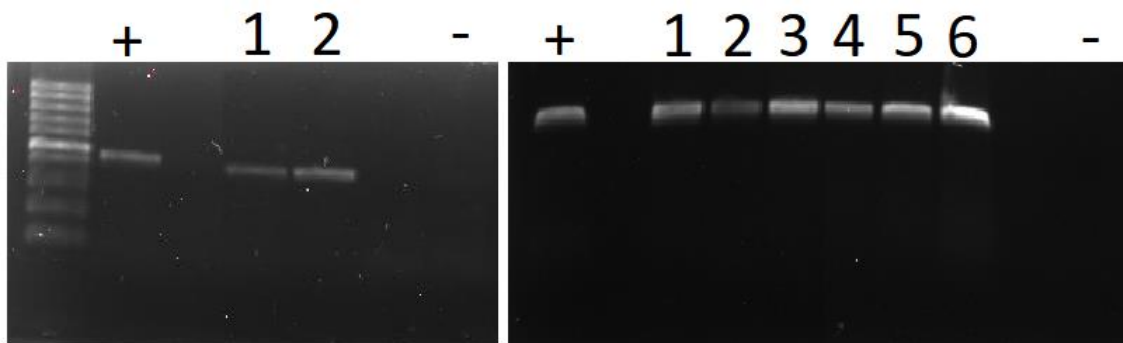


5.2.4.2.3 3ª repetição

- **Espécie *O. fonsecai*** – Cinco ninfas N3 foram alimentadas, e apenas duas mudaram para N4 e uma fêmea emergiu após 64 e 45 dias, respectivamente. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 7**. As 3 ninfas N3 remanescentes morreram. Após a extração do DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 28**), só a fêmea foi positiva na qPCR para *A. marginale* realizada 35 dias após a emergência, com média de Cq de 35,17. A quantificação ficou em 10^1 de cópias de um fragmento de $msp1\beta/\mu\text{L}$ de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR foram de 97% de eficiência, 0,990 de coeficiente de determinação, 3,396 para a inclinação e 40,216 no intercepto do eixo y.
- **Espécie *O. brasiliensis*** – Seis ninfas N3 se alimentaram e todas mudaram para N4 dentro de 35 dias. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 8**. Após a extração de DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 28**), todas as ninfas foram positivas na qPCR para *A. marginale* realizada entre 24-31 dias após a muda, com média de Cq de 30,7; 29,76; 32,4; 30,74; 28,16 e 30,5 para as ninfas 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente. A quantificação ficou entre 10^3 e 10^2 de cópias de um fragmento de $msp1\beta/\mu\text{L}$ de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR foram, em média, de 97,7% de eficiência, 0,996 de coeficiente

de determinação, 3,378 para a inclinação e 39,9 no intercepto do eixo y.

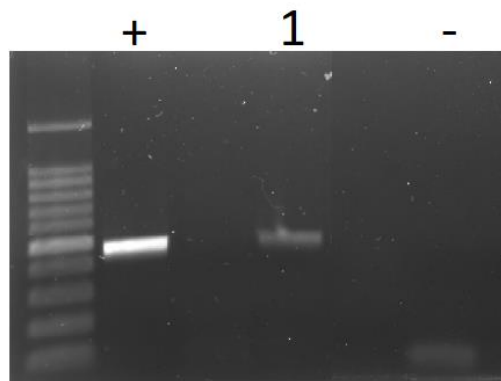
Figura 28 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial; (A) *Ornithodoros fonsecai* (amostras 1 e 2) e (B) *Ornithodoros brasiliensis* (amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6).



5.2.4.2.4 4ª repetição

- **Espécie *O. fonsecai*** – Apenas uma fêmea alimentou. Ela foi testada para verificar a transmissão transovariana de *A. marginale*. Após 14 dias da cópula (pré-oviposição), foram observados ovos seguidos de mais 17 dias para completar a oviposição. A eclosão das larvas durou 43 dias, porém todas secaram e morreram. Os pesos das ninfas antes da alimentação estão apresentados na **Tabela 7**.
- **Espécie *O. brasiliensis*** – Três ninfas N3 e um macho foram alimentados. Os pesos das ninfas, antes e depois da alimentação, estão apresentados na **Tabela 8**. Apenas uma ninfa mudou para uma fêmea dentro de 57 dias, enquanto as demais remanescentes morreram. Após a extração de DNA e a cPCR positiva para o gene 16S rRNA mitocondrial (**Figura 29**), a fêmea foi positiva na qPCR para *A. marginale* realizada 19 dias após a emergência, com média de Cq de 29,16. A quantificação ficou em 10^3 de cópias de um fragmento de *msp1β*/μL de DNA. Os parâmetros dos ensaios de qPCR foram, em média, de 97% de eficiência, 0,990 de coeficiente de determinação, 3,396 para a inclinação e 40,216 no intercepto do eixo y.

Figura 29 - Bandas amplificadas de 460 pb do gene endógeno 16S rRNA mitocondrial da amostra 1 de *Ornithodoros brasiliensis*.



Quanto às alimentações feitas com sangue de coelhos infectados experimentalmente com *A. marginale*, apenas 13,3% (8/60) das ninfas N3 de *O. fonsecai* se alimentaram considerando as quatro repetições feitas. Dessas, 50% mudaram sendo 75% (3/4) para N4 entre 42-64 dias e 25% (1/4) para fêmea em 45 dias. Quando submetidas ao ensaio de qPCR, apenas a fêmea mostrou positividade para o gene *msp1β*, o qual foi feito 35 dias após a muda. As demais ninfas alimentadas remanescentes (4/8) morreram, representando os outros 50%. O ganho médio de peso considerando todas as repetições foi de 8,6 mg, ressaltando que a última (4ª repetição) foi desconsiderada, pois nenhuma ninfa se alimentou.

Comparando com as ninfas do grupo controle, todas as ninfas de *O. fonsecai* (10/10) se alimentaram e mudaram para N4 entre 32-38 dias não tendo nenhuma perda (taxa de mortalidade). O peso médio obtido pelas ninfas alimentadas foi de 10 mg.

Quanto às ninfas de *O. brasiliensis*, 41,6% (25/60) das que se alimentaram nas quatro repetições, a muda foi observada em 92% (95,6% - 22/25 para N4; 4,3% - 1/25 para fêmea) e 24% (6/25) morreram. A partir dos espécimes sobreviventes, observou-se que 63,1% (12/19) estavam negativos quando submetidos à qPCR para *A. marginale* após 20 dias da muda, enquanto 36,8% (7/19) foram positivos entre 19-31 dias após mudarem.

O ganho médio de peso, considerando todas as repetições, foi de 3,4 mg. Comparando com as ninfas alimentadas no grupo controle, 90% (9/10) das ninfas de *O. brasiliensis* se alimentaram e todas mudaram para N4 em 29 dias

não tendo nenhuma perda (taxa de mortalidade). O peso médio obtido pelas ninfas alimentadas foi de 7,72 mg.

Contrapondo os dados obtidos utilizando os dois tipos de sangue para a alimentação artificial, as ninfas de *O. fonsecai* se fixaram mais quando alimentadas com o sangue de bezerros (56,6%) do que de coelhos (13,3%). Porém, a taxa de muda foi maior quando alimentadas nessa última técnica tendo 50% de sucesso na realização da muda e uma variação de 42-64 dias, enquanto aquelas ingurgitadas com sangue de bovino tiveram 26,4% variando entre 34-80 dias.

Com relação à mortalidade, mais espécimes morreram quando submetidos ao sangue de bezerros (79,4%) do que de coelhos (50%). Mesmo com a alta mortalidade, o ganho médio de peso das ninfas alimentadas com o sangue de bezerros foi maior do que aquelas alimentadas com sangue dos coelhos, sendo 38 mg e 8,6 mg, respectivamente. Com relação aos indivíduos de *O. brasiliensis*, foi feita apenas uma alimentação utilizando sangue de bezerro contra quatro repetições da alimentação feita com sangue de coelhos, portanto os resultados serão tendenciosos. De todo modo, 16,6% das ninfas de alimentaram com o sangue de bezerros contra 41,6% do sangue de coelhos, e posteriormente, 50% mudaram em 30 dias quando submetidas à primeira situação e 92% mudaram entre 28-57 dias na segunda. O outros 50% das ninfas que se alimentaram com sangue de bezerro morreram, em contrapartida 24% morreram quando ingurgitadas com sangue de coelhos. O ganho médio de peso das ninfas alimentadas com o sangue de coelhos foi maior do que dos bezerros, sendo 11 mg e 3,4 mg, respectivamente.

Ao todo, 35% (42/120) das ninfas de *O. fonsecai* foram alimentadas, 31% (13/42) realizaram muda entre 34-80 dias e 73,8% (31/42) morreram. Com as ninfas de *O. brasiliensis*, que foram testadas em menos experimentos, porém todas utilizando a heparina, 37,5% (27/72) se alimentaram, 88,8% (24/27) mudaram entre 28-57 dias e 26% (7/27) morreram. Schwan et al. (1991) observaram que utilizando variados tipos de dietas e anticoagulantes como sangue bovino heparinizado, sangue bovino heparinizado e hemolisado, sangue de rato heparinizado e sangue de ovino desfibrilado, e parafilme como membrana através da alimentação artificial, ninfas e adultos de *O. moubata* demonstraram preferência ao primeiro tipo de dieta, sendo o mais satisfatório

entre as outras opções, obtendo uma taxa de mortalidade inferior a 5% nas fêmeas alimentadas. Ben-Yakir e Galun (1993) compararam o comportamento alimentar de *O. tholozani* e *O. moubata* usando várias dietas, membranas e condições de alimentação. Uma dessas condições foi a adição de cera fresca de orelha de coelho à membrana, o que mostrou correlação positiva entre a taxa de alimentação e a velocidade de fixação dos carrapatos de ambas as espécies. O acréscimo de um estimulador ao aparato de alimentação é um fator importante, pois ele aproxima a simulação de alimentação dos carrapatos ao ambiente da alimentação em hospedeiros. No presente estudo, o estimulador utilizado foi o friccionar da membrana de parafilme na pele dos coelhos e inserir pelos nas câmaras de contenção, a fim de estimular o repasto sanguíneo.

Independente do anticoagulante e a procedência do sangue utilizado para alimentar as ninfas das espécies *O. fonsecai* e *O. brasiliensis*, o uso do parafilme como membrana permitiu o fácil manuseio dos carrapatos, além de não ter causado o extravasamento do sangue conforme os espécimes se fixavam e se desprendiam quando ingurgitados. No total, 40% (52/130) das ninfas de *O. fonsecai* se alimentaram enquanto 43,9% (36/82) da espécie *O. brasiliensis* ingurgitaram utilizando esse tipo de membrana. Lewis et al. (2019) observaram que ao alimentarem artificialmente adultos de *O. tartakovskyi* com um aparato de alimentação feito com parafilme como membrana, 89% (172/193) dos carrapatos ingurgitaram. Esses autores ainda reforçam a importância e vantagens que a alimentação artificial oferece para aqueles que estudam esses artrópodes, como a utilização da baixa quantidade de sangue usado para a realização do repasto sanguíneo, levando à redução do uso de animais vertebrados como cobaias e a conservação e reutilização do material montado para o sistema de alimentação.

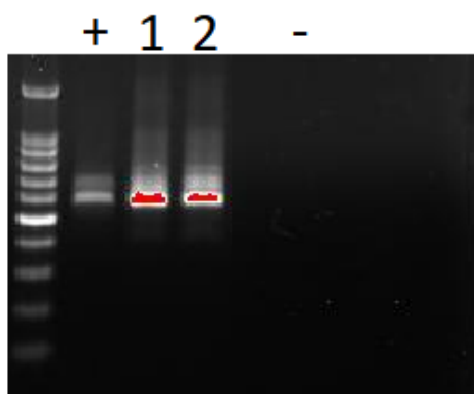
5.3 Ensaios de cPCR para *A. marginale* baseados no gene *msp1α* e análise de identidade das sequências obtidas pelo BLASTn

5.3.1 1º experimento

A partir das duas amostras positivas de *O. fonsecai* submetidas ao ensaio de qPCR, ambas mostraram positividade para o fragmento do gene *msp1α* (**Figura 30**). Após purificadas e submetidas ao sequenciamento, as

sequências obtiveram qualidade referente ao gene *msp1α*, por meio de análise de qualidade feita pelo programa Phred Phrap. Quando submetidas ao BLASTn, revelaram porcentagem de identidade variando de 96,07% a 96,92% com sequências de *A. marginale* (KJ575590) e (KJ575560) previamente depositadas no GenBank e cobertura de 100%.

Figura 30 – Bandas amplificadas do gene *msp1α* das amostras 1 e 2 de *Ornithodoros fonsecai*.



5.3.2 4º experimento

5.3.2.1 3ª repetição

- **Espécie *O. fonsecai*** – A única amostra positiva no ensaio de qPCR, mostrou positividade para o fragmento do gene *msp1α* (**Figura 31**). As sequências obtidas apresentaram picos duplos nos eletroferogramas, inviabilizando as análises posteriores dessas sequências e indicando uma provável co-infecção entre estirpes diferentes de *A. marginale* em um mesmo animal.
- **Espécie *O. brasiliensis*** – As seis amostras positivas no ensaio de qPCR mostraram positividade para o fragmento do gene *msp1α* (**Figura 32**). Após purificadas e submetidas ao sequenciamento, apenas três amostras formaram sequências consenso, obtendo qualidade referente ao gene *msp1α*, por meio de análise de qualidade feita pelo programa Phred Phrap. Quando submetidas ao BLASTn, revelaram porcentagem de identidade variando de 96,49% a 100% com sequências de *A. marginale* (KJ626203) e (CP023731) previamente depositadas no GenBank e cobertura de 100%.

Figura 31 – Bandas amplificadas do gene *msp1α* da amostra 1 de *Ornithodoros fonsecai*.

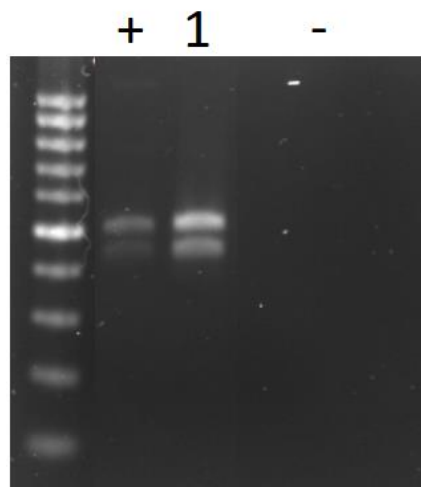
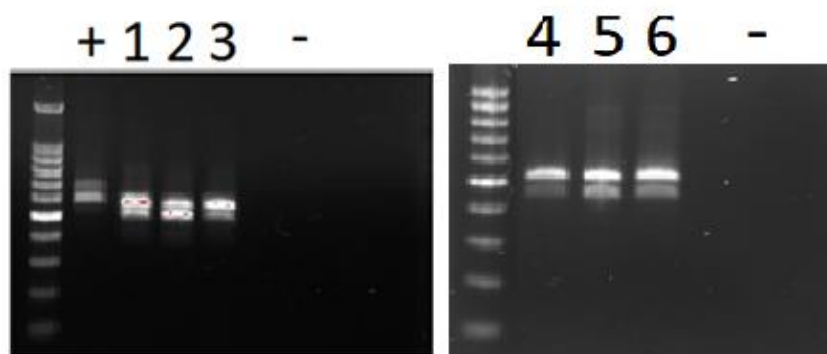


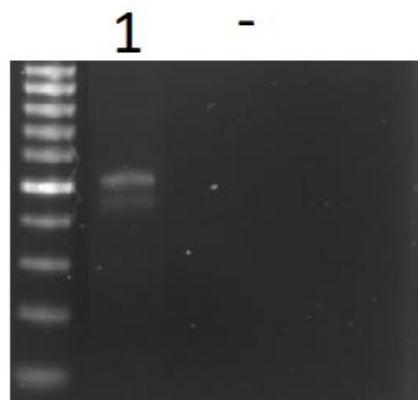
Figura 32 – Bandas amplificadas do gene *msp1α* das amostras 1, 2, 3, 4, 5 e 6 de *Ornithodoros brasiliensis*.



5.3.2.2 4ª repetição

- **Espécie *O. brasiliensis*** – A única amostra positiva para o ensaio de qPCR, mostrou positividade para o fragmento do gene *msp1α* (**Figura 33**). As sequências obtidas apresentaram picos duplos nos eletroferogramas, inviabilizando as análises posteriores dessas sequências e indicando uma provável co-infecção entre estirpes diferentes de *A. marginale* em um mesmo animal.

Figura 33 – Bandas amplificadas do gene *msp1α* da amostra 1 de *Ornithodoros brasiliensis*.



5.4 Classificação de genótipo de *A. marginale*

Foram encontradas 6 estirpes a partir de quatro amostras, uma vez que as demais obtiveram picos duplos no sequenciamento, inviabilizando as análises. São elas: Is9; 78; 24-2; 25; 23; α; β. (Tabela 9).

Tabela 9 – Caracterização dos genótipos e estirpes das amostras positivas para o gene *msp1α* de *A. marginale*, com número do experimento, espécie do carrapato, amostra e estimativa da riquetsemia por qPCR absoluta, de acordo com o banco de dados do *RepeatAnalyzer*.

Nº experimento	Espécie	Amostra	Riquetsemia absoluta qPCR (<i>msp1β</i> /μL)	Genótipo (Estrada-Peña et al., 2009)	Estirpe (Catanese et al., 2016)
2	<i>O. fonsecai</i>	1 ninfa N3	2.79x10 ³	*	Is9; 78 24-2 25
2	<i>O. fonsecai</i>	1 ninfa N3	6.9x10 ⁴	F	Is9; 78 24-2 25
5	<i>O. brasiliensis</i>	1 ninfa N4	1.42x10 ²	H	23
5	<i>O. brasiliensis</i>	1 ninfa N4	6.17x10 ²	H	α β

* Não foi possível identificar o genótipo.

Com base no gene *msp1α*, foi possível observar pouca diversidade de estirpes encontradas nas amostras de carrapatos. Através da classificação de genótipo sugerida por Estrada-Peña et al. (2009), observou-se dois genótipos diferentes, sendo o genótipo H o mais frequente (2/3), e o genótipo F (1/3).

6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos dos testes, infere-se que as fêmeas das populações do Ceará e de Pernambuco são hábeis de ovipôr sem realizar

o repasto sanguíneo constatando a autogenia. Porém, autogenia não foi constatada para a população de *O. fonsecai* de Bonito.

Utilizando membrana de parafilme e a heparina como anticoagulante no sistema de alimentação artificial do presente estudo, conclui-se que o método foi eficaz para alimentar as ninfas de *O. fonsecai* e *O. brasiliensis*, tanto com sangue de bezerros naturalmente infectado com *A. marginale* quanto de coelhos infectado experimentalmente com a cepa Jaboticabal da mesma bactéria.

Ninfas da espécie *O. fonsecai* se alimentaram melhor com o sangue de bezerros considerando o número de espécimes ingurgitados e a média de ganho de peso, porém as taxas de muda e mortalidade são menores e maiores, respectivamente, quando confrontadas com a alimentação com sangue de coelhos. Já para a espécie *O. brasiliensis*, o sangue de coelhos foi mais eficiente para alimentar as ninfas levando em consideração o número de espécimes ingurgitados, a média de ganho de peso, as taxas de muda e mortalidade.

Quanto a transmissão transestadial de *A. marginale*, ambas as espécies foram positivas, representando um total de 27,2% (3/11) e 35% (7/20) de *O. fonsecai* e *O. brasiliensis*, respectivamente. Além disso, foram encontradas 6 estirpes de *A. marginale* nas ninfas alimentadas artificialmente tanto com sangue de bezerros naturalmente infectados quanto com sangue de coelhos experimentalmente infectados com a bactéria.

7. REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **Journal of molecular biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410, 1990.

ARAGÃO, H. de B. *Ornithodoros brasiliensis* n. sp. **Brazil Médico**, v. 37, n. 20, 1923.

ARAGÃO, H. de B. Notas sobre os *Ornithodoros brasiliensis*, *rostratus* e *turicata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, p. 227-231, 1931.

ARAGÃO, H. de B. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, n. 4, p. 759–843, 1936.

ARULKANTHAN, A.; BROWN, W. C.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P. Biased immunoglobulin G1 isotype responses induced in cattle with DNA expressing msp1a of *Anaplasma marginale*. **Infection and immunity**, v. 67, n. 7, p. 3481-3487, 1999.

BAKKES, D. K.; KLERK, D.; LATIF, A. A.; MANS, B. J. Integrative taxonomy of Afrotropical *Ornithodoros* (*Ornithodoros*) (Acari: Ixodida: Argasidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 4, p. 1006–1037, 2018.

BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)-vectors of disease in man and animals. In: **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**. Entomological Society of America, 1972.

BARBIER, E.; BERNARD, E.; DANTAS-TORRES, F. Ecology of *Antricola* ticks in a bat cave in north-eastern Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 82, n. 2, p. 255–264, 2020.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M., BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical**: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOARES, J. F.; MARCILI, A.; FAMADAS, K. M.; FACCINI, J. L. H.; RAMIREZ, D. G.; DOYLE, R. L.; MARTINS, J. R.; JUNIOR, J. R.; GUGLIELMONE, A. A.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): Description of the larva,

redescription of male and female, and neotype designation. **Zootaxa**, v. 3178, n. 31, p. 22–32, 2012.

BARROS-BATTESTI, D. M.; LANDULFO, G. A.; LUZ, H. R.; MARCILI, A.; ONOFRIO, V. C.; FAMADAS, K. M. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2015.

BATTILANI, M.; DE ARCANGELI, S.; BALBONI, A.; DONDI, F. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 49, p. 195-211, 2017.

BEN-YAKIR, D.; GALUN, R. Comparative study of two argasid tick species: feeding response to phagostimulants. **Israel Journal of Zoology**, v. 39, n. 2, p. 169–176, 1993.

BENSON, D. A.; MIZRACHI, I. K.; LIPMAN, D. J.; OSTELL, J.; RAPP, B. A.; WHEELER, D. I. GenBank. **Nucleic acids research**, v. 30, n. 1, p. 17-20, 2002.

BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Development and evaluation of a seminested PCR for detection and differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian genotype) and *B. canis* DNA in canine blood samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 9, p. 4172-4177, 2003.

BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 21, p. 10034-10038, 1994.

BLOMSTRÖM, A. L.; LUZ, H. R.; ÖHLUND, P.; LUKENGE, M.; BRANDÃO, P. E.; LABRUNA, M. B.; BERG, M. Novel viruses found in *Antricola* ticks collected in bat caves in the western Amazonia of Brazil. **Viruses**, v. 12, n. 1, p. 1–14, 2019.

BRAYTON, K. A.; KAPPMEER, L. S.; HERNDON, D. R.; DARK, M. J.; TIBBALS, D. L.; PALMER, G. H.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P., JR. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two

superfamilies of outer membrane proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 3, p. 844-849, 2005.

BRITES-NETO, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F. Tick-borne infections in human and animal population worldwide. **Veterinary World**, v. 8, n. 3, p. 301–315, 2015.

BRUNEAU, A.; DERNBURG, A.; CHAUVE, C.; ZENNER, L. First in vitro cycle of the chicken mite, *Dermanyssus gallinae* (DeGeer 1778), utilizing an artificial feeding device. **Parasitology**, v. 123, p. 583–589, 2001.

BURGDORFER, W.; VARMA, M. G. R. Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 12, n. 1, p. 347–376, 1967.

BUTLER, J. F.; HESS, W. R.; ENDRIS, R. G.; HOLSCHER, K. H. In vitro feeding of *Ornithodoros* ticks for rearing and assessment of disease transmission. **Acarology VII/Editors, DA Griffiths and CE Bowman**, 1984.

CABEZAS-CRUZ, A.; PASSOS, L. M. F.; LIS, K.; KENNEIL, R.; VALDÉS, J. J.; FERROLHO, J.; TONK, M.; POHL, A. E.; GRUBHOFFER, L.; ZWEYGARTH, E.; SHKAP, V.; RIBEIRO, M. F. B.; ESTRADA-PEÑA, A.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65243, 2013.

CABEZAS-CRUZ, A.; DE LA FUENTE, J. *Anaplasma marginale* major surface protein 1a: a marker of strain diversity with implications for control of bovine anaplasmosis. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 6, n. 3, p. 205-210, 2015.

CAMICAS, J. L.; HERVY, J. P.; ADAM, F.; MOREL, P. C. **The Ticks of the World (Acarida: Ixodida): Nomenclature, described stages, hosts, distribution (including new species described before 1/01/96)**. Paris: Orstom, 1998.

CARELLI, G.; DECARO, N.; LORUSSO, A.; ELIA, G.; LORUSSO, E.; MARI, V.; CECI, L.; BUONAVOGLIA, C. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. **Veterinary microbiology**, v. 124, n. 1-2, p. 107-114, 2007.

CASTAÑEDA-ORTIZ, E. J.; UETI, M. W.; CAMACHO-NUEZ, M.; MOSQUEDA, J. J.; MOUSEL, M. R.; JOHNSON, W. C. PALMER, G. H. Association of *Anaplasma marginale* strain superinfection with infection prevalence within tropical regions. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015.

CATANESE, H. N.; BRAYTON, K. A.; GEBREMEDHIN, A. H. RepeatAnalyzer: a tool for analysing and managing short-sequence repeat data. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, p. 422, 2016.

CLIFFORD, C. M.; KOHLS, G. M.; SONENSHINE, D. E. The Systematics of the Subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). I. The Genera and Subgenera. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 57, n. 4, p. 429–437, 1964.

DA SILVA, N. B.; TAUS, N. S.; JOHNSON, W. C.; MIRA, A.; SCHNITTGER, L.; VALENTE, J. D.; VIDOTTO, O.; MASTERSON, H. E.; VIEIRA, T. S. W. J.; UETI, M. W.; VIEIRA, R. F. First report of *Anaplasma marginale* infection in goats, Brazil. **PLoS One**, v. 13, n. 8, p. 1–6, 2018.

DE LA FUENTE, J. GARCIA GARCIA, J. C.; BLOUIN, E. F.; RODRÍGUEZ, S. D.; GARCIA, M. A.; KOCAN, K. M. Evolution and function of tandem repeats in the major surface protein 1a of the ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Animal Health Research Reviews**, v. 2, n. 2, p. 163, 2001.

DE LA FUENTE, J.; VAN DEN BUSSCHIE, R. A.; PRADO, T.; KOCAN, K. M. *Anaplasma marginale* msp1 α genotypes evolved under positive selection pressure but are not markers for geographic isolates. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 4, p. 1609-1616, 2003.

DE LA FUENTE, J.; LEW, A.; LUTZ, H.; MELI, M. L.; HOFMANN-LEHMANN, R.; SHKAP, V.; MOLAD, T.; MANGOLD, A. J.; ALMAZÁN, C.; NARANJO, V.; GORTÁZAR, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; GARCIA-PEREZ, A. L.; BARRAL, M.; OPORTO, B.; CECI, L.; CARELLI, G.; BLOUIN, E. F.; KOCAN, K. M. Genetic diversity of *Anaplasma* species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. **Animal health research reviews**, v. 6, n. 1, p. 75-89, 2005.

DE LA FUENTE, J. RUYBAL, P.; MTSALI, M. S.; NARANJO, V.; SHUQING, L.; MANGOLD, A. J.; RODRÍGUEZ, S. D.; JIMÉNEZ, R.; VICENTE, J.; MORETTA, R.; TORINA, A.; ALMAZÁN, C.; MBATI, P. M.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; FARBER, M.; ROSARIO-CRUZ, R.; GORTAZAR, C.; KOCAN, K. M. Analysis of world strains of *Anaplasma marginale* using major surface protein 1a repeat sequences. **Veterinary microbiology**, v. 119, n. 2-4, p. 382-390, 2007.

DE SOUZA RAMOS, I. A.; HERRERA, H. M.; DE JESUS FERNANDES, S.; DO AMARAL, R. B. ZANATTO, D. C. S.; DA SILVA, T. M. V.; HORTA, B. L. S.; CAMPOS, J. B. V.; ALVES, J. V. A.; MACEDO, G. C.; MACHADO, R. Z. ANDRÉ, M. R. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in beef cattle in the Brazilian Pantanal. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 4, p. 805-814, 2019.

DI PRIMIO, R. Transmissores de doenças no Rio Grande do Sul. **Arquivos Rio-Grandenses de Medicina**, v. 306, p. 406-408, 1937.

DALL'AGNOL, B.; SSCHOTT, D.; PADILHA, T.; ANTUNES, P.; SOUZA, U. A.; WEBSTER, A.; SOUZA, G. D.; FERREIRA, C. A. S.; Reck, J. Clinical Findings Associated with *Ornithodoros brasiliensis* Tick Parasitism in Travelers, Southern Brazil. **Wilderness & Environmental Medicine**, v. 30, n. 4, p. 437-440, 2019.

DANTAS-TORRES, F. Species Concepts: What about Ticks? **Trends in Parasitology**, v. 34, n. 12, p. 1017–1026, 2018.

DANTAS-TORRES, A. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 14, n. 1, p. 30–46, 2009.

DANTAS-TORRES, F.; VENZAL, J. M.; BERNARDI, L. F.; FERREIRA, R. L.; ONOFRIO, V. C.; MARCILI, A.; BERMÚDEZ, S. E.; RIBEIRO, A. F.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Description of a New Species of Bat-Associated Argasid Tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 36–45, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T. F.; MUÑOZ-LEAL, S.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated

species checklist and taxonomic keys. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 6, 2019.

DAVIS, G., E. Observations on the Biology of the Argasid Tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923, with the Recovery of a Spirochete, *Borrelia brasiliensis*, n. sp. **The Journal of Parasitology**, v. 38, n. 5, p. 473–476, 1952.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 2145–2165, 2001.

ENDRIS, R. G.; HESS, W. R.; CAIADO, J. M. African swine fever virus infection in the Iberian soft tick, *Ornithodoros (Pavlovskyella) maroccanus* (Acari: Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 29, n. 5, p. 874–878, 1992.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; TRAJANO, E.; FIRMINO, J. V. L. Three new species of *Antricola* (Acari: Argasidae) from Brazil, with a key to the known species in the genus. **Journal of Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 490–498, 2004.

ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; TRAMUTA, C.; TOMASSONE, L.; DE LA FUENTE, J.; LABRUNA, M. B. Observations on *Antricola* ticks: Small nymphs feed on mammalian hosts and have a salivary gland structure similar to ixodid ticks. **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 953–955, 2008.

ESTRADA-PEÑA, A. NARANJO, V.; ACEVEDO-WHITEHOUSE, K.; MANGOLD, A. J.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. **BMC biology**, v. 7, n. 1, p. 57, 2009.

ESTRADA-PEÑA, A.; MIHALCA, A. D.; PETNEY, T. N. **Ticks of Europe and North Africa: a guide to species identification**. Springer, 2017.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A Review of the Ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, Their Hosts and Geographic Distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453–470, 2000.

EWING, C. A.; RUMSEY, D. H.; LANQBERG, A. F.; SANDLER, S. G. Immunoprophylaxis using intravenous Rh immune globulin should be standard practice when selected D-negative patients are transfused with D-positive random donor platelets. **Immunoematology**, v. 14, n. 4, p. 133-137, 1998.

FELDMAN-MUHSAM, B. Autogeny in soft ticks of the genus *Ornithodoros* (Acari: Argasidae). **The Journal of Parasitology**, p. 536-539, 1973.

FELDMAN-MUHSAM, B.; HAVIVI, Y. Autogeny in the tick *Ornithodoros tholozani* (Ixodoidea, Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 10, n. 2, p. 185-189, 1973.

FERREIRA, A. M. T.; SUZART, S.; VIDOTTO, O.; KNOWLES, D. P.; VIDOTTO, M. C. Use of repetitive DNA elements to define genetic relationships among *Anaplasma marginale* isolates. **FEMS microbiology letters**, v. 197, n. 2, p. 139-143, 2001.

FONSECA, A.; BRAGA, A. **Noções sobre a tristeza parasitária dos bovinos [Piroplasmose, Anaplasnose]**. 1924.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. C. The argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names. **Zootaxa**, v. 6, n. 2528, p. 1–28, 2010.

HEATH, A. C. G. New species of soft tick (Ixodoidea: Argasidae) from the New Zealand less short-tailed bat, *Mystacina tuberculata* Gray. **Tuhinga**, v. 23, p. 29–37, 2012.

HINDLE, E.; MERRIMAN, G. The Sensory Perceptions of *Argas persicus* (Oken). **Parasitology**, v. 5, n. 3, p. 203–216, 1912.

HOKAMA, Y.; LANE, R. S.; HOWARTH, J. A. Maintenance of adult and nymphal *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) by Artificial Feeding Through a Parafilm Membrane. **Journal Medical Entomology**, v. 24, n. 3, p. 319–323, 1987.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid Ticks as Parasites and Vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, n. C, p. 135–238, 1985.

JAIMES-DUEÑEZ, J.; TRIANA-CHÁVEZ, O.; MEJÍA-JARAMILLO, A. M. Genetic, host and environmental factors associated with a high prevalence of *Anaplasma marginale*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 9, n. 5, p. 1286-1295, 2018.

KAWAHARA, M.; RIKIHISA, Y.; ISOGAI, E.; TAKAHASHI, M.; MISUMI, H.; SUTO, C.; SHIBATA, S.; ZHANG, C.; TSUJI, M. Ultrastructure and phylogenetic analysis of 'Candidatus Neoehrlichia mikurensis' in the family Anaplasmataceae, isolated from wild rats and found in *Ixodes ovatus* ticks. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 5, p. 1837–1843, 2004.

KEIRANS, J. E.; CLIFFORD, C. M. *Nothoaspis reddelli*, New Genus and New Species (Ixodoidea: Argasidae), from a Bat Cave in Mexico. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 68, n. 1, p. 81–85, 1975.

KERSTERS, K.; de VOS, P.; GILIS, M.; SWINGS, J.; VANDAMME, P.; STACKEBRANDT, E. Introduction to the Proteobacteria. In: DWORKIN, M.; FALKOW, S.; ROSENBERG, E.; SCHLEIFER, K. H.; STACKEBRANDR, E. (Eds.), **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiological community**. Springer, 2006.

KHALI, G. M.; HOOGSTRAAL, H. The life cycle of *Ornithodoros (Alectorobius) amblyus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 18, n. 2, p. 134-139, 1981.

KIM, H. J.; FILATOV, S.; LOPEZ, J. E.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; TEEL, P. D. Blood feeding of *Ornithodoros turicata* larvae using an artificial membrane system. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 31, n. 2, p. 230–233, 2017.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; GUGLIELMONE, A. A.; MELÉNDEZ, R. D. Antigens and alternatives for control of *Anaplasma marginale* infection in cattle. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 4, p. 698-712, 2003.

KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host–pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v. 129, p. 285-300, 2004.

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

LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 54, n. 4, p. 355–363, 2009.

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; MARCILI, A.; BARBIERI, A. R.; NUNES, P. H.; HORTA, M. C.; VENZAL, J. M. A new argasid tick species (Acari: Argasidae) associated with the rock cavy, *Kerodon rupestris* Wied-Neuwied (Rodentia: Caviidae), in a semiarid region of Brazil. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

LAFRI, I.; EL HAMZAOU, B.; BITAM, I.; LEULMI, H.; LALOUT, R.; MEDIANNIKOV, O.; CHERGUI, M.; KARAKELLAH, M.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Detection of relapsing fever *Borrelia* spp., *Bartonella* spp. and Anaplasmataceae bacteria in argasid ticks in Algeria. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–13, 2017.

LANDULFO, G. A.; PEVIDOR, L. V.; DOS SANTOS SAMPAIO, J.; LUZ, H. R.; ONOFRIO, V. C.; FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. M. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, n. 1, p. 69–80, 2012.

LANE, R. S.; MANWEILER, S. A. *Borrelia coriaceae* in its tick vector, *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae), with emphasis on transstadial and transovarial infection. **Journal of Medical Entomology**, v. 25, n. 3, p. 172–177, 1988.

LEWIS, C. E.; BARTHOLOMAY, L. C.; BLANCHONG, J. A. Feeding of adult *Ornithodoros tartakovskyi* ticks using a modified artificial membrane feeding system. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 34, n. 1, p. 1–4, 2019.

LI, H.; JIANG, J. F.; LIU, W.; ZHENG, Y. C.; HUO, Q. B.; TANG, K.; ZUO, S. Y.; LIU, K.; JIANG, B. G.; YANG, H.; CAO, W. C. Human infection with *Candidatus Neoehrlichia mikurensis*, China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 10, p. 1636–1639, 2012.

LUZ, H. R.; MUÑOZ-LEAL, S.; ALMEIDA, J. C. D.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B. Ticks parasitizing bats (Mammalia: Chiroptera) in the Caatinga Biome, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 4, p. 484–491, 2016.

MACHADO, R. Z.; SILVA, J. B. D.; ANDRÉ, M. R.; GONÇALVES, L. R.; MAOS, C. A.; OBREGÓN, D. Outbreak of anaplasmosis associated with the presence of different *Anaplasma marginale* strains in dairy cattle in the states of São Paulo and Goiás, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 24, n. 4, p. 438-446, 2015.

MACLEOD, J. Arthropod transmission of micro-organisms. **Nature**, v. 191, n. 4791, p. 885-888, 1961.

MANGO, C. K.; GALUN, R. *Ornithodoros moubata*: Breeding in vitro. **Experimental Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 282–288, 1977.

MARTINS, J. R.; DOYLE, R. L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; GUGLIELMONE, A. A. Occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 40, n. 1, p. 143-144, 2011.

MARTINS, T. F.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; COSTA, F. B.; MARCILI, A.; CAMARGO, L. M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. New tick records

from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 62, n. 1, p. 121–128, 2014.

MASSARD, C. L.; FREIRE, R. B. Etiology, signs and diagnosis of bovine babesias in Brazil. **Hora Veterinaria**, 1985.

MONTES, A. C.; CUADRILLERO, C.; VILELLA, D. Maintenance of a Laboratory Colony of *Cimex lectularius* (Hemiptera: Cimicidae) Using an Artificial Feeding Technique. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 4, p. 675–679, 2002.

MÜLLER, A.; MONTI, G.; OTTH, C.; SEPÚLVEDA, P.; BITTENCOURT, P.; NACHUMBIALA, Y.; GUTIÉRREZ, R.; HARRUS, S. “*Candidatus Neoehrlichia chilensis*” sp. nov.: Molecular detection and characterization of a novel Anaplasmataceae in wild rodents from Valdivia, southern Chile. **Transboundary and Emerging Diseases**, v. 65, n. 2, p. 357–362, 2018.

MUÑOZ-LEAL, S.; ERIKSSON, A.; SANTOS, C. F.; FISCHER, E.; DE ALMEIDA, J. C.; LUZ, H. R.; LABRUNA, M. B. Ticks infesting bats (Mammalia: Chiroptera) in the Brazilian Pantanal. **Experimental and Applied Acarology**, v. 69, n. 1, p. 73–85, 2016.

MUÑOZ-LEAL, S.; TOLEDO, L. F.; VENZAL, J. M.; MARCILI, A.; MARTINS, T. F.; ACOSTA, I. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: *Ornithodoros*) associated with stream-breeding frogs (Anura: Cycloramphidae: *Cycloramphus*) in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 5, p. 682–692, 2017.

MUÑOZ-LEAL, S.; TERASSINI, F. A.; LUZ, H. R.; FONTANA, I.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. First report of *Ornithodoros peropteryx* in Brazil, and the occurrence of *Ornithodoros cavernicolous* in the western Brazilian Amazon. **Systematic and Applied Acarology**, v. 23, n. 11, p. 2113–2121, 2018a.

MUÑOZ-LEAL, S.; VENZAL, J. M.; NAVA, S.; REYES, M.; MARTINS, T. F.; LEITE, R. C.; VILELA, V. L. R.; BENATTI, H. R.; RÍOS-ROSAS, D.; BARROS-BATTESTI, D. M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; LABRUNA, M. B. The geographic distribution of *Argas (Persicargas) miniatus* and *Argas (Persicargas) persicus* (Acari: Argasidae) in America,

with morphological and molecular diagnoses from Brazil, Chile and Cuba. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 9, n. 1, p. 44–56, 2018b.

MUÑOZ-LEAL, S.; FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A.; COSTA, F. B.; MARCILI, A.; MESQUITA, E. T. K. C.; MARQUES JR, E. P.; LABRUNA, M. B. Isolation and molecular characterization of a relapsing fever *Borrelia* recovered from *Ornithodoros rudi*s in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 9, n. 4, p. 864-871, 2018c.

MUÑOZ-LEAL, S.; MACEDO, C.; GONÇALVES, T. C.; BARREIRA, J. D.; LABRUNA, M. B.; DE LEMOS, E. R. S.; OGRZEWALSKA, M. Detected microorganisms and new geographic records of *Ornithodoros rietcorrei* (Acari: Argasidae) from northern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 10, n. 4, p. 853–861, 2019a.

MUÑOZ-LEAL, S.; TERASSINI, F. A.; MARCILI, A.; OLIVEIRA, G. M.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. A third species of *Nothoaspis* Keirans & Clifford, 1975 (Acari: Argasidae): *Nothoaspis setosus* (Kohls, Clifford & Jones, 1969) n. comb. **Systematic Parasitology**, v. 96, n. 7, p. 595–602, 2019b.

MUÑOZ-LEAL, S.; LOPES, M. G.; MARCILI, A.; MARTINS, T. F.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; LABRUNA, M. B. Anaplasmataceae, *Borrelia* and *Hepatozoon* agents in ticks (Acari: Argasidae, Ixodidae) from Chile. **Acta Tropica**, v. 192, p. 91–103, 2019c.

MUÑOZ-LEAL, S.; VENZAL, J. M.; NAVA, S.; MARCILI, A.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B. Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: *Ornithodoros*) parasite of *Octodon degus* (Rodentia: Octodontidae) in northern Chile. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 3, 2020.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; MANGOLD, A. J.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Description of a New Argasid Tick (Acari: Ixodida) from Bat Caves in Brazilian Amazon. **Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1089–1101, 2010.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; MANGOLD, A. J.; CAMARGO, L. M. A.; CASAS, G.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros guaporensis* (Acari, Ixodida: Argasidae), a new tick species from the guaporé river Basin in the bolivian Amazon. **Zootaxa**, v. 3666, n. 4, p. 579–590, 2013.

OLIVER JR, J. H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1, p. 397–430, 1989.

ONDRUŠ, J.; BALÁŽOVÁ, A.; BALÁŽ, V.; ZECHMEISTEROVÁ, K.; NOVOBILSKÝ, A.; ŠIROKÝ, P. *Candidatus* Neoehrlichia mikurensis is widespread in questing *Ixodes ricinus* ticks in the Czech Republic. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 3, 2020.

PALMER, G. H.; ABBOTT, J. R.; FRENCH, D. M.; MCELWAIN, T. F. Persistence of *Anaplasma ovis* infection and conservation of the msp-2 and msp-3 multigene families within the genus *Anaplasma*. **Infection and immunity**, v. 66, n. 12, p. 6035-6039, 1998.

PALMER, G. H.; RURANGIRWA, F. R.; KOCAN, K. M.; BROWN, W. C. Molecular basis for vaccine development against the Ehrlichial pathogen *Anaplasma marginale*. **Parasitology Today**, v. 15, n. 7, p. 281-286, 1999.

PALMER, G. H.; BROWN, W. C.; RURANGIRWA, F. R. Antigenic variation in the persistence and transmission of the ehrlichia *Anaplasma marginale*. **Microbes and infection**, v. 2, n. 2, p. 167-176, 2001.

PAROLA, P.; RYELANDT, J.; MANGOLD, A. J.; MEDIANNIKOV, O.; GUGLIELMONE, A. A.; RAOULT, D. Relapsing fever *Borrelia* in *Ornithodoros* ticks from Bolivia. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 105, n. 5, p. 407-411, 2011.

PEÑALVER, E.; ARILLO, A.; DELCLÒS, X.; PERIS, D.; GRIMALDI, D. A.; ANDERSON, S. R.; NASCIMBENE, P. C.; PÉREZ-DE LA FUENTE, R. Parasitised feathered dinosaurs as revealed by Cretaceous amber assemblages. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017.

PINTO, C.; DI PRIMIO, R. Contribuição para a biologia dos Ixodidae do Estado do Rio Grande do Sul (Brasil). **Revista Médico-Cirúrgica Brazil**, v. 39, 236-239, 1931.

POHL, A. E.; CABEZAS-CRUZ, A.; RIBEIRO, M. F. B.; SILVEIRA, J. A. G. D.; SILAGHI, C.; PFISTER, K.; PASSOS, L. M. F. Detection of genetic diversity of *Anaplasma marginale* isolates in Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 1, p. 129-135, 2013.

POUND, J. M.; OLIVER JR, J. H.; ANDREWS, R. H. Effects of temperature and tick weight on expression of autogeny in the argasid tick *Ornithodoros parkeri* Cooley (Acari: Argasidae). **The Journal of Parasitology**, v. 70, n. 2, p. 279–284, 1984.

POUND, J. M.; CAMPBELL, J. D.; ANDREWS, R. H.; OLIVER, J. H. The relationship between weights of nymphal stages and subsequent development of *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 23, n. 3, p. 320-325, 1986.

RAMIREZ, D. G.; LANDULFO, G. A.; ONOFRIO, V. C.; SIMONS, S. M.; RECK, J.; MARTINS, J. R.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. Laboratory life cycle of *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): An endemic tick from southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 730–733, 2016.

RAR, V.; GOLOVLJOVA, I. *Anaplasma*, *Ehrlichia*, and “*Candidatus* Neoehrlichia” bacteria: Pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 8, p. 1842–1861, 2011.

RECK, J.; SOARES, J. F.; TERMIGNONI, C.; LABRUNA, M. B.; MARINS, J. M. Tick toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, n. 3, p. 356–360, 2011.

RECK, J.; MARKS, F. S.; GUIMARÃES, J. A.; TERMIGNONI, C.; MARTINS, J. R. Epidemiology of *Ornithodoros brasiliensis* (mouro tick) in the southern Brazilian highlands and the description of human and animal retrospective cases of tick parasitism. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, p. 101–109, 2013.

RODHAIN, J.; PONS, C.; VANDENBRANDEN, J.; BEQUAERT, J. Contribution towards the transmission mechanism of trypanosomes by glossines. **Archiv fur Schiffs-und Tropenhygiene**, v. 16, n. 21, p. 732-739, 1912

ROUBAUD, E. Autogenous cycle of winter generations of *Culex pipiens* L. **Compte Rendu de l'Academie des Sciences**, v. 188, n. 10, p. 735-738, 1929.

RUYBAL, P.; MORETTA, R.; PEREZ, A.; PETRIGH, R.; ZIMMER, P.; ALCARAZ, E.; ECHAIDE, I.; DE ECHAIDE, S. T.; KOCAN, K. M.; DE LA FUENTE, J.; FARBER, M.

Genetic diversity of *Anaplasma marginale* in Argentina. **Veterinary parasitology**, v. 162, n. 1-2, p. 176-180, 2009.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTIAGO, A. C. C.; DUARTE, L. L.; MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; NIERIBASTOS, F. A. DE CAMPOS PACHECO, R.; MELO, A. L. T.; MARCILI, A.; BARROS-BATTESTI, D. M. Occurrence of autogeny in a population of *Ornithodoros fonsecai* (Acar: Argasidae). **Ticks and tick-borne diseases**, v. 10, n. 5, p. 1078-1084, 2019.

SCHWAN, E. V.; HUTTON, D.; SHIELDS, K. J. B.; TOWSON, S. Artificial feeding and successful reproduction in *Ornithodoros moubata moubata* (Murray, 1877) (Acarina: Argasidae). **Experimental & Applied Acarology**, v. 13, n. 2, p. 107–115, 1991.

SHARMA, B. D. **Medical & Veterinary Arthropod-disease Ecology**. Nova Delhi: APH Publishing, 1993.

SILVA, J. B.; GONÇALVES, L. R.; DE MELLO VARANI, A.; ANDRÉ, M. R.; MACHADO, R. Z. Genetic diversity and molecular phylogeny of *Anaplasma marginale* studied longitudinally under natural transmission conditions in Rio de Janeiro, Brazil. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 6, n. 4, p. 499-507, 2015.

SMITH, R. D.; LEVY, M. G.; KUHLENSCHMIDT, M. S.; ADAMS, J. H.; RZECHULA, D. L.; HARDT, T. A.; KOCAN, K. M. Isolate of *Anaplasma marginale* not transmitted by ticks. **American journal of veterinary research**, v. 47, n. 1, p. 127, 1986.

SONENSHINE, D. E. **Biology of ticks**. 2. New York: Oxford University Press, 1991.

SOSA-GUTIERREZ, C. G.; VARGAS-SANDOVAL, M.; TORRES, J.; GORDILLO-PÉREZ, G. Tick-borne rickettsial pathogens in questing ticks, removed from humans and animals in Mexico. **Journal of Veterinary Science**, v. 17, n. 3, p. 353-360, 2016.

STICH, R. W.; KOCAN, K. M.; PALMER, G. H.; EWING, S. A.; HAIR, J. A.; BARRON, S. J. Transstadial and attempted transovarial transmission of *Anaplasma marginale* by

Dermacentor variabilis. **American journal of veterinary research**, v. 50, n. 8, p. 1377-1380, 1989.

SUN, Y.; XU, R.; LIU, Z.; WU, M.; QIN, T. *Ornithodoros (Ornithodoros) huajianensis* sp. nov. (Acari, argasidae), a new tick species from the Mongolian marmot (*Marmota bobak sibirica*), Gansu province in China. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 9, p. 209–217, 2019.

TARSHIS, I. B. A preliminary study on feeding *Ornithodoros savignyi* (Audouin) on human blood through animal-derived membranes (Acarina: Argasidae). **Annals of the Entomological Society of America**, v. 51, n. 3, p. 294–299, 1958.

TRAPE, J. F.; DIATTA, G.; ARNATHAU, C.; BITAM, I.; SARIH, M. H.; BELGHYTI, D.; BOUATTOUR, A.; ELGUERO, E.; VIAL, L.; MANÉ, Y.; BALDÉ, C.; PUGNOLLE, F.; CHAUVANCY, G. The epidemiology and geographic distribution of relapsing fever borreliosis in West and North Africa, with a review of the *Ornithodoros erraticus* complex (Acari: Ixodida). **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–19, 2013.

TURELL, M. J. Experimental transmission of Karshi (mammalian tick-borne flavivirus group) virus by *Ornithodoros* ticks >2,900 days after initial virus exposure supports the role of soft ticks as a long-term maintenance mechanism for certain flaviviruses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 8, p. 1–8, 2015.

VENZAL, J. M.; NAVA, S.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; CASÁS, G.; GUGLIELMONE, A. A. *Ornithodoros quilinensis* sp. nov. (Acari, Argasidae), a new tick species from the Chacoan region in Argentina. **Acta Parasitologica**, v. 57, n. 3, p. 329–336, 2012.

VENZAL, J. M.; NAVA, S.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MANGOLD, A. J.; MUÑOZ-LEAL, S.; LADO, P.; GUGLIELMONE, A. A. A new species of *Ornithodoros* (Acari: Argasidae), parasite of *Microlophus* spp. (Reptilia: Tropiduridae) from northern Chile. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 4, n. 1–2, p. 128–132, 2013.

VENZAL, J. M.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MUÑOZ-LEAL, S.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. Two new species of *Ornithodoros* (Ixodida; Argasidae) from the Southern Cone of South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 66, n. 1, p. 127–139, 2015.

VENZAL, J. M.; CASTILLO, G. N.; GONZALEZ-RIVAS, C. J.; MANGOLD, A. J.; NAVA, S. Description of *Ornithodoros montensis* n. sp. (Acari, Ixodida: Argasidae), a parasite of the toad *Rhinella arenarum* (Amphibia, Anura: Bufonidae) in the Monte Desert of Argentina. **Experimental and Applied Acarology**, v. 78, n. 1, p. 133–147, 2019.

VIAL, L. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. **Parasite**, v. 16, n. 3, p. 191–202, 2009.

VIAL, L.; CAMICAS, J. L. Description of a new soft tick species of the genus *Ornithodoros* Koch, 1844 (Acari: Argasidae) from Oman. In: Friedhelm, K.; Wilhelm, B.; Iyad, N.; Wolfgang, S. **Fauna of Arabia**: Mollusca, Amblypygi, Acari, Coleoptera, Hymenoptera, Diptera. (eds.) Basel: Karger, 2009. (135-143, v. 24).

VIDOTTO, M. C.; KANO, S. F.; GREGORI, F.; HEADLEY, S. A.; VIDOTTO, O. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the msp1 α and msp4 genes. **Journal of Veterinary Medicine**, Series B, v. 53, n. 9, p. 404-411, 2006.

ZHENG, H.; LI, A. Y.; TEEL, P. D.; DE LEÓN, A. A. P.; SESHU, J.; LIU, J. Biological and physiological characterization of in vitro blood feeding in nymph and adult stages of *Ornithodoros turicata* (Acari: Argasidae). **Journal of Insect Physiology**, v. 75, p. 73–79, 2015.

WOLDEHIWET, Z. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. **Veterinary Parasitology**, v. 167, n. 2–4, p. 108–122, 2010.

WOLF, R. W.; ARAGONA, M.; MUÑOZ-LEAL, S.; PINTO, L. B.; MELO, A. L. T.; BRAGA, I. A.; COSTA, J. S.; MARTINS, T. F.; MARCILI, A.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Novel *Babesia* and *Hepatozoon* agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 449–456, 2016.