

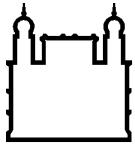
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

BIODIVERSIDADE DE RIQUÉTSIAS E POTENCIAIS VETORES DA  
FEBRE MACULOSA EM ÁREA DE INTERESSE EPIDEMIOLÓGICO  
NO CERRADO BRASILEIRO, ESTADO DE GOIÁS.

INGRID BENEVIDES MACHADO

Rio de Janeiro  
Maio de 2017



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

*INGRID BENEVIDES MACHADO*

Biodiversidade de riquetsias e potenciais vetores da Febre Maculosa em área de interesse epidemiológico no Cerrado Brasileiro, estado de Goiás.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

**Orientador:** Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta

**RIO DE JANEIRO**

Maio de 2017

ii

Machado, Ingrid Benevides.

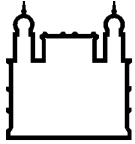
Biodiversidade de riquetsias e potenciais vetores da Febre Maculosa em área de interesse epidemiológico no Cerrado Brasileiro, estado de Goiás. / Ingrid Benevides Machado. - Rio de Janeiro, 2017.  
xvi, 74 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2017.

Orientador: Gilberto Salles Gazêta.

Bibliografia: f. 44-52

1. Rickettsia. 2. complexo. 3. vetor. 4. Cerrado. 5. Goiás. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

***AUTORA: INGRID BENEVIDES MACHADO***

**BIODIVERSIDADE DE RIQUÉTSIAS E POTENCIAIS VETORES DA FEBRE  
MACULOSA EM ÁREA DE INTERESSE EPIDEMIOLÓGICO NO CERRADO  
BRASILEIRO, ESTADO DE GOIÁS.**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Gilberto Salles Gazêta**

**Aprovada em: 31 / 05 / 2017**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dra. Maria Halina Ogrzewalska - Presidente (IOC/ FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Márcio Sacramento de Oliveira (EPJV/FIOCRUZ)**

**Prof. Dr. Vinícius Figueiredo Vizzoni (Dep. Genética/ UFRJ)**

**Prof. Dra. Heloísa Helena de Oliveira Morelli Amaral - Suplente (SES/ RJ)**

**Prof. Dra. Marinete Amorim - Suplente (IOC/ FIOCRUZ)**

Rio de Janeiro, 31 de maio de 2017

## Dedicatória

A minha mãe Selma, pela força, carinho e amizade. Obrigada, querida mãe e amiga.

## AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus, que me possibilitou concluir mais uma etapa da minha vida e concedeu-me o privilégio de aprender um pouco mais. Aos meus pais Jorge Henrique (*in memoriam*) e Selma, meus exemplos de vida, caráter e força. Ao meu tio Renato, o meu pai do coração pelo incentivo e confiança.

Ao meu orientador Dr. Gilberto Salles Gazêta, por acompanhar esta jornada desde a graduação, me incentivando a persistir e buscar sempre o melhor. Obrigada professor pelo ensino, confiança e orientação do presente trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses – Fundação Oswaldo Cruz/ IOC, agradeço pelo carinho, paciência, incentivo e ajuda que recebi de todos, vocês são maravilhosos.

As minhas amigas e professoras queridas, grandes incentivadoras, guerreiras, esforçadas e incansáveis Msc. Karen Medeiros e Msc. Karla Bitencourth. Estou sempre aprendendo muito com vocês, vocês são 1000!!!

Às queridas amigas: Dr. Arannadia Barbosa e as biólogas Msc. Nicole de Moura, Msc. Tayra Sato, Dr. Rebecca Leal Caetano e Msc. Beatriz Borsoi pela amizade e apoio.

Aos colegas da Secretaria Estadual de Saúde de Goiás pela coleta dos ectoparasitos para o presente trabalho.

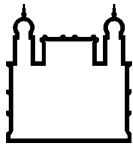
As colegas da Plataforma de Sequenciamento do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, Pavilhão Leônidas Deane, que sempre me receberam com muito carinho e atenção, abnegadas e competentes em suas atividades.

Minha gratidão a todos os professores do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Biodiversidade e Saúde por compartilharem seus conhecimentos e instruções.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pelo auxílio financeiro durante o percurso deste trabalho.

A todos que acreditaram e intercederam por mim, me incentivaram e me aconselharam nesta etapa tão importante da minha vida, agradeço com todo carinho, certa de que Deus recompensará a todos de forma incalculável.

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### BIODIVERSIDADE DE RIQUÉTSIAS E POTENCIAIS VETORES DA FEBRE MACULOSA EM ÁREA DE INTERESSE EPIDEMIOLÓGICO NO CERRADO BRASILEIRO, ESTADO DE GOIÁS.

#### RESUMO

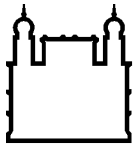
#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

Ingrid Benevides Machado

O estado de Goiás (GO), considerado indene para a Febre Maculosa (FM) até 2012, tem assinalado casos da doença em diferentes regiões sendo, até o momento, o principal estado da região Centro-Oeste para este agravo. O desconhecimento sobre os ciclos enzoótico e epidêmico, bem como diferenças clínicas observadas, fazem dessa região área de interesse epidemiológico. O presente trabalho objetivou analisar a biodiversidade de potenciais vetores e riquétsias em áreas sob vigilância de ambiente ou investigação de casos para FM, em GO, buscando apoiar as ações em saúde. Entre novembro de 2014 a março de 2016 foram coletados 5.294 potenciais vetores, em hospedeiros e ambiente, de diferentes regiões do estado. Do total de espécimes, 83,38% (4.414), foram representados por carrapatos do gênero *Amblyomma*; 12,30% (651), de *Rhipicephalus*, 4,10% (217), de *Dermacentor*, dos espécimes de pulgas 0,17% (9), pertenciam ao gênero *Ctenocephalides* e 0,09% (1), de *Xenopsylla*. Foram encontrados somente 0,04% (2), de ácaros do gênero *Androlaelaps*. A análise morfológica e molecular dos espécimes do complexo *Amblyomma cajennense* permitiu identificar *Amblyomma sculptum*, na maioria das áreas investigadas, com três exemplares de *Amblyomma cajennense sensu stricto* (s.s.), na região Norte de Goiás e um único espécime de *A. cajennense* s.s. observado para a região Centro Oeste do estado parasitando um mesmo hospedeiro que outra fêmea de *A. sculptum*. A pesquisa de fragmentos de genes de riquétsias resultou na detecção de *Rickettsia bellii* em *Amblyomma rotundatum* e em *Amblyomma cajennense sensu lato* (s.l.); *Rickettsia* sp. str. NOD, em *Amblyomma nodosum* e *Rickettsia felis* em *Ctenocephalides felis*. No presente trabalho foi calculada a Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI), com (100%) de FMVI, no município de Trindade, por *Rickettsia* sp. str. NOD em *A. nodosum*, seguido do município Gameleira de Goiás com (33,33%), para *R. felis* em *C. felis*. *Rickettsia* sp. str. NOD parece desenvolver ciclo enzoótico no município de Trindade. Este é o primeiro relato desta riquétsia no estado de Goiás. *R. felis*, espécie considerada patogênica é apontada em área de casos confirmados de FM em *C. felis*, coletada em cão doméstico, apontando para o risco da circulação de riquétsias patogênicas em animais de hábito antrópico e o risco do aparecimento de novos ciclos epidêmicos de FM. Foi avaliada a elevada frequência 37,36% (1978) de exemplares do complexo *A. cajennense*, no qual estão incluídos os espécimes de *A. sculptum*, espécie considerada importante no ciclo de *Rickettsia rickettsii* em região de Cerrado e de Mata Atlântica antropizada, apontando para o risco da circulação desse potencial vetor em áreas de casos confirmados de FM.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Rickettsia*, complexo, vetor, Cerrado, Goiás.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### BIODIVERSITY OF RIQUÉTSIAS AND POTENTIAL VECTORS OF SPOTTED-FEVER IN AN AREA OF EPIDEMIOLOGICAL INTEREST IN BRAZILIAN CLOSURE, STATE OF GOIÁS.

#### ABSTRACT

#### MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSITY AND HEALTH

**Ingrid Benevides Machado**

The state of Goiás (GO), considered indigene for Spotted-Fever (SF) until 2012, has been reported cases in different regions, being, up to now, the main state of the Midwest region for SF. Lack of knowledge about the enzootic and epidemic cycles, as well as clinical differences observed, characterizes this region as an area of epidemiological interest. This study aimed to analyze the biodiversity of potential vectors and rickettsia in areas under environmental surveillance or investigation of SF cases in GO, trying to contribute supporting health actions. Between November 2014 and March 2016, 5,294 potential vectors were collected, in hosts and environment, from different regions. Up to 83.38% (4.414) was represented by the genus *Amblyomma*, 12.30% (651), by *Rhipicephalus* and 4.10% (217); by *Dermacentor*. About fleas, 0.17% (9), belonged to the genus *Ctenocephalides* and 0.09% (1), to *Xenopsylla*. Just 0.04% (2), were referred to a mite belonged to genus *Androlaelaps*. The morphological and molecular analysis of the *Amblyomma cajennense* complex allowed the identification of *Amblyomma sculptum* in most of the investigated areas, with three specimens of *Amblyomma cajennense sensu stricto* (s.s), found in the Northern region of Goiás and a single specimen of *A. cajennense* s.s. was observed in the Midwest region of the state parasitizing a same host as another female of *A. sculptum* did. The search for fragments of rickettsial genes resulted in the detection of *Rickettsia bellii* in *Amblyomma rotundatum* and *Amblyomma cajennense sensu lato* (s.l.); *Rickettsia* sp. str. NOD in *Amblyomma nodosum* and *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis*. The Minimum Frequency of Infected Vectors (FMVI) was calculated, presenting FMVI (100%) in the municipality of Trindade by *Rickettsia* sp. str. NOD in *A. nodosum* followed by the municipality of Gameleira de Goiás presenting FMVI (33.33%) for *R. felis* in *C. felis*. *Rickettsia* sp. str. NOD, seems to develop enzootic cycle in the municipality of Trindade. This is the first report for rickettsia in the state of Goiás. *R. felis*, considered pathogenic, wa reported in an area of SF positive cases of in *C. felis* collected in domestic dogs. These results, point out to the risk of circulating pathogenic rickettsia in anthropic animals and to the risk of the emergency of new epidemic SF cycles. It was evaluated the high frequency 37,36% (1978) of specimens of the complex *A. cajennense*, in which the specimens of *A. sculptum*, a species considered important in the *Rickettsia rickettsii* cycle in Cerrado and Atlantic Anthropic Forest, are included, pointing to the risk of the circulation of this potential vector in areas of confirmed SF cases.

**KEY WORDS:** *Rickettsia*, complex, vector, Cerrado, Goiás.

## ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Complexo <i>Amblyomma cajennense</i></b> .....	<b>5</b>
1.1.1 <i>Amblyomma sculptum</i> e Febre Maculosa no Brasil.....	6
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>8</b>
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>8</b>
<b>2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>8</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Área de estudo e coleta de ectoparasitos</b> .....	<b>9</b>
<b>3.2 Diagnose de potenciais vetores de riquétsias</b> .....	<b>10</b>
<b>3.3 Análises morfológicas</b> .....	<b>11</b>
<b>3.4 Análises moleculares</b> .....	<b>11</b>
3.4.1 Caracterização molecular de espécimes do complexo <i>Amblyomma cajennense</i> .....	11
3.4.2 Pesquisa de riquétsias.....	13
3.4.3 Purificação, Sequenciamento do DNA e edição de sequências.....	14
3.4.4 Análise Filogenética.....	14
3.4.5 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI).....	15
<b>3.5 Confeção dos mapas de distribuição dos espécimes do complexo         <i>Amblyomma cajennense</i> e das riquétsias identificadas</b> .....	<b>15</b>
<b>4 RESULTADOS</b>	<b>17</b>
<b>4.1 Resultado da triagem e identificação dos ectoparasitos coletados</b> ..	<b>17</b>
<b>4.2 Resultado da análise morfológica dos espécimes do complexo         <i>Amblyomma cajennense</i></b> .....	<b>17</b>
<b>4.3 Resultado da análise molecular dos espécimes do complexo         <i>Amblyomma cajennense</i></b> .....	<b>23</b>
<b>4.4 Resultado da caracterização molecular das riquétsias</b> .....	<b>27</b>
<b>4.5 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)</b> .....	<b>34</b>

4.6	Mapas demonstrando os padrões de distribuição dos espécimes do complexo <i>Amblyomma cajennense</i> , áreas de circulação das riquetsias detectadas no presente trabalho e áreas de casos confirmados de FM (SINAN) .....	35
5	DISCUSSÃO	37
6	CONCLUSÕES	43
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
8	ANEXOS	53
	ANEXO A	53
	ANEXO B	54
	ANEXO C	62
	ANEXO D	64
	ANEXO E	65
	ANEXO F	70
	ANEXO G	71
	ANEXO H	74

## ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 - A:** Mapa do Brasil destacando o estado de Goiás; **B:** Mapa demonstrando as áreas de coleta de ectoparasitos no Cerrado brasileiro, estado de Goiás, Brasil. VI, VII marcam as áreas de vigilância ambiental, e I-V, VIII-XIV indicam as áreas de investigação de casos de febre maculosa.....**9**
- Figura 2 -** Fotos da coleta de ectoparasitos em hospedeiro ou ambiente em áreas de vigilância ou de casos confirmados de FM, no período de novembro de 2014 a março de 2016, estado de Goiás – **A:** técnica de arrasto; **B:** técnica de atração por CO<sub>2</sub> (gelo seco); **C:** catação manual em hospedeiro vertebrado. Fonte: Arquivo LIRN.....**10**
- Figura 3 -** Fotos de espécime fêmea de *Amblyomma cajennense* s.s. coletado em *Myrmecophaga tridactyla* no município de Aparecida de Goiânia, estado de Goiás – **A:** Espécime fêmea de *Amblyomma cajennense* s.s. (visão dorsal); **B:** Espécime fêmea de *Amblyomma cajennense* s.s. (visão ventral); **C:** Abertura genital do espécime fêmea de *Amblyomma cajennense* s.s. ....**21**
- Figura 4 -** Fotos de espécime fêmea de *Amblyomma sculptum* coletado em *Myrmecophaga Tridactyla* no município de Aparecida de Goiânia, estado de Goiás – **A:** Espécime fêmea de *Amblyomma sculptum* (visão dorsal); **B:** Espécime fêmea de *Amblyomma sculptum* (visão ventral); **C:** Abertura genital do espécime fêmea de *Amblyomma sculptum*.....**22**
- Figura 5 -** Filogenia inferida por análise de Máxima Verossimilhança, de sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II (490 pb), representando as relações entre amostras coletas em Goiás e espécies do complexo *Amblyomma cajennense* de diferentes locais das Américas. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.....**26**

- Figura 6** - Filogenia inferida através da reconstrução por Máxima Verossimilhança de sequências parciais do gene *gltA* de riquetsias. A árvore foi enraizada por *midpoint root*. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.....**29**
- Figura 7** - Filogenia inferida através da reconstrução por Máxima Verossimilhança de sequências parciais do gene *ompA* de riquetsias. A árvore foi enraizada por *midpoint root*. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.....**31**
- Figura 8** - Filogenia inferida através da reconstrução por Máxima Verossimilhança de sequências parciais do gene *ompB* de riquetsias. A árvore foi enraizada por *midpoint root*. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.....**32**
- Figura 9** - Filogenia concatenada de sequências parciais dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* de riquetsia, inferida através de análise de Máxima Verossimilhança. A árvore foi enraizada por *midpoint root*. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.....**33**
- Figura 10** - Mapa dos principais municípios, biomas e recursos hídricos do estado de Goiás, Brasil. Os pontos marcados no formato de círculo assinalam a presença de *Amblyomma cajennense* s.l., *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma cajennense* s.s. identificados no presente estudo. Pontos marcados em losango referem-se às riquetsias identificadas no presente estudo e pontos marcados em estrela as áreas de casos confirmados de FM.....**35**

**Figura 11** - Mapa dos biomas e relevo do estado de Goiás, Brasil. Os pontos marcados no formato de círculo assinalam a presença de *Amblyomma cajennense s.l.*, *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma cajennense s.s.* identificados no presente estudo. Pontos marcados em losango referem-se às riquétsias identificadas no presente estudo e pontos marcados em estrela as áreas de casos confirmados de FM.....**36**

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Oligonucleotídeo utilizado no presente trabalho para caracterização molecular de espécimes do complexo *Amblyomma cajennense*.....**12**
- Tabela 2** - Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho para detecção de riquétsias.....**13**
- Tabela 3** - Ectoparasitos coletados em áreas de vigilância de ambiente ou investigação de casos Febre Maculosa (FM) no estado de Goiás/Brasil.....**17**
- Tabela 4** - Identificação, através de busca no BLASTN, de sequência parcial do gene Citocromo Oxidase subunidade II (COII) de amostras de espécimes únicos do complexo *Amblyomma cajennense*.....**25**
- Tabela 5** - Identificação através de busca no BLASTN das riquétsias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento dos genes *ompA*, *gltA* e *OmpB*.....**28**
- Tabela 6** - Frequência mínima de vetores infectados por riquétsia (%) de cada espécie de ectoparasito por município do estado de Goiás, Brasil, no período de novembro de 2014 a março de 2016.....**34**

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CAVAISC	Coleção de Artrópodes Vetores Ápteros de Importância em Saúde das Comunidades
Compr	comprimento
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNAg	ácido desoxirriborribonucléico genômico
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
FM	Febre Maculosa
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMVI	Frequência Mínima de Vetores Infectados
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GA	Grupo Ancestral
GFM	Grupo Febre Maculosa
GL	Gay Lussac
GO	Goiás
GT	Grupo Tifo
GTR	Grupo Transicional
Larg	largura
LIRN	Laboratório Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses
L	larva
LL	larvas
M	molar
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
mg/mL	miligrama por mililitro
min	minutos
mm	milímetro
mM	milimolar
N	ninfa
NaCl	Cloreto de sódio
NN	ninfas
pb	par de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogênionico
rpm	rotações por minuto



SDS	dodecil sulfato de sódio
SINTUFG	Sindicato dos Trabalhadores da Universidade Federal de Goiás
<i>s.l.</i>	<i>sensu lato</i>
<i>s.s.</i>	<i>sensu stricto</i>
Tris HCl	trisaminimetano
UFG	Universidade Federal de Goiás
♂	macho
♂♂	machos
♀	fêmea
♀♀	fêmeas
°C	graus Celsius
µm	micrômetro

# 1 INTRODUÇÃO

Riquetsioses são zoonoses ocasionadas por bactérias pertencentes à ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae e gênero *Rickettsia*. São bactérias Gram-negativas, de forma bacilar, intracelulares obrigatórias, que podem multiplicar-se no citoplasma ou no núcleo de células eucarióticas (Roux et al. 1997; Ogrzewalska et al. 2009; Krawczak et al. 2016).

Atualmente há grande discussão em termos filogenéticos quanto ao agrupamento das diversas riquetsias detectadas e identificadas até o momento. Gillespie et al. (2008), ao identificar quatro diferentes linhagens de riquetsias, propôs considerar os já estabelecidos agrupamentos e incluir um novo grupo, denominando-o de Grupo Transicional (GTR), no qual estão incluídas *Rickettsia akari* Huebner et al. 1946, *Rickettsia australis* Philip 1950 e *Rickettsia felis* Bouyer et al. 2001 emend. La Scola et al. 2002.

No entanto, tradicionalmente, considera-se que o gênero *Rickettsia* pode ser subdividido em três grupos: o Grupo Tifo (GT), Grupo Febre Maculosa (GFM) e um terceiro grupo de bactérias de patogenicidade desconhecida, o Grupo Ancestral (GA), que inclui *Rickettsia canadensis* McKiel et al. 1967 e *Rickettsia belli* Philip et al. 1983 (Stothard et al. 1994; Roux e Raoult 2000; Martins 2016). O GT é composto por *Rickettsia prowazekii* da Rocha-Lima, 1916, transmitida por piolhos (Tifo Epidêmico), e *Rickettsia typhi* (Wolbach e Todd 1920) Philip 1943 veiculada por pulgas (Tifo Murino), de ampla distribuição mundial (Raoult e Roux 1997; Fournier e Raoult 2009; Martins 2016).

No GFM são reconhecidas cerca de 60 espécies de *Rickettsia*, em sua maioria transmitidas por carrapatos, com exceção de *R. akari* e *R. felis* vetoradas, respectivamente, por pequenos ácaros e pulgas (Raoult e Roux 1997; Parola et al. 2005; Martins 2016). Até o momento o GFM inclui 13 espécies reconhecidas como patogênicas ao homem, entre estas 11 são transmitidas por carrapatos (Martins 2016).

Há uma grande diversidade de riquetsias espalhadas por todos os continentes (Szabó et al. 2013; Parola et al. 2013). Algumas espécies do gênero *Rickettsia* apresentam ampla distribuição, presentes em ao menos três dos cinco continentes, caso de *Rickettsia massiliae* Beati e Raoult 1993 e *Rickettsia africae* Kelly et al, 1996, por exemplo (Parola et al. 2013).

Em um dado ecotópo, a disponibilidade de espécies de hospedeiros bem como sua suscetibilidade a infecções por riquetsias e a infestações por carrapatos pode variar no espaço e ao longo do tempo. Além desta dinâmica, riquetsias do GFM envolvendo múltiplos grupos de vetores e mamíferos podem coexistir na mesma área, compartilhando ou não de elementos epidemiológicos (Rudakov et al. 2003). Os diferentes tipos de atividades humanas e sua conexão com a atividade sazonal dos carrapatos influenciam a manifestação epidêmica da riquetsiose no foco natural. Todos estes fatores contribuem para o aumento da complexidade da epidemiologia das riquetsioses.

No Brasil foram assinaladas ao menos cinco espécies patogênicas do gênero *Rickettsia*, sendo duas delas, *Rickettsia* sp. str. Atlantic rainforest e *Rickettsia rickettsii* (Wolbach, 1919) Brumpt, 1922, consideradas as mais importantes epidemiologicamente (Labruna et al. 2011; Szabó et al. 2013; Parola et al. 2013).

*Rickettsia* sp. str. Atlantic rainforest foi assinalada nas regiões Sul, Nordeste, Centro-Oeste e parte da região Sudeste. Nos estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul, Bahia, Ceará, Mato Grosso e São Paulo, em áreas menos degradadas de Mata Atlântica, porém não houve a ocorrência de casos fatais (Sabatini et al. 2010; Silva et al. 2011; Witter et al. 2015; Moerbeck et al. 2016; Vizzoni et al. 2016; Oliveira et al. 2016a; Melo et al. 2016).

*Rickettsia rickettsii* é considerada a espécie mais patogênica e está assinalada principalmente na Região Sudeste do país, onde acontece a maioria quase absoluta dos casos fatais (Gehrke et al. 2009; Moura-Martinião et al. 2014; Szabó et al. 2013; Oliveira et al. 2016a). No período de 1997 a 2009, somente no Estado de São Paulo foram registrados 45,1% do total de falecimentos por FMB em todo o país (Del Fiol et al 2010).

*Rickettsia felis*, entre as espécies patogênicas relatadas em território nacional, apresenta ampla distribuição, sendo assinalada nas cinco regiões do país, e está fortemente associada à vetoração por *Ctenocephalides felis* (Bouché 1835) (Parola et al. 2013, Horta et al. 2014, Moura-Martinião et al. 2014), havendo, ao menos, um caso associado a essa riquetsia no Brasil (Raoult et al. 2001). Contudo, não há confirmação de novos casos associados a *R. felis* no país. Igualmente, *Rickettsia parkeri* Lackman et al. 1965, espécie sabidamente patogênica, já foi assinalada no Brasil sem, contudo, haver comprovação de sua importância epidemiológica no território nacional (Parola et al. 2013; Weck et al. 2016).

Outra espécie, *Rickettsia amblyommatis* (= *R. amblyommii*, Karpathy et al. 2016), considerada com potencial patogênico, tem sido comumente encontrada em algumas espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* no hemisfério ocidental (Karpathy et al. 2016). No Brasil, *R. amblyommatis* tem sido assinalada nos estados de Rondônia, Pará, Mato Grosso, São Paulo, Bahia, Minas Gerais e Ceará, no entanto, não há até o momento casos clínicos associados a esta riquetsia em território nacional (Labruna et al. 2004a; Lopes et al. 2014; Nunes et al. 2015; Melo et al. 2016).

No Brasil, algumas espécies de carrapatos foram incriminadas na participação de ciclos epidêmicos de riquetsias patogênicas, caso das espécies *Amblyomma ovale* (Kock 1844), *Amblyomma aureolatum* (Pallas 1772) e *Amblyomma sculptum* Berlese 1888 (Guedes et al. 2005; Szabó et al. 2013; Pinter et al. 2016; Vizzoni et al. 2016).

*Amblyomma ovale* parece ser o principal vetor envolvido no ciclo epidêmico de *Rickettsia* sp. str. Atlantic rainforest, alimentando-se de cães residentes em áreas próximas de áreas naturais dos estados de Ceará, São Paulo, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, podendo, dessa forma, entrar em ambiente antrópico e infestar humanos (Szabó et al. 2001; Labruna et al. 2005; Szabó et al. 2006; Sabatini et al. 2010; Szabó et al. 2013; Moerbeck et al. 2016; Vizzoni et al. 2016).

*Amblyomma aureolatum* é apontado como vetor de *R. rickettsii* em ao menos um foco, na região Metropolitana de São Paulo, envolvendo cães e humanos que vivem próximos às bordas de Mata Atlântica (Pinter et al. 2016). Entretanto, o principal ciclo de *R. rickettsii* parece ocorrer em região de Cerrado e áreas degradadas do bioma Mata Atlântica, envolvendo capivaras, equinos, cães e *A. sculptum* (Szabó et al. 2013); considerada a espécie de carrapato de maior impacto na saúde pública por ser associada a maioria dos óbitos por FM no Brasil (Guedes et al. 2005; Matias et al. 2015; Oliveira et al. 2016a). A espécie *Amblyomma dubitatum* Neumann 1899, contudo, permanece tendo participação indeterminada como vetor de *R. rickettsii* e de demais riquetsias patogênicas, sendo até momento comumente infectado por *R. bellii* (Szabó et al. 2013).

*Amblyomma sculptum* faz parte das espécies que constituem o complexo *Amblyomma cajennense*, com distribuição no norte da Argentina, Bolívia e Paraguai, expandindo-se para os estados brasileiros do Paraná, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Bahia,

Tocantins, Maranhão, Piauí e Pernambuco (Nava et al. 2014; Martins et al. 2016). *Amblyomma cajennense* s.s., outra espécie do complexo *A. cajennense*, ainda sem associação com a ocorrência de casos de FM, é encontrada na Região Amazônica da América do Sul (Venezuela, Guianas e no Brasil). No Brasil, ocorre na Região Norte, nos estados do Pará, Tocantins e Rondônia, na Região Nordeste, no estado do Maranhão e Região Centro-Oeste nos estados de Goiás e Mato Grosso (Martins et al. 2016). Contudo, uma fêmea de *A. cajennense* s.s. foi encontrada em Porangatu, município do extremo Norte do estado de Goiás, divisa com o estado do Tocantins (Martins et al. 2016). Essa sobreposição de espécies próximas morfológicamente pode levar à confusão diagnóstica e erro no entendimento epidemiológico sobre a ocorrência de vetores e espécies circulantes de riquetsias.

Neste contexto, a transmissão de riquetsias nos diferentes espaços geopolíticos brasileiros, em sua complexidade morfoclimática, deve ser avaliada em busca do reconhecimento dos possíveis vetores de FM que possam influenciar o risco de infecção em determinada área pela competência vetorial e/ou manutenção da circulação de riquetsias em áreas de transmissão, risco, alerta, predisposta ou silenciosa, apoiando as ações básicas de saúde (Pinter et al. 2016).

Apesar da confirmação de casos de FM em diversos municípios dos estados brasileiros, assim como a circulação de riquetsias patogênicas em parte de essas áreas, ainda é incipiente o conhecimento relacionado à caracterização do ciclo enzoótico e epidêmico desses bioagentes na região do Cerrado brasileiro, o que inviabiliza o correto direcionamento das políticas de saúde pública.

No estado de GO, estudos sorológicos evidenciaram a circulação de riquetsias em animais silvestres, cães, equinos e humanos (Martins 2009; Reis 2012; Martins; Sousa-Martins 2014), com casos confirmados a partir de 2012 (Martins e Sousa-Martins 2014; Oliveira et al. 2016a; Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN 2017). As principais manifestações clínicas em GO são diferentes de aquelas registradas para outros focos, com destaque para o sintoma de hepatoesplenomegalia (Oliveira et al. 2016a) e o ciclo de transmissão de riquetsias até o momento é desconhecido.

O Serviço de Referência Nacional em Vetores de Riquetsioses, do Instituto Oswaldo Cruz / Fiocruz, em parceria com o Ministério da Saúde e a Secretaria de Saúde do estado de Goiás, tem participado da investigação de aglomerados recentes de casos notificados (2013-2016), analisando potenciais vetores coletados

em diferentes municípios de quatro das cinco regiões do estado, detectando diferentes espécies de vetores infectados, destacando-se a infecção de *Amblyomma cajennense s.l.* e *A. dubitatum* em áreas com casos confirmados, sem, contudo, haver confirmação das espécies de riquétsias circulantes.

A análise da circulação de riquétsias e vetores nas áreas de foco de FM ou com notificação de casos, pode permitir um melhor entendimento do cenário eco-epidemiológico, viabilizando medidas preventivas e ações em saúde para o controle da FM em essas áreas.

### **1.1 Complexo *Amblyomma cajennense***

Durante muitos anos o nome *Amblyomma cajennense* (Fabricius 1787) foi utilizado para designar uma única espécie. No entanto, Beati et al. (2013), já demonstrava evidências de especiação alopátrica entre indivíduos de *A. cajennense*. Para tanto, considerou dados moleculares e análises filogenéticas que apontaram *A. cajennense* como grupo monofilético e que poderia ser separado em seis unidades filogenéticas de acordo com composições específicas de haplótipos e seus respectivos habitats. Beati et al. (2013) apontavam, portanto, evidências congruentes de que *A. cajennense* era um complexo de seis espécies que hipoteticamente teriam iniciado um processo de especiação durante o Mioceno com o soergimento dos Andes e consequente alteração do clima e ecologia da região neotropical.

Nava et al. (2014) com base em dados morfológicos, corroborou as evidências de Beati et al. (2013), demonstrando que *A. cajennense* é um complexo de seis espécies, distribuídas do sul dos estados Unidos à América do Sul, tendo como ressalva, Chile e Uruguai. Algumas espécies estão restritas a um território isolado, caso de *Amblyomma interandinum* Beati et al. 2014, até o momento referida somente no Peru, e de *Amblyomma patinoi* Labruna et al. 2014, relatado na região Andina da Colômbia, sendo incriminado como vetor de *R. rickettsii* e envolvido nos casos de FM confirmados neste país (Faccini-Martínez et al. 2015). Por outro lado, algumas espécies estão amplamente distribuídas por uma longa faixa territorial do continente Americano, como, por exemplo, *Amblyomma mixtum* Koch 1844, estendendo-se do sul dos estados Unidos (Texas) até a Colômbia (Nava et al. 2014; Rivera-Páez et al. 2016).

*Amblyomma tonelliae* Nava et al. 2014 ocupa os territórios da Argentina, Bolívia e Paraguai, onde também ocorre *A. sculptum*, evidenciando a simpatria de essas espécies. No entanto, o processo de sobreposição pode ocorrer entre outras espécies do complexo, especialmente aquelas onde existe a interseção de nichos ecológicos. É o caso, por exemplo, de *A. sculptum* e *A. cajennense* s.s. no Brasil.

Assim *A. cajennense* s.s. é relatada para a região Amazônica, estendendo-se até a Guiana Francesa, Suriname, Guiana e Venezuela e *A. sculptum* ocorre nas regiões Sudeste, Nordeste, Centro Oeste e parte Sul do Brasil (Nava et al. 2014; Martins et al. 2016).

Martins et al. (2016) verificou que as áreas de sobreposição entre as duas espécies *A. sculptum* e *A. cajennense* s.s., não estão restritas às áreas de mata, mas abrangem partes do bioma Cerrado. São relatadas até o momento três áreas de sobreposição, sendo uma restrita ao estado do Mato Grosso, outra estendendo-se de Rondônia até Mato Grosso e uma terceira área de transição entre o estado de Tocantins e Goiás. No entanto, é possível que existam novas áreas de sobreposição ainda desconhecidas. A descoberta dessas áreas pode possibilitar uma maior compreensão da dinâmica de distribuição de *A. cajennense* s.s. e *A. sculptum*, em busca de quais fatores estão modulando os parâmetros de distribuição de ambas as espécies, principalmente de *A. sculptum*, em detrimento de sua competência vetorial. Portanto, estudos que envolvam a distribuição de *A. cajennense* s.s. e *A. sculptum* podem contribuir para o entendimento do cenário epidemiológico atual da FM, principalmente nos estados brasileiros que recentemente confirmaram seus primeiros casos da doença, a exemplo de Goiás, Rondônia, Pernambuco e Mato Grosso do Sul (Sistema de Informação de Agravos e Notificação - SINAN 2017).

### **1.1.1 *Amblyomma sculptum* e Febre Maculosa no Brasil**

Atualmente, a FM é responsável por números consideráveis de óbitos no Brasil, com uma taxa de letalidade de 85%, principalmente por tratar-se de uma doença multissistêmica, de início súbito e sintomatologia inespecífica, além de ser considerada doença negligenciada (Araújo et al. 2016). Somente entre os anos de 2001 e 2015 foram totalizados 1540 casos confirmados de FM em diferentes regiões do Brasil (Sistema de Informação de Agravos e Notificação – SINAN 2017).

A doença ocasionada pela *R. rickettsii* no Brasil é denominada de Febre Maculosa Brasileira (FMB). Considerando os dados das áreas de casos confirmados de FMB e os estudos de distribuição das espécies do complexo *A. cajennense*, é possível avaliar que desde os primeiros casos de FMB relatados para os estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro (Dias; Martins 1938; Del Fiol et al. 2010), *A. sculptum* estava envolvido nestes cenários epidemiológicos como principal vetor de *R. rickettsii* (Martins et al. 2016). A participação de *A. sculptum* na transmissão de *R. rickettsii* é comprovada para toda a região sudeste do Brasil e norte do Paraná (Parola et al. 2013; Oliveira et al. 2016b).

Estudos associam o avanço da FM ao aumento de áreas degradadas, viabilizando dessa forma a aproximação da população humana com áreas de entorno de borda de fragmentos florestais, possibilitando a entrada do homem em área silvestre e o contato com riquétsias envolvidas nos ciclos enzoóticos, dessa forma possibilitando novos ciclos da doença, onde o homem é o hospedeiro acidental (Araújo et al. 2016). Martins et al. (2016), faz uma associação com a frequente presença de *A. sculptum* nessas áreas degradadas, apontando para a adaptação desse vetor ao ambiente antropizado, facilitando o surgimento de possíveis novos focos de FM.

A presença de *A. sculptum* dos estados de Goiás, Rondônia, Pernambuco e Mato Grosso do Sul, foi comprovada. *A. sculptum* é comprovadamente vetor competente de *R. rickettsii*, mas há registros de outras riquétsias detectadas nesta espécie de carrapato, caso de *R. amblyommatidis* (Nunes et al. 2015), levantando a possibilidade de que *A. sculptum* possa estar envolvido em outros ciclos de riquétsias patogênicas até o momento desconhecidos. Contudo, *R. rickettsii* apresenta uma estreita interação parasitária com *A. sculptum* o que dificultaria a participação dessa espécie de carrapato no ciclo de outras riquétsias patogênicas e também como vetor competente das mesmas.

No caso do estado de Goiás, embora existam casos confirmados de FM, não foi assinalada até o momento a circulação de *R. rickettsii* em *A. sculptum*, assim como em nenhum outro vetor, portanto, fazendo-se necessário novos estudos neste sentido.



## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Analisar a biodiversidade de potenciais vetores e riquetsias em áreas de interesse epidemiológico para Febre Maculosa (FM) no estado de Goiás, bioma Cerrado, Brasil.

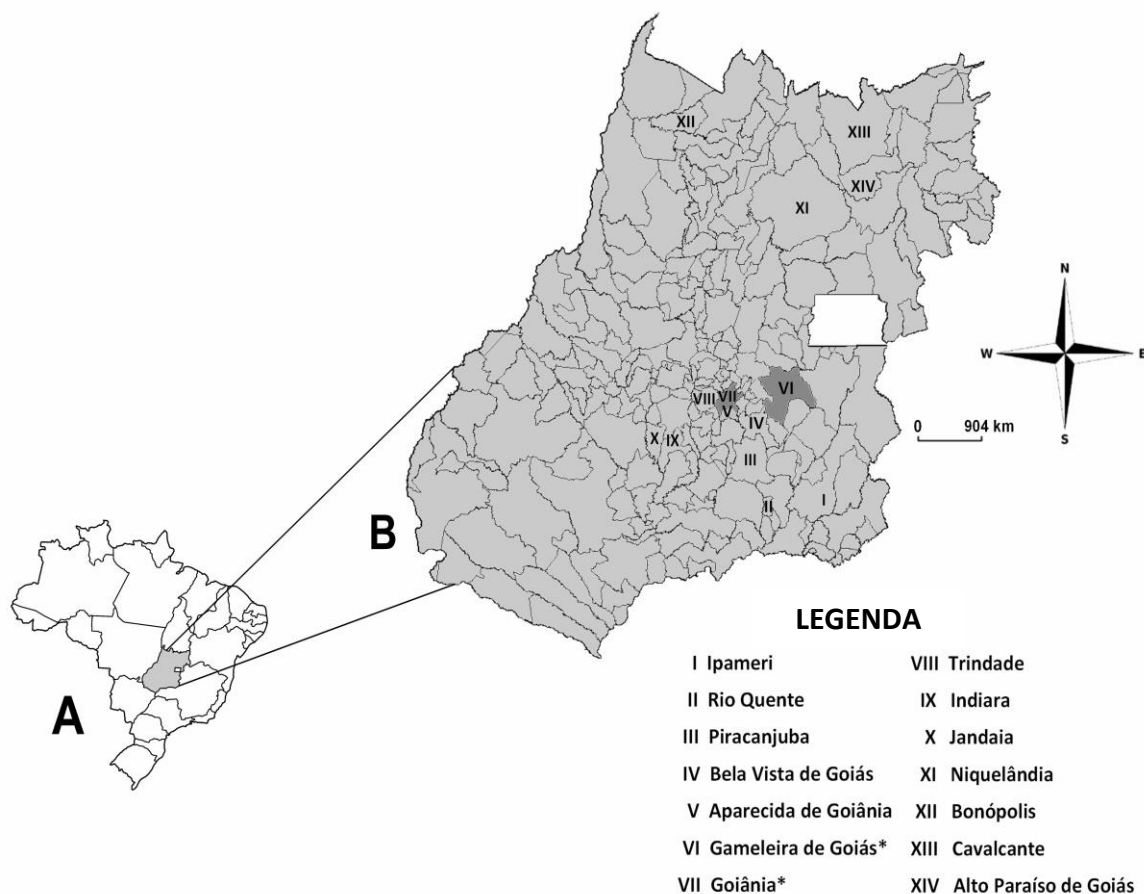
### **2.2 Objetivos Específicos**

1. Identificar a composição da fauna de potenciais vetores nas áreas de estudo.
2. Detectar a circulação de riquetsias nas áreas de estudo.
3. Identificar as espécies de riquetsias circulantes nas áreas de estudo.
4. Caracterizar as espécies do complexo *A. cajennense* circulantes dentro do estado de Goiás e a sua relação com riquetsias patogênicas.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de estudo e coleta de ectoparasitos

Os ectoparasitos foram coletados em áreas de vigilância de ambiente ou investigação de casos de FM no estado de Goiás. Foram incluídos 14 municípios distribuídos em quatro grandes macrorregiões do estado (Figura 1).



\* Marcados em cinza escuro, municípios com casos confirmados de FM.

**Figura 1 - A:** Mapa do Brasil destacando o estado de Goiás; **B:** Mapa demonstrando as áreas de coleta de ectoparasitos no Cerrado brasileiro, estado de Goiás, Brasil. VI, VII marcam as áreas de vigilância ambiental, e I-V, VIII-XIV indicam as áreas de investigação de casos de febre maculosa.

As coletas foram realizadas no período de novembro de 2014 a março de 2016, em parceria com a Secretaria Estadual de Saúde de Goiás, em região urbana, rural e silvestre, tanto em ambiente como em hospedeiros vertebrados. As unidades

amostrais de coletas foram constituídas por espécimes oriundos de um mesmo hospedeiro ou ambiente (Figura 2).



**Figura 2** - Fotos da coleta de ectoparasitos em hospedeiro ou ambiente em áreas de vigilância ou de casos confirmados de FM, no período de novembro de 2014 a março de 2016, estado de Goiás – **A**: técnica de arrasto; **B**: técnica de atração por CO<sub>2</sub> (gelo seco); **C**: catação manual em hospedeiros vertebrados. Fonte: Arquivo LIRN.

### 3.2 Diagnose de potenciais vetores de riquetsias

Os ectoparasitos foram encaminhados para o Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses, do IOC/Fiocruz, onde foram triados e identificados segundo as chaves dicotômicas de Amorim e Serra-Freire (1999) para larvas; Durden e Keirans (1996), Martins et al. (2010, 2016) para ninfas; Aragão e Fonseca (1961) e Barros-Battesti et al. (2006) para adultos de carrapatos. As pulgas

foram identificadas com base na chave de Bicho e Ribeiro (1998) e de Linardi e Guimarães (2000), para ácaros chaves de Fonseca (1957/58), Tripton (1960), Evans e Till (1966), Furman (1972), Krantz e Walter (2009).

### 3.3 Análises Morfológicas

As fêmeas de *A. sculptum* e *A. cajennense* s.s. foram separadas morfológicamente com base no formato da abertura genital, como descrito nos trabalhos de Nava et al. (2014) e Martins et al. (2016). As fêmeas de *A. sculptum* apresentam abertura genital em forma de “U” e as fêmeas de *A. cajennense* s.s. abertura genital em forma de “V”.

Ninfas do complexo *A. cajennense* foram identificadas seguindo o protocolo estabelecido por Martins et al. (2014) para separar *A. sculptum* e *A. cajennense* s.s. com base na relação largura do escudo/ comprimento do escudo ( $< 1,3 \mu\text{m}$  *A. cajennense* s.s. /  $> 1,3 \mu\text{m}$  *A. sculptum*).

Larvas e machos, que ainda não dispõem de protocolos para separar espécimes de *A. sculptum* e *A. cajennense* s.s. e demais exemplares do complexo *A. cajennense* cuja análise morfológica foi inespecífica ou inconclusiva, atribuímos a denominação *A. cajennense* s.l., seguindo Martins et al. (2016).

### 3.4 Análises Moleculares

Amostras de exemplares identificados morfológicamente, bem como aqueles sem diagnose específica, foram caracterizadas molecularmente, como forma de corroborar os resultados obtidos na análise morfológica ou acrescentar novos dados à identificação desses espécimes.

#### **3.4.1 Caracterização molecular de espécimes do complexo *Amblyomma cajennense***

**Extração:** Espécimes do complexo *A. cajennense* foram encaminhados individualmente para a extração total de DNA genômico (DNAg) (Aljanabi; Martinez 1997). Em conformidade com a técnica, o espécime foi macerado e posteriormente

adicionados 400 µl de buffer A (NaCl 0,4M; EDTA 2mM pH 8,0; Tris HCl 10 mM pH 8,0). Depois acrescentados 40µl de SDS 20% e 8µl de Proteinase K (20mg/ml), em seguida misturados no vortex e incubados a 55-56°C por 1 hora. Após o período de incubação foram adicionados 300µl de NaCl 6M (ou 360µl de NaCl 5M) e expostos ao Vortex por 30s. As amostras foram centrifugadas a 10000 rpm/30 min. e o sobrenadante transferido para um novo tubo, onde foram precipitadas com igual volume de isopropanol por 1 hora à - 20°C, etapa na qual o material pôde ficar várias horas (over night) no freezer, aguardando a continuação do processo. Por conseguinte o material foi centrifugado a 10000rpm / 10min. à 4°C e o sobrenadante desprezado. Após esta etapa foi adicionado ao material aproximadamente 400 µl de etanol 70° GL e o pellet lavado. Em seguida, o material foi centrifugado a 10000 rpm/10min. O sobrenadante resultante foi desprezado e o tubo invertido sobre o papel toalha para secar por aproximadamente 30 min. O pellet foi ressuscitado em 25µl de H<sub>2</sub>O milliQ e para o término da extração o material foi encaminhado à PCR ou estocado a - 20° C.

**Amplificação:** Para a caracterização molecular dos espécimes do complexo *A. cajennense* os ectoparasitos foram submetidos à Reação em cadeia da polimerase (PCR), onde foi amplificado fragmento do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II (COII) (Tabela 1), de acordo com a metodologia descrita na literatura (Bitencourth et al. 2016).

**Eletroforese:** As amostras contendo fragmentos de DNA amplificados foram submetidas à eletroforese (89 volts por 90 minutos) em gel de agarose a 2%, coradas por brometo de etídio (Sambrook; Russell 2001). Posteriormente, os géis foram examinados em scanner de gel, com luz ultravioleta (UV), para observação dos fragmentos de DNA amplificados.

**Tabela 1** - Oligonucleotídeo utilizado no presente trabalho para caracterização molecular de espécimes do complexo *Amblyomma cajennense*.

Gene	Iniciador	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência
Citocromo Oxidase subunidade II	AcCOXIIIF	AATGTYTGRTTWARTCGNCCTGGRA	501	Bitencourth et al. 2016
	AcCOXIIIR	AAATTCWCCHATYATRSARCAAAT		

COII = Citocromo Oxidase subunidade II

Também foi realizada PCR de alíquotas contendo *pool* de larvas e ninfas, a fim de verificar a identidade desses espécimes, no entanto, este resultado não foi utilizado para caracterizar espécimes do complexo *A. cajennense* no estado de Goiás, utilizando-se para esta finalidade alíquotas contendo espécime único.

### 3.4.2 Pesquisa de riquetsias

**Extração:** Para pesquisa e identificação das riquetsias, seguiu-se a técnica descrita acima de Aljanabi e Martinez (1997). As amostras foram definidas por espécime único ou reunidos em grupo (*pool*), segundo o estágio e/ou sexo.

**Amplificação:** A pesquisa de genes de riquetsias foi realizada, em todas as amostras, através da PCR. As amplificações foram executadas utilizando iniciadores e protocolos disponíveis na literatura (Tabela 2).

**Tabela 2** – Oligonucleotídeos utilizados no presente trabalho para detecção de riquetsias.

Gene	Iniciador	Sequência de nucleotídeo (5'-3')	Fragmento (pb)	Referência	
<i>Rickettsia</i> sp. (Gênero específico)	<i>gltA</i>	CS2-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401	Labruna et al. 2004
		CS2-323	GCTTCCTTAAAAATCAATAAATCAGGAT		
<i>Rickettsia</i> sp. GFM	<i>ompA</i>	<i>Rr</i> 190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAA	532	Regnery et al. 1991
		<i>Rr</i> 190.602n	AGTGCAGCATTGCTCCCCCT		
<i>Rickettsia</i> sp. GFM + GT	<i>ompB</i>	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	862	Roux e Raoult 2000
		120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA		
<i>Rickettsia</i> spp.	Gene D	D1738f	GTA TCT GAA TTA AGC AAT GCG	744	Sekeyova et al. 2001
		D2482r	CTA TAA CAG GAT TAA CAG CG		
<i>Rickettsia</i> spp.	Gene D	D1219f	CCA AAT CTT CTT AAT ACA GC	657	Sekeyova et al. 2001
		D2482r	CTA TAA CAG GAT TAA CAG CG		

GFM = Grupo Febre Maculosa; GT = Grupo Tifo.

**Eletroforese:** Após a PCR, as amostras foram submetidas à eletroforese (89 volts por 90 minutos) em gel de agarose 2%, coradas por brometo de etídio (Sambrook; Russell 2001). Posteriormente, os géis analisados com auxílio de luz UV.

### **3.4.3 Purificação, sequenciamento do DNA e edição de sequências**

**Purificação:** Os amplicons que corresponderam ao tamanho de produto amplificado esperado foram purificados com o Kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nagel), de acordo com o manual do fabricante.

**Sequenciamento do DNA:** As reações de sequenciamento das amostras purificadas foram executadas na Plataforma de sequenciamento de DNA da FIOCRUZ/ RJ, utilizando o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing *kit*, de acordo com as recomendações do fabricante. Nessas reações foram utilizados os mesmos iniciadores empregados na PCR, para determinação das sequências em ambas as direções (3'-5' e 5'-3'). Posteriormente, as amostras foram precipitadas, ressuspendidas em formamida e aplicadas em sequenciador automático ABI 3730.

**Edição de sequências:** As sequências obtidas para cada gene foram editadas e consenso geradas no programa ChromasPro 1.5 (Technelysium, Queensland, Australia). Em seguida, identificadas por avaliação de similaridade, através de análise comparativa com as sequências depositadas no banco de dados *GenBank*, com auxílio do programa BLASTN (National center for Biotechnology Information 2016). Todas as sequências obtidas no presente trabalho foram depositadas no *GenBank* sob os números de acesso KY753097 - KY753130.

### **3.4.4 Análise Filogenética**

Para caracterizar molecularmente e entender a relação entre os diferentes espécimes do complexo *A. cajennense* estudados, frente ao conhecimento disponível na literatura, as sequências geradas e sequências disponíveis no *Genbank*, para o gene COII, foram submetidas à reconstrução filogenética por análise de Máxima Verossimilhança no programa PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010), utilizando o modelo evolutivo HKY+G, indicado pelo programa MEGA versão 6.0 (Tamura et al. 2013). Valores de confiança nos ramos internos foram estimados com o teste *aLRT* (*approximate likelihood ratio test*) com 1000 réplicas (Anisimova e Gascuel 2006). Como grupo externo foi utilizado *Amblyomma sphenodonti* (Dumbleton 1943).

Para aprofundar o conhecimento de identificação das riquetsias, foi realizada reconstrução filogenética, para cada gene, utilizando a mesma análise e critérios empregados na reconstrução filogenética de *A. cajennense* s.l., onde para os genes *gltA* e *ompA* foi empregado na reconstrução o modelo evolutivo T92+G e para o *ompB* GTR+G. Para gerar maior robustez na identificação das riquetsias detectadas no atual trabalho, foi feita reconstrução filogenética concatenada para os genes *gltA*, *ompA* e *ompB*, empregando o modelo evolutivo T92+G. Para reconstrução filogenética das riquetsias procurou-se utilizar sequências a partir de genomas completos. Quando não havia genoma completo foram utilizadas sequências parciais.

Os números de acesso das sequências do *GenBank* utilizadas nas árvores filogenéticas dos espécimes do complexo *A. cajennense* e das riquetsias, foram organizados em duas tabelas, as quais encontram-se no Anexo D.

#### **3.4.5 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)**

No presente trabalho a FMVI foi calculada para cada espécie mediante os resultados obtidos na PCR (Burket et al. 1998). Este indicador permite inferir a frequência mínima de vetores infectados de uma determinada espécie para cada área estudada.

$$FMVI = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de amostras positivas para cada espécie}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de vetores de cada espécie}}$$

#### **3.5 Confeção dos mapas de distribuição dos espécimes do complexo *Amblyomma cajennense* e das riquetsias identificadas**

Para a confeção dos mapas de distribuição de *A. cajennense* s.s. e *A. sculptum* foram utilizadas as coordenadas dos espécimes de cada amostra em que foram realizadas a análise morfológica e também dos espécimes submetidos à análise molecular.

Os shape files utilizados foram obtidos no site do IBGE ([www.ibge.gov.br](http://www.ibge.gov.br)) = (i) estados do Brasil, (ii) Principais municípios, Biomas e recursos hídricos do estado de Goiás (iii) Biomas e relevo do estado de Goiás. O Programa utilizado na confeção dos mapas foi o Qgis “Las Palmas” versão 2.18 (<http://qgis.org/en/site/>). Os mapas



foram confeccionados utilizando os recursos (plugins do Qgis) Open Layers - Bing Maps - Bing Aerial e OSM Land TF Outdoors.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 Resultado da triagem e identificação dos ectoparasitos coletados

Foram coletados, triados e identificados um total de 5.294 ectoparasitos, entre carrapatos, ácaros e pulgas (Tabela 3).

**Tabela 3** - Ectoparasitos coletados em áreas de vigilância de ambiente ou investigação de casos Febre Maculosa (FM) no estado de Goiás/ Brasil.

Ano	Ectoparasitos coletados e identificados	LL	NN	(♂♂)	(♀♀)	Total de exemplares por espécie
2014	<i>Amblyomma dubitatum</i>	0	0	0	2	2
	<i>Amblyomma sculptum</i>	30	0	6	44	80
	<i>Amblyomma cajennense</i> s.s.	0	0	0	1	1
	<i>Amblyomma cajennense</i> s.l.	163	17	69	22	271
	<i>Amblyomma rotundatum</i>	41	0	0	8	49
	<i>Amblyomma parvum</i>	0	0	0	1	1
2015	<i>Amblyomma nodosum</i>	0	0	3	0	3
	<i>Amblyomma naponense</i>	0	1	0	0	1
	<i>Anocentor nitens</i> (= <i>Dermacentor nitens</i> )	217	0	0	0	217
	<i>Ctenocephalides felis</i>	0	0	2	5	7
2016	<i>Amblyomma sculptum</i>	16	1	2	120	139
	<i>Amblyomma cajennense</i> s.s.	0	0	0	3	3
	<i>Amblyomma cajennense</i> s.l.	666	660	120	38	1484
	<i>Amblyomma dubitatum</i>	2224	129	18	8	2379
	<i>Amblyomma rotundatum</i>	0	0	0	1	1
	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	572	0	8	32	612
	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	0	14	25	39
	<i>Xenopsylla</i> sp.	0	0	0	1	1
	<i>Androlaelaps</i> sp.	0	0	0	2	2
<i>Ctenocephalides felis</i>	0	0	0	2	2	
TOTAL		3929	808	242	315	5294

LL - larvas / NN - ninfas / ♂♂ - machos / ♀♀ - fêmeas

### 4.2 Resultado da análise morfológica dos espécimes do complexo *Amblyomma cajennense*

Abaixo estão listados os resultados da análise morfológica dos espécimes do complexo *A. cajennense* coletados no presente trabalho, seguidos dos seus respectivos hospedeiros/ ambiente, local de coleta e coordenadas. Estão grifados os municípios de origem dos espécimes. Em negrito e grifado estão às macrorregiões de Goiás e apenas em negrito o código de registro dos espécimes na coleção CAVAISC/ FIOCRUZ.

## Localidades e coordenadas do material obtido no presente estudo

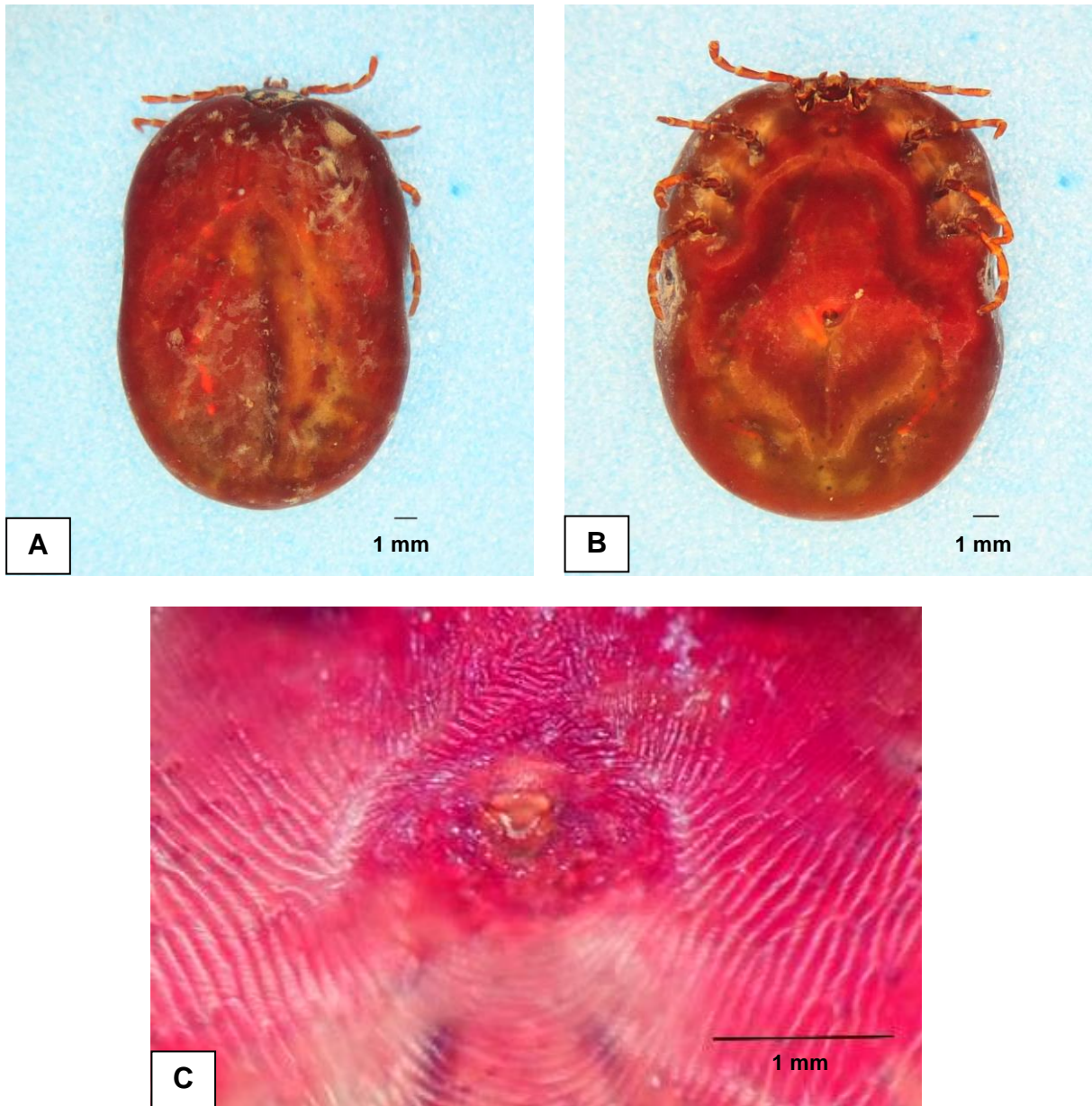
**Macrorregião Centro Oeste de Goiás:** Jandaia: **LIC 6753** - 2 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Pasto (Rio Capivari - Fazenda Braveza) (-17.059277,-50.028783) / **LIC 6753** - 7 ♂♂ *Amblyomma cajennense s.l.* - Pasto (Rio Capivari - Fazenda Braveza) (-17.059277,-50.028783) / **LIC 6753** - 2 NN *Amblyomma cajennense s.l.* - Pasto (Rio Capivari - Fazenda Braveza) (-17.059277,-50.028783) / **LIC 6753** - 113 LL *Amblyomma cajennense s.l.* - Pasto (Rio Capivari - Fazenda Braveza) (-17.059277,-50.028783) / **LIC 6754** - 20 ♂♂ *Amblyomma cajennense s.l.* - Mata (Rio Capivari - Fazenda Braveza) (-17.059277,-50.028783) / **LIC 6754** - 22 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Mata (Rio Capivari - Fazenda Braveza) (-17.059277,-50.028783) Indiara: **LIC 6752** - 1 ♂ *Amblyomma cajennense s.l.* - Mata (Rio Capivari) (-17.3167, -50.1167) / **LIC 6752** - 1 ♀ *Amblyomma sculptum* - Mata (Rio Capivari) (-17.3167, -50.1167) Trindade: **LIC 6759** - 1 ♂ *Amblyomma cajennense s.l.* - *Myrmecophaga tridactyla* (Central-Reg. IBAMA 286) (-16.645043, -49.497331) Goiânia: **LIC 6751** - 2 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - *Hydrochoerus hydrochaeris* - (Central- Jardim Goiás) (-16.694256, -49.239415) / **LIC 6751** - 7 NN *Amblyomma cajennense s.l.* - *Hydrochoerus hydrochaeris* - (Central- Jardim Goiás) (-16.694256, -49.239415) / **LIC 7282** - 1 ♀ *Amblyomma sculptum* - Mata - (Campus Samambaia - UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7283** - 10 ♂♂ *Amblyomma cajennense s.l.* - Mata - (Campus Samambaia - UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7283** - 16 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Mata - (Campus Samambaia - UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7283** - 7 LL *Amblyomma cajennense s.l.* - Mata - (Campus Samambaia - UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7285** - 44 NN *Amblyomma cajennense s.l.* - Mata - (SINTUFG - Campus Samambaia / UFG) (-16.671897, -49.244404) / **LIC 7285** - 102 LL - *Amblyomma cajennense s.l.* - Mata - (SINTUFG - Campus Samambaia / UFG) (-16.671897, -49.244404) / **LIC 7288** - 8 ♂♂ *Amblyomma cajennense s.l.* - Mata - (Campus Samambaia / UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7288** - 11 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Mata - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7288** - 1 N *Amblyomma cajennense s.l.* - Mata - (Campus Samambaia / UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7292** - 3 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Mata / Aviário / Horta - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7293** - 3 ♂♂ *Amblyomma cajennense s.l.* - Horta / Piscicultura - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7293** - 2 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Horta / Piscicultura - (Campus Samambaia/ UFG) (-

16.598773, -49.263759) / **LIC 7295** - 19 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Canavial - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7295** - 23 ♂♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - Canavial - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7295** - 30 LL *Amblyomma cajennense* s.l. - Canavial - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7296** - 13 ♂♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - Bananal - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7296** - 15 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Bananal - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7296** - 3 NN *Amblyomma cajennense* s.l. - Bananal - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7297** - 36 ♂♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - Mata - (Lago da Capivara - Campus Samambaia/ UFG) (-16.603884, -49.259627) / **LIC 7297** - 52 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Mata - (Lago da Capivara - Campus Samambaia/ UFG) (-16.603884, -49.259627) / **LIC 7301** - 221 LL *Amblyomma cajennense* s.l. - Canavial - (Campus Samambaia/ UFG) (-16.598773, -49.263759) / **LIC 7305** - 77 LL *Amblyomma cajennense* s.l. - Marsupial - (Aviário - Campus Samambaia/ UFG) (-16.600172, -49.275984) / **LIC 7313** - 16 LL *Amblyomma cajennense* s.l. - *Didelphis* sp. - Goiânia (-16.666667, -49.25) Aparecida de Goiânia: **LIC 6749** - 1 ♀ *Amblyomma sculptum*\*\* - *Myrmecophaga tridactyla* - (Central - Aparecida de Goiânia) (-16.822510, -49.245431) / **LIC 6749** - 1 ♀ *Amblyomma cajennense* s.s.\*\* - *Myrmecophaga tridactyla* - (Central - Aparecida de Goiânia) (-16.822510, -49.245431) / **LIC 6749** - 13 ♂♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - *Myrmecophaga tridactyla* - (Central - Aparecida de Goiânia) (-16.822510, -49.245431) / **LIC 6749** - 4 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - *Myrmecophaga tridactyla* - (Central - Aparecida de Goiânia) (-16.822510, -49.245431) Bela Vista de Goiás: **LIC 6750** - 2 ♂♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - *Myrmecophaga tridactyla* - (Central - Bela Vista de Goiás) (-16.972514, -48.955071) / **LIC 6750** - 1 ♀ *Amblyomma sculptum* - *Myrmecophaga tridactyla* - (Central - Bela Vista de Goiás) (-16.972514, -48.955071). Macrorregião Nordeste de Goiás: Alto Paraíso de Goiás: **LIC 6748** - 1 ♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - Mata - (Povoado São Jorge- Velho) (-14.176611, -47.813946). Macrorregião Norte de Goiás: Niquelândia: **LIC 6755** - 1 ♀ *Amblyomma sculptum* - Mata - (Pousada Vida de Peixe - Lago Serra da mesa) (-14.065766, -48.360898) / **LIC 6755** - 3 ♂♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - Mata - (Pousada Vida de Peixe - Lago Serra da mesa) (-14.065766, -48.360898) / **LIC 6756** - 2 ♂♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - Mata - (Cachoeira - Lago Serra da mesa) (-14.463986, -48.456796) / **LIC 6756** - 3 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Mata -

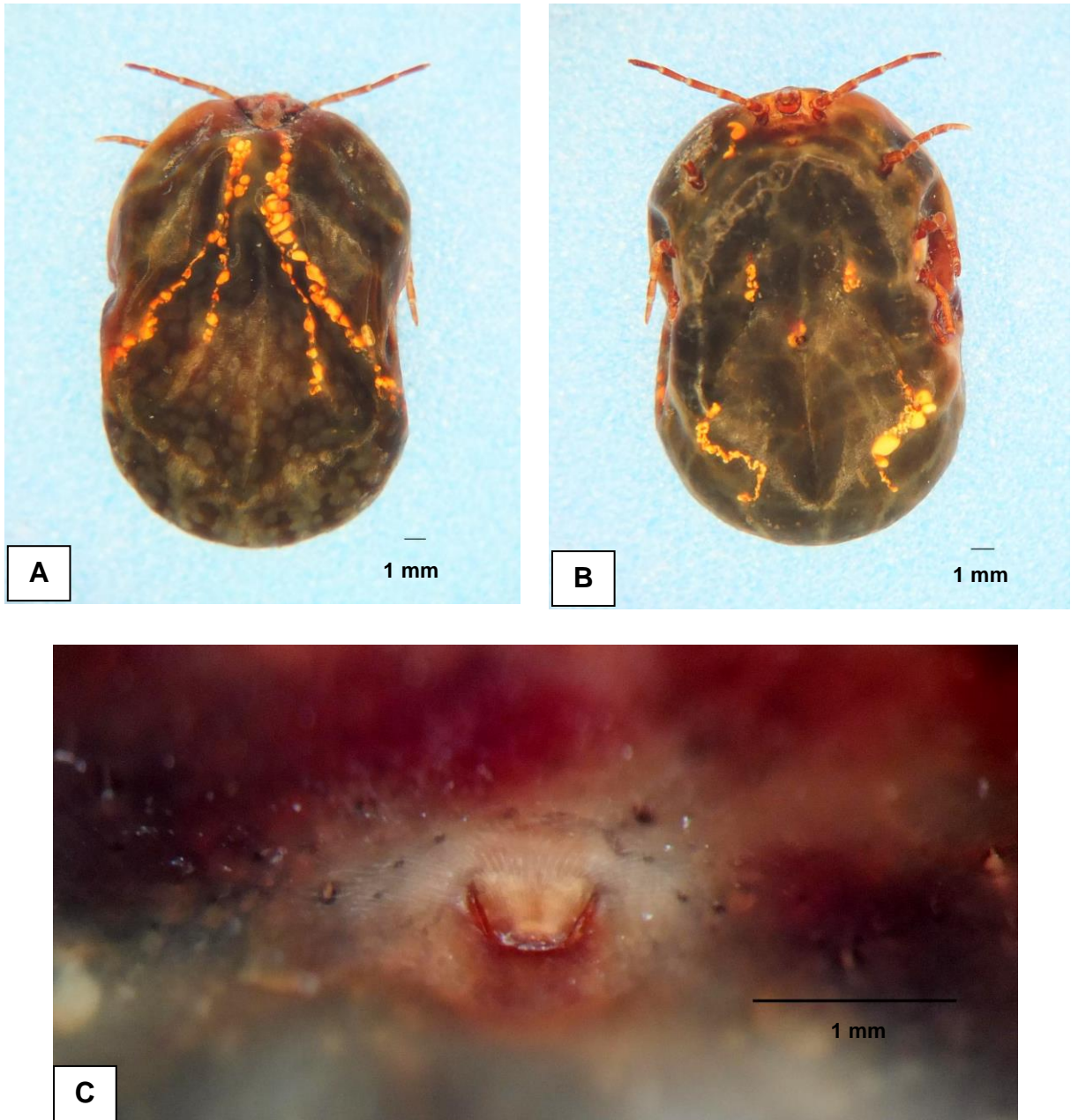
(Cachoeira - Lago Serra da mesa) (-14.463986, -48.456796) / **LIC 6757** - 1 ♂ *Amblyomma cajennense* s.l. - Mata - (Pousada Vida de Peixe - Lago Serra da mesa) (-14.065766, -48.360898) / **LIC 6758** - 2 ♀♀ *Amblyomma sculptum* - Mata - (Pousada Vida de Peixe - Lago Serra da mesa) (-14.065766, -48.360898) Bonópolis: **LIC 8140** - 60 NN *Amblyomma cajennense* s.l. - Mata - (Fazenda São João da Mata - Córrego) (-13.635833, -49.81) / **LIC 8141** - 21 NN *Amblyomma cajennense* s.l. - Mata - (Fazenda São João da Mata - Córrego) (-13.635833, -49.81) / **LIC 8142** - 34 NN *Amblyomma cajennense* s.l. - Mata - (Fazenda São João da Mata - Córrego) (-13.635833, -49.81) / **LIC 8142** - 3 ♀♀ *Amblyomma cajennense* s.s. - Mata - (Fazenda São João da Mata - Córrego) (-13.635833, -49.81). Macrorregião Sudeste de Goiás: Ipameri: **LIC 8010** - 4 LL *Amblyomma cajennense* s.l. - Pasto - (Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri) (-17.720297, -48.167422) / **LIC 8010** - 228 NN *Amblyomma cajennense* s.l. - Pasto - (Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri) (-17.720297, -48.167422) / **LIC 8012** - 2 LL *Amblyomma cajennense* s.l. - Pasto - (Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri) (-17.720297, -48.167422) / **LIC 8012** - 216 NN *Amblyomma cajennense* s.l. - Pasto - (Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri) (-17.720297, -48.167422).

\*\* Foram encontrados um espécime fêmea de *A. sculptum* e outro espécime fêmea de *A. cajennense* s.s. em um mesmo hospedeiro *M. tridactyla* no município de Aparecida de Goiânia, macrorregião Centro Oeste de Goiás (LIC 6749). As fotos dos espécimes (visão dorsal), (visão ventral) e da abertura genital de *A. cajennense* s.s. na Figura 3 fêmea e de *A. sculptum* na Figura 4 .

As ninfas de três diferentes macrorregiões do estado de Goiás foram mensuradas, os resultados encontram-se na Tabela do Anexo A. No entanto, os resultados obtidos com base nas mensurações das ninfas (relação Larg./Compr.) foram inconclusivos. Dessa forma, todos os espécimes de ninfas submetidos à análise morfológica e que não obtivemos sequências dos mesmos, estes foram identificados como *A. cajennense* s.l.



**Figura 3** - Fotos de espécime fêmea de *Amblyomma cajennense* s.s. coletado em *Myrmecophaga tridactyla* no município de Aparecida de Goiânia, estado de Goiás – **A**: Espécime fêmea de *Amblyomma cajennense* s.s. (visão dorsal); **B**: Espécime fêmea de *Amblyomma cajennense* s.s. (visão ventral); **C**: Abertura genital do espécime fêmea de *Amblyomma cajennense* s.s.



**Figura 4** - Fotos de espécime fêmea de *Amblyomma sculptum* coletado em *Myrmecophaga tridactyla* no município de Aparecida de Goiânia, estado de Goiás – **A**: Espécime fêmea de *Amblyomma sculptum* (visão dorsal); **B**: Espécime fêmea de *Amblyomma sculptum* (visão ventral); **C**: Abertura genital do espécime fêmea de *Amblyomma sculptum*.

### 4.3 Resultado da análise molecular dos espécimes do complexo *Amblyomma cajennense*

Foram submetidos 485 (24,52%) espécimes do complexo *A. cajennense* a PCR com o gene COII e foram obtidas dezoito sequências de *A. sculptum*, dessas, quinze foram utilizadas para caracterizar os espécimes do complexo *A. cajennense* nos municípios de Goiás, por tratar-se de amostras contendo espécime único (Tabela 4), as respectivas sequências encontram-se no Anexo B e Anexo C. Onze amostras apresentaram 99% de identidade com *A. sculptum*, três apresentaram 98% de identidade com *A. sculptum* e uma 97% de identidade com *A. sculptum* (Tabela 4).

A reconstrução filogenética dos espécimes de *A. sculptum* através do gene COII (Figura 5), apresentou resultados condizentes com a identificação de *A. sculptum* através de busca no BLASTN e também com a análise morfológica dos espécimes do complexo *A. cajennense* (Tabela 4).

Foi possível comprovar a presença de *A. sculptum* em três macrorregiões do estado de Goiás, área de Cerrado. Somente no município de Goiânia, endêmico da FM, foram caracterizados quatro espécimes de *A. sculptum*, três fêmeas e uma ninfa (Tabela 4). Em Aparecida de Goiânia, município vizinho de Goiânia, foram caracterizados seis espécimes de *A. sculptum*, três machos e três fêmeas. No município de Trindade, também vizinho de Goiânia, foi caracterizado um espécime macho de *A. sculptum* (Tabela 4).

Para a macrorregião Norte do estado, foi comprovada a presença de *A. cajennense* s.s. mediante análise morfológica de fêmeas do complexo *A. cajennense* oriundas do município de Bonópolis e a análise molecular possibilitou caracterizar a presença de *A. sculptum* em um dos municípios dessa região, precisamente Niquelândia. Ainda não há relatos de FM confirmados nesta região de Goiás (Tabela 4).

Na região Nordeste de Goiás foi caracterizada a presença de *A. sculptum* mediante um espécime macho, chamando a atenção para a circulação do vetor competente de *R. rickettsii* em uma região onde ainda não há casos confirmados de FM (Tabela 4).



Para a macrorregião sudeste do estado, onde também não há casos confirmados de FM, foi caracterizada a presença de *A. sculptum* no município de Ipameri (Tabela 4).

Na filogenia inferida com base no gene COII é possível observar agrupamentos claramente definidos. O filodendograma da Figura 5 demonstra que a sequência do espécime de Alto Paraíso de Goiás (LIC 6747) é filogeneticamente próxima ao haplótipo H, haplótipo B e haplótipo D, do estado do Rio de Janeiro (Figura 5).

As sequências obtidas, provenientes dos municípios de Jandaia (LIC 6753H), Goiânia (LIC 7311A, LIC 7285A, LIC 7287A e LIC 7298B), Ipameri (LIC 8010A), Aparecida de Goiânia (LIC 6749E, LIC 6749H, LIC 6749B, LIC 6749A e LIC 6751A) e Trindade (LIC 6759B), formam juntos um único agrupamento, e estão filogeneticamente próximas ao haplótipo C do estado do Rio de Janeiro (Figura 5).

Sequências do município de Goiânia (7283B), Jandaia (LIC 6754Q) e Niquelândia (LIC 6758) agruparam e estão próximas em termos filogenéticos as sequências obtidas no *GenBank* dos estados do Rio de Janeiro e Mato Grosso (Figura 5).

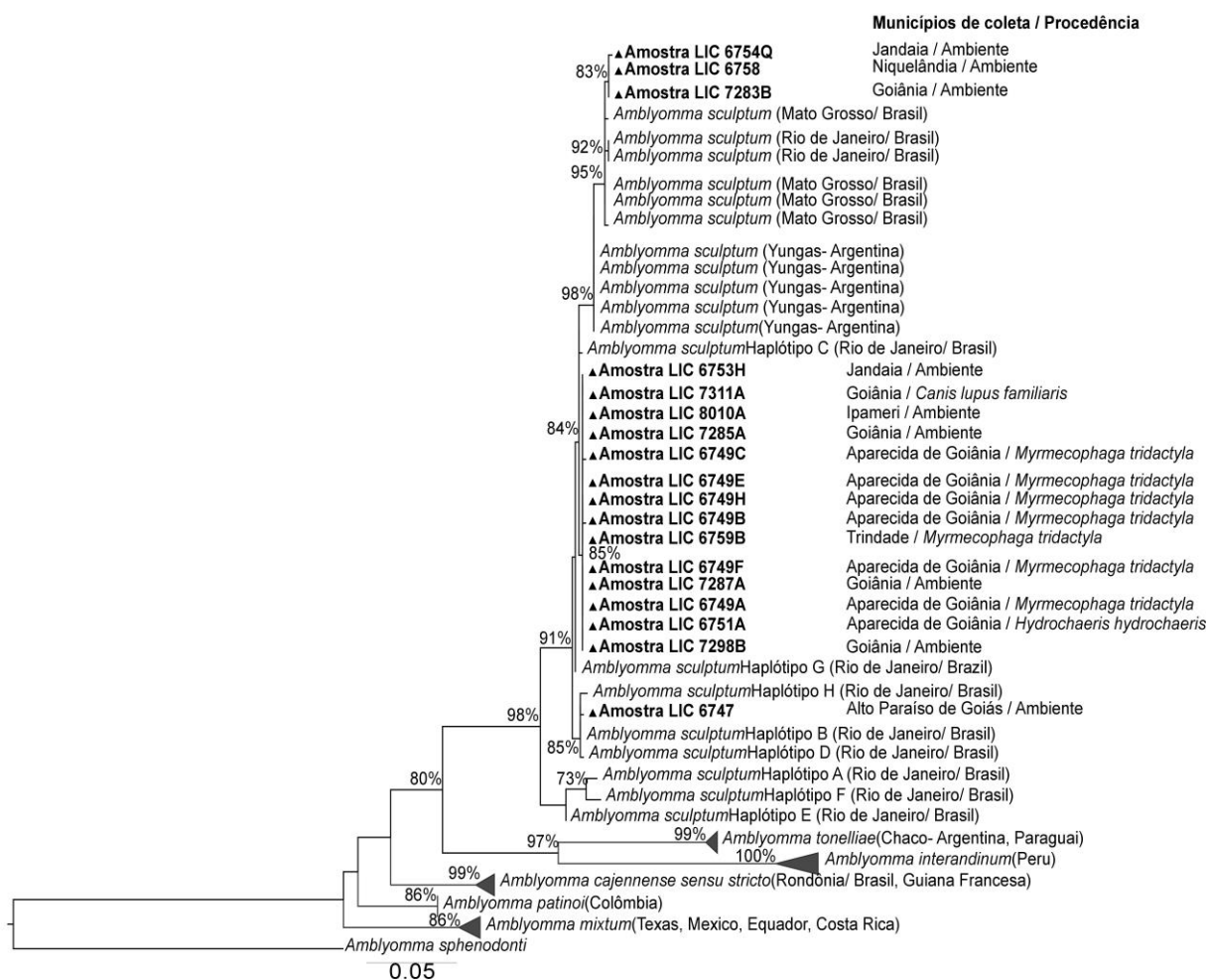
É possível, avaliar na filogenia inferida com base no gene COII, três diferentes agrupamentos filogenéticos de sequências provenientes de espécimes de *A. sculptum* oriundos de diferentes regiões do estado de Goiás.

As sequências de *A. sculptum* obtidas no presente trabalho foram depositadas no *GenBank*, com os seguintes números de acesso: LIC 6749H (KY753097), 6751A (KY753098), LIC 6753H (KY753099), LIC 6759B (KY753100), LIC 7283B (KY753101), LIC 7285A (KY753102), LIC 7287A (KY753103), LIC 7298B (KY753104), LIC 7311A (KY753105), LIC 8010A (KY753106), LIC 6749C (KY753107), LIC 6749E (KY753108), LIC 6754Q (KY753109), LIC 6758 (KY753110), LIC 6749B (KY753111), LIC 6747 (KY753112), LIC 6749F (KY753113), LIC 6749A (KY753114).

**Tabela 4** - Identificação, através de busca no BLASTN, de sequência parcial do gene Citocromo Oxidase subunidade II (COII) de amostras de espécimes únicos do complexo *Amblyomma cajennense*.

Gene	Amostra (LIC)	Estádio	Município	Local	Macrorregiões de GO	Hospedeiro / Procedência	Identidade	(%)	Nº de acesso no Genbank
	6749A	1♂	Aparecida de Goiânia	Central - GO	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	98	KF787613
	6749B	1♂	Aparecida de Goiânia	Central - GO	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	98	KF787613
	6749C	1♂	Aparecida de Goiânia	Central - GO	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF787613
	6749E	1♀	Aparecida de Goiânia	Central - GO	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF787613
	6749F	1♀	Aparecida de Goiânia	Central - GO	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF614683
	6749H	1♀	Aparecida de Goiânia	Central - GO	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF787613
	6751A	1♂	Goiânia	Central- Jardim de Goiás	Centro Oeste	<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF787613
CO II	7285A	1♂	Goiânia	SINTUFG	Centro Oeste	Mata	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF614683
	7287A	1♂	Goiânia	Campus Samambaia- UFG	Centro Oeste	Ambiente	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF614683
	7311A	1N	Goiânia	Aviário-Campus Samambaia-UFG	Centro Oeste	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF614683
	6754Q	1♂	Jandaia	Rio Capivari (margem)	Centro Oeste	Mata	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF614678
	6759B	1♂	Trindade	Cental-Reg. IBAMA 286	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>	98	KF787613
	6758	1♂	Niquelândia	Pousada Vida de Peixe - Lago Serra da Mesa	Norte	Mata	<i>Amblyomma sculptum</i>	97	KF614678
	6747	1♂	Alto Paraíso de Goiás	Povoado São Jorge-Velho	Nordeste	Mata	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF614680
	8010A	1♀	Ipameri	Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri	Sudeste	Pasto	<i>Amblyomma sculptum</i>	99	KF787613

♂ = Macho; ♀ = Fêmea; N = Ninfa



**Figura 5** - Filogenia inferida por análise de Máxima Verossimilhança, de sequências parciais do gene mitocondrial Citocromo Oxidase subunidade II (490 pb), representando as relações entre amostras coletas em Goiás e espécies do complexo *Amblyomma cajennense* de diferentes locais das Américas. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.

#### 4.4 Resultado da caracterização molecular das riquetsias

Foram submetidos a PCR 734 (13, 86%) exemplares de ectoparasitos distribuídos em 217 alíquotas para pesquisa de riquetsias. Uma tabela contendo a frequência absoluta de vetores coletados ( $N$ ), frequência de vetores submetidos a PCR para detecção de riquetsias ( $n$ ) e seus respectivos hospedeiros, encontra-se no Anexo H.

Na Tabela 5 estão relacionados os resultados apurados com base nas sequências obtidas de fragmentos dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* mediante busca no BLASTN da identidade (%) das riquetsias detectadas no presente trabalho.

Entre as amostras consideradas positivas, nove amplificaram fragmento do gene *gltA*. A Figura 6 apresenta a respectiva árvore filogenética, na qual é possível identificar três diferentes espécies do gênero *Rickettsia* no estado de Goiás. Em duas dessas amostras provenientes do município de Gameleira, município endêmico da FM, cujo os espécimes de *C. felis* foram coletados em *Canis lupus familiaris*, foram detectadas *R. felis* (LIS 652 D / LIS 652 E).

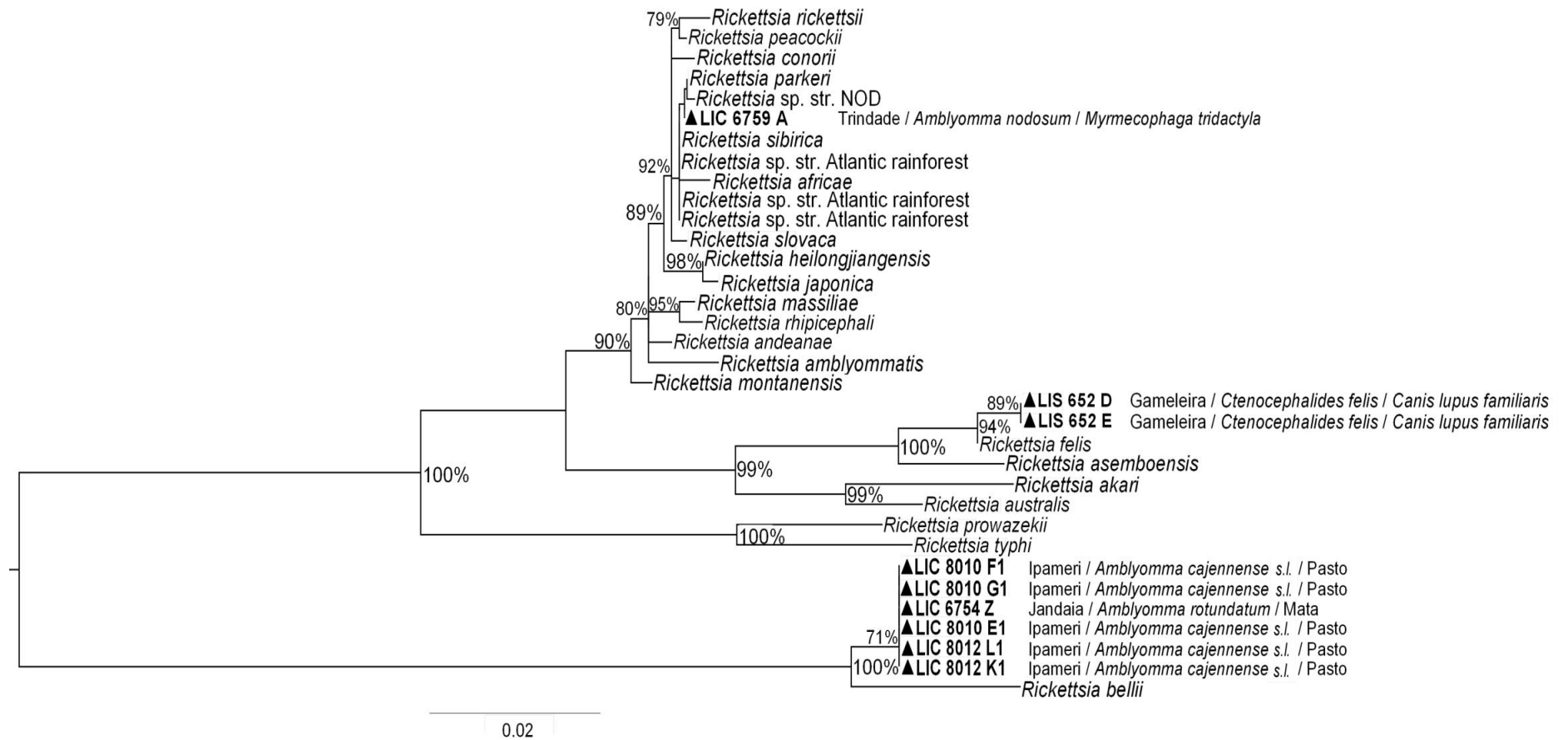
A reconstrução filogenética com base no fragmento de gene *gltA*, demonstrou ainda que *R. bellii* foi detectada em cinco amostras (LIC 8010E1, LIC 8010F1, LIC 8010G1, LIC 8012K1, LIC 8012L1) de *A. cajennense* s.l. no município de Ipameri (Figura 6). *R. bellii* também foi identificada em uma amostra (LIC 6754Z) oriunda do município de Jandaia, sendo este município próximo as áreas de casos confirmados da FM no estado de Goiás (Figura 6). As sequências de *R. bellii* provenientes de ambos os municípios Jandaia e Ipameri, formam um único agrupamento, com valor de suporte alto (100%), junto a sequência de *R. bellii* obtida no *GenBank*, como pode ser verificado na Figura 6.

A riquetsia detectada na amostra LIC 6759A proveniente de *Amblyomma nodosum* (Neumann 1899), na árvore do *gltA* ficou filogeneticamente próxima a *Rickettsia* sp. strain. NOD e *R. parkeri* foi incluída neste mesmo agrupamento (Figura 6).

**Tabela 5** - Identificação através de busca no BLASTN das riquetsias detectadas por análise de sequências de nucleotídeos de fragmento dos genes *ompA*, *gltA* e *OmpB*.

Gene	Amostra (LIC)	Ectoparasito	Estádio	Município	Local	Macrorregiões de GO	Hospedeiro / Procedência	Identidade	(%)	Nº de acesso no Genbank
	6754Z	<i>Amblyomma rotundatum</i>	30LL	Jandaia	Rio Capivari (margem)	Centro Oeste	Mata	<i>Rickettsia bellii</i>	98	CP000087
	6759A	<i>Amblyomma nodosum</i>	1♂	Trindade	Cental-Reg. IBAMA 286	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Rickettsia africae</i>	100	HQ335126.1
	6759A	<i>Amblyomma nodosum</i>	1♂	Trindade	Cental-Reg. IBAMA 286	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	100	CP003341.1
	6759A	<i>Amblyomma nodosum</i>	1♂	Trindade	Cental-Reg. IBAMA 286	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Rickettsia sibirica</i>	100	KU310587
gltA	652D	<i>Ctenocephalides felis</i>	1♀	Gameleira	Fazenda Mucambinho-Mucambinho	Norte	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Rickettsia felis</i>	99	JQ674484
	652E	<i>Ctenocephalides felis</i>	1♂	Gameleira	Fazenda Mucambinho-Mucambinho	Norte	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Rickettsia felis</i>	99	JQ674484
	8010 E1	<i>Amblyomma cajennense</i> s. l.	3NN	Ipameri	Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri	Sudeste	Pasto	<i>Rickettsia bellii</i>	97	CP000087
	8010 F1	<i>Amblyomma cajennense</i> s. l.	3NN	Ipameri	Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri	Sudeste	Pasto	<i>Rickettsia bellii</i>	97	CP000087
	8010 G1	<i>Amblyomma cajennense</i> s. l.	3NN	Ipameri	Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri	Sudeste	Pasto	<i>Rickettsia bellii</i>	99	CP000087
	8012 K1	<i>Amblyomma cajennense</i> s. l.	20LL	Ipameri	Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri	Sudeste	Pasto	<i>Rickettsia bellii</i>	100	EU826511
	8012 L1	<i>Amblyomma cajennense</i> s. l.	20LL	Ipameri	Chácara Camélia-Estrada de Ferro-Ipameri	Sudeste	Pasto	<i>Rickettsia bellii</i>	99	CP000087
ompA	6759A	<i>Amblyomma nodosum</i>	1♂	Trindade	Cental-Reg. IBAMA 286	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Rickettsia</i> sp.	99	KP987310
	652D	<i>Ctenocephalides felis</i>	1♀	Gameleira	Fazenda Mucambinho-Mucambinho	Norte	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Rickettsia felis</i>	99	AJ563398
	6759A	<i>Amblyomma nodosum</i>	1♂	Trindade	Cental-Reg. IBAMA 286	Centro Oeste	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	99	CP003341
ompB	652D	<i>Ctenocephalides felis</i>	1♀	Gameleira	Fazenda Mucambinho-Mucambinho	Norte	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Rickettsia felis</i>	99	KF056801
	652E	<i>Ctenocephalides felis</i>	1♂	Gameleira	Fazenda Mucambinho-Mucambinho	Norte	<i>Canis lupus familiaris</i>	<i>Rickettsia felis</i>	99	KF056801

♂ = Macho; ♀ = Fêmea; LL = Larvas; NN = Ninfas



**Figura 6** - Filogenia inferida através da reconstrução por Máxima Verossimilhança de sequências parciais do gene *gltA* de riquetsias. A árvore foi enraizada por *midpoint root*. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.

Foi detectada a presença do gene *ompA* em duas amostras (LIC 6759A) e (LIS 652D) (Tabela 5). Na filogenia inferida com base no gene *ompA* (Figura 7), é possível observar que a sequência proveniente da amostra LIC 6759A encontra-se no mesmo ramo da sequência obtida no *GenBank* de *Rickettsia* sp. str. NOD com alto valor de suporte (97%) e no mesmo agrupamento, *R. parkeri* (Figura 7).

A partir da reconstrução filogenética com base em fragmento do gene *ompB*, também foi possível separar em um mesmo agrupamento a sequência obtida no presente trabalho do LIC 6759A e a sequência de *Rickettsia* sp. str. NOD obtida no *GenBank* (Figura 8).

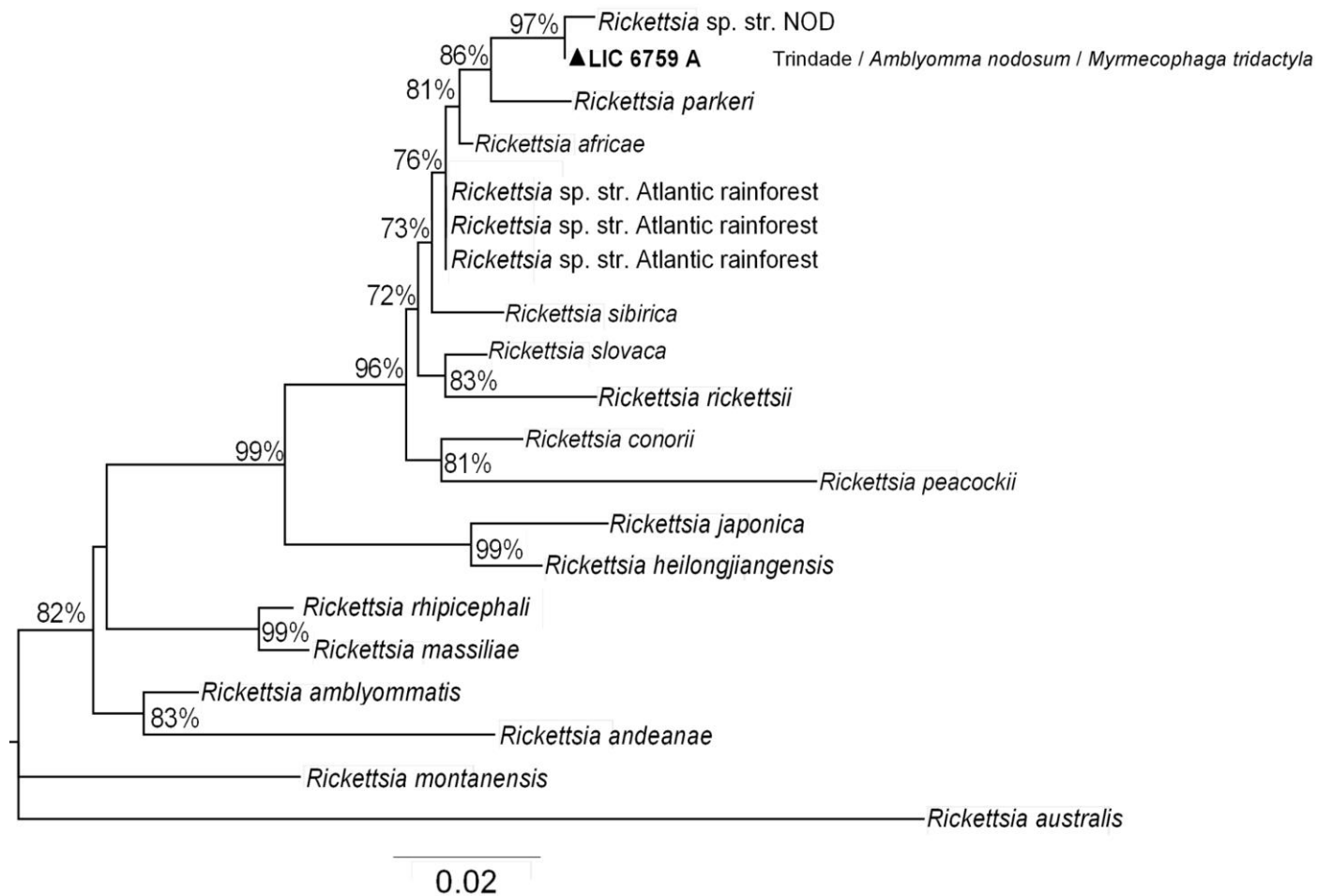
As sequências provenientes de duas amostras (LIS 652D / LIS 652E) de *C. felis*, coletados de *Canis lupus familiaris* no município de Gameleira, formaram um único agrupamento com a sequência de *R. felis* obtida no *GenBank*, com alto valor de suporte (100%) (Figura 8).

Como forma de aumentar a resolução filogenética, as sequências obtidas dos fragmentos dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB*, foram concatenadas e geraram um quarto filodendograma (Figura 9). Nessa árvore filogenética, a sequência obtida a partir da amostra LIC 6759A agrupa com sequências provenientes do *GenBank* de *Rickettsia* sp. str. NOD, com alto valor de suporte (98%), corroborando os resultados obtidos nos filodendogramas anteriores (Figura 9).

As sequências de *R. felis* provenientes das amostras (LIS 652D / LIS 652E) formaram um único agrupamento com a sequência de *R. felis* obtida no *GenBank* (valor de suporte 93%), corroborando os resultados anteriores (Figura 9).

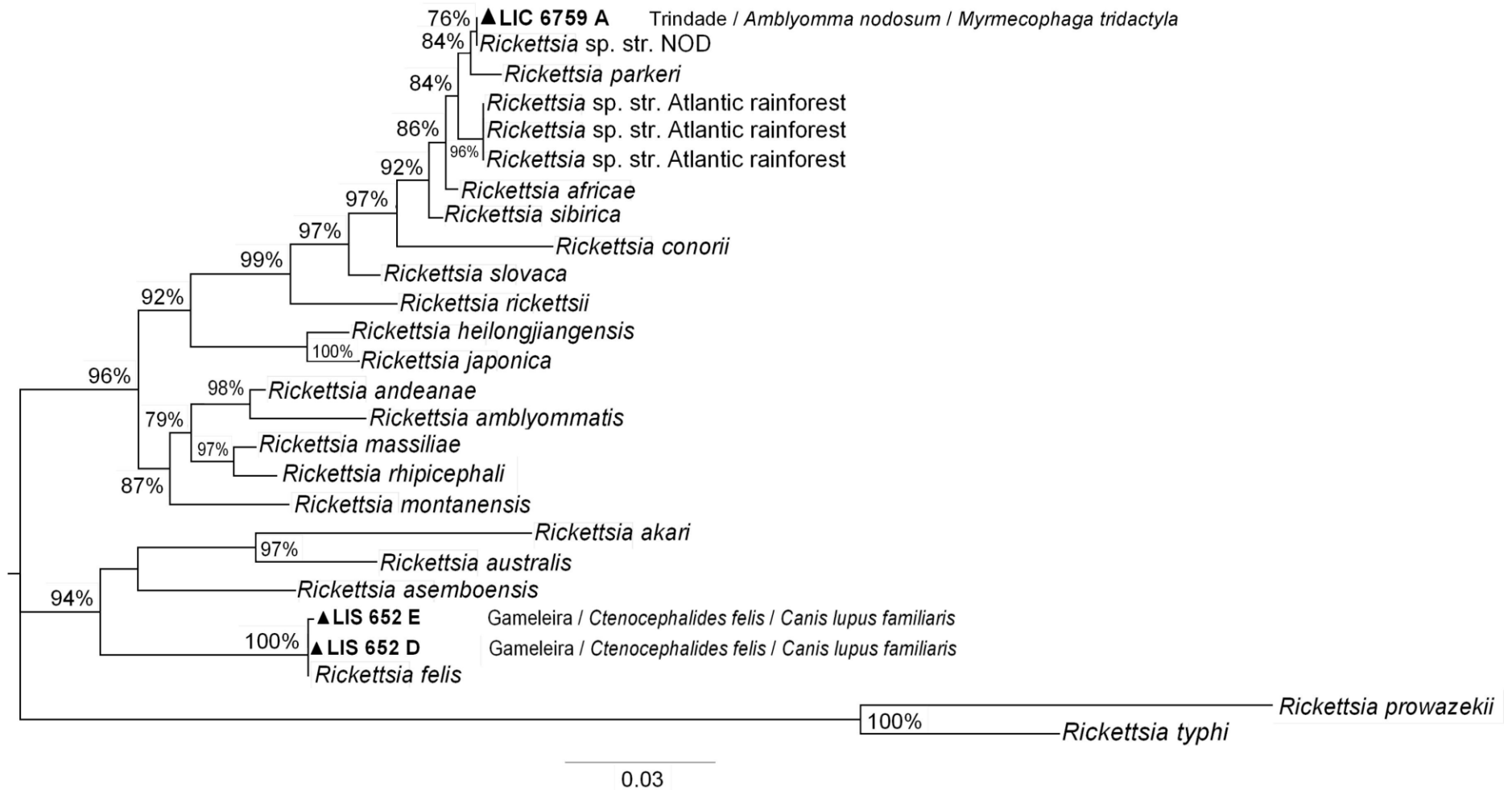
As sequências de *R. bellii* oriundas de amostras dos municípios de Jandaia e Ipameri ficaram agrupadas e apresentaram filogenia próxima de *R. bellii* (Figura 9), com valor de suporte alto (100%) também corroborando os resultados dos filodendogramas do *gltA*, *ompA* e *ompB*.

As sequências de organismos do gênero *Rickettsia* obtidas no presente trabalho encontram-se relacionadas no Anexo E, Anexo F e Anexo G e foram depositadas no *GenBank*, sob os seguintes números de acesso: *gltA*: LIC 6754Z (KY753117), LIC 6759A (KY753118), LIS 652D (KY753119), LIS 652E (KY753120), LIC 8010E1 (KY753121), LIC 8010F1 (KY753122), LIC 8010G1 (KY753123), LIC 8012K1 (KY753124), LIC 8012L1 (KY753125), *ompA*: LIC 6759A (KY753126), LIS 652D (KY753127), *ompB*: LIC 6759A (KY753128), LIS 652D (KY753129), LIS 652E (KY753130).

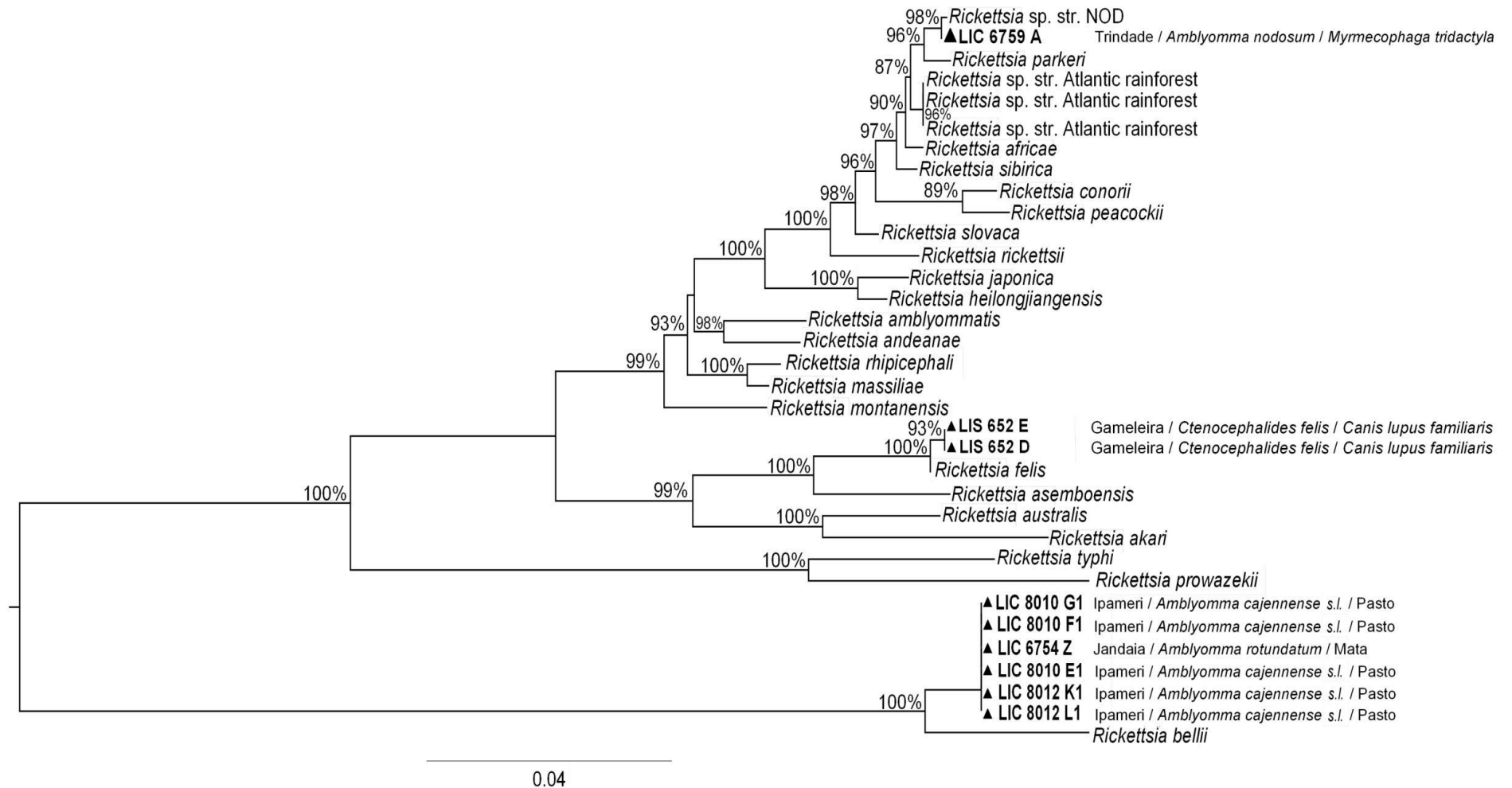


**Figura 7** - Filogenia inferida através da reconstrução por Máxima Verossimilhança de sequências parciais do gene *ompA* de riquetsias. A árvore foi enraizada por *midpoint root*. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.





**Figura 8** - Filogenia inferida através da reconstrução por Máxima Verossimilhança de sequências parciais do gene *ompB* de riquetsias. A árvore foi enraizada por *midpoint root*. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.



**Figura 9** - Filogenia concatenada de sequências parciais dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* de riquétisia, inferida através de análise de Máxima Verossimilhança. A árvore foi enraizada por *midpoint root*. Os números sobre os ramos representam valores de suporte (70% *cut-off*). Os triângulos indicam as sequências obtidas neste estudo.

#### 4.5 Frequência Mínima de Vetores Infectados (FMVI)

A frequência mínima de vetores infectados foi calculada mediante os resultados obtidos da análise molecular dos ectoparasitos obtidos no presente trabalho, em busca da detecção de possíveis riquetsias circulantes nas áreas de coleta. O resultado obtido encontra-se relacionado na Tabela 6.

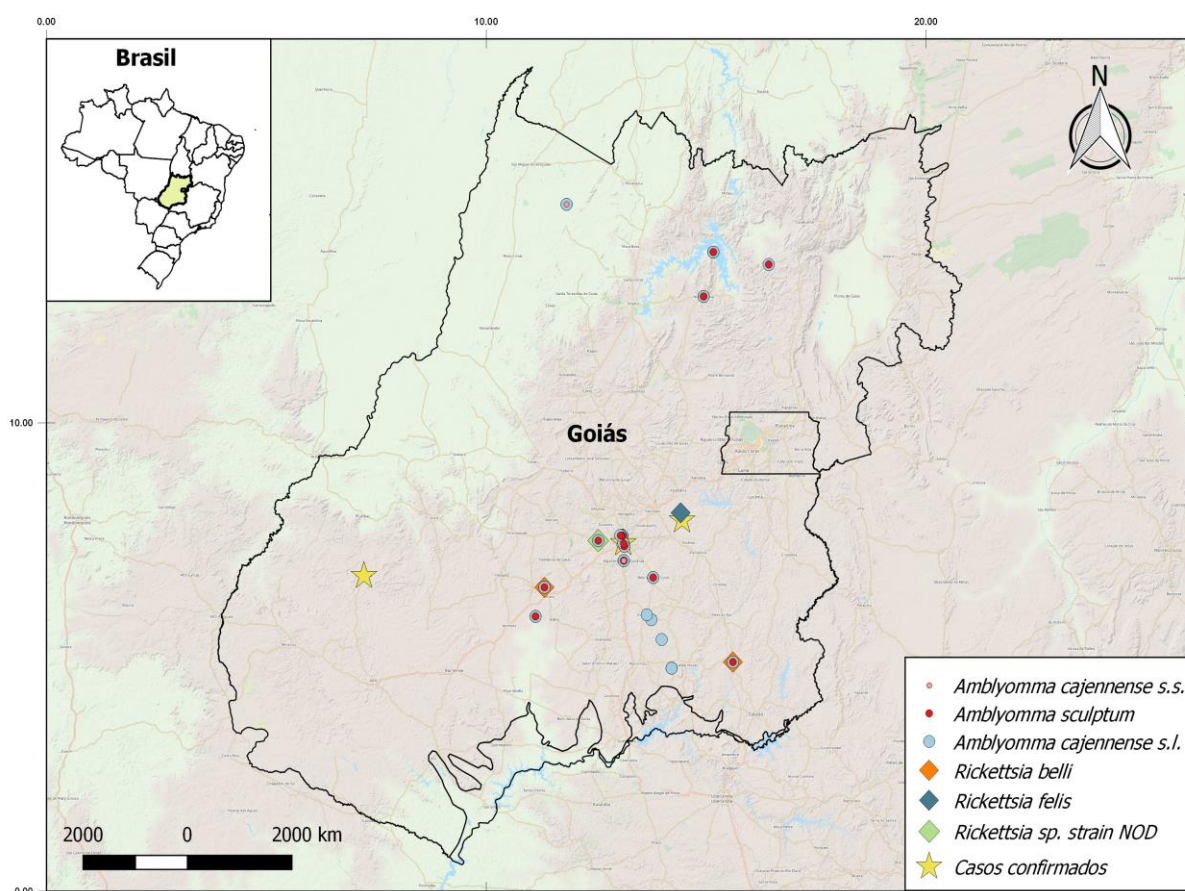
**Tabela 6** - Frequência mínima de vetores infectados por riquetsia (%) de cada espécie de ectoparasito por município do estado de Goiás, Brasil, no período de novembro de 2014 a março de 2016.

Vetor	Municípios													
	Gameleira de Goiás	Niquelândia	Bonópolis	Alto Paraíso de Goiás	Cavalcante	Aparecida de Goiânia	Bela Vista de Goiás	Goiânia	Indiara	Trindade	Jandaia	Piracanjuba	Rio Quente	Ipameri
<i>Amblyomma sculptum</i>	—	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>Amblyomma cajennense s. s.</i>	—	—	0	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Amblyomma cajennense s. l.</i>	—	0	0	0	—	0	0	0	0	0	0	0	0	7
<i>Amblyomma dubitatum</i>	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—
<i>Amblyomma rotundatum</i>	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	3	—	—	—
<i>Amblyomma nodosum</i>	—	—	—	—	—	—	0	—	—	100	—	—	—	—
<i>Amblyomma naponense</i>	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—
<i>Amblyomma parvum</i>	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—
<i>Dermacentor nitens</i>	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
<i>Ctenocephalides felis</i>	33,33	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—
<i>Xenopsylla sp.</i>	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—
<i>Androlaelaps sp.</i>	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—

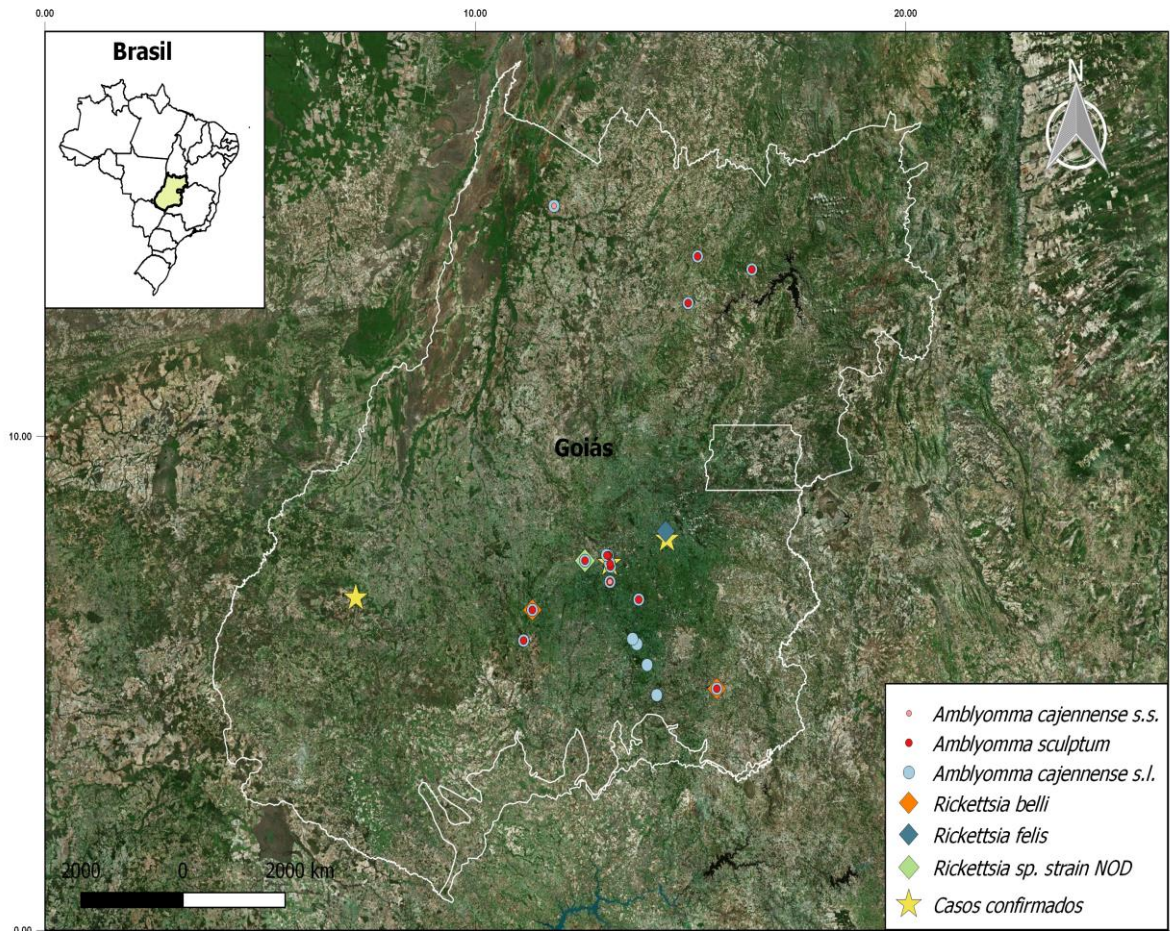
s.l.: *sensu lato*; s.s.: *sensu stricto*; "0" vetores presentes em determinado município, no entanto, que não apresentaram fragmentos de DNA de organismos do gênero *Rickettsia*; "—" Vetores ausentes neste município.

#### 4.6 Mapas demonstrando os padrões de distribuição dos espécimes do complexo *Amblyomma cajennense*, áreas de circulação das riquetsias detectadas no presente trabalho e áreas de casos confirmados de FM (SINAN)

Foram confeccionados dois mapas para demonstrar os padrões de distribuição de *A. cajennense* s.s., *A. sculptum* e *A. cajennense* s.l., apontando os municípios onde foram detectadas as riquetsias no presente estudo e assim relacioná-los com as áreas de casos confirmados de FM no estado de Goiás (Figura 10, Figura 11).



**Figura 10** - Mapa dos principais municípios, biomas e recursos hídricos do estado de Goiás, Brasil. Os pontos marcados no formato de círculo assinalam a presença de *Amblyomma cajennense* s.l., *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma cajennense* s.s. identificados no presente estudo. Pontos marcados em losango referem-se às riquetsias identificadas no presente estudo e pontos marcados em estrela as áreas de casos confirmados de FM.



**Figura 11** - Mapa dos biomas e relevo do estado de Goiás, Brasil. Os pontos marcados no formato de círculo assinalam a presença de *Amblyomma cajennense s.l.*, *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma cajennense s.s.* identificados no presente estudo. Pontos marcados em losango referem-se às riquetsias identificadas no presente estudo e pontos marcados em estrela as áreas de casos confirmados de FM.

## 5 DISCUSSÃO

No presente estudo foi comprovada por morfologia a ocorrência de *A. sculptum* nos municípios de Aparecida de Goiânia, Trindade, Jandaia, Bela Vista de Goiás, Indiara, Goiânia (Centro Oeste), Niquelândia (Norte), Alto Paraíso de Goiás (Nordeste) e Ipameri (Sudeste), tais resultados foram corroborados por meio da análise molecular e atestam os obtidos por Nava et al. (2014) e Martins et al. (2016).

Foram encontrados machos e fêmeas de *A. sculptum* em município endêmico da FM no estado de Goiás, caso de Goiânia, garantindo a perpetuação do ciclo das riquetsias em vetores competentes nessas áreas (Figura 10, 11). A presença de fêmeas e machos de *A. sculptum* em município onde ainda não há casos confirmados de FM aponta para o risco de um possível cenário futuro de ciclos endêmicos de FM em Goiás ressaltando a importância dos trabalhos de vigilância nessas áreas, caso de Aparecida de Goiânia (Figura 10, 11).

A presença de *A. sculptum* em 9 dos 14 municípios incluídos no presente estudo demonstra que esta espécie está bem distribuída nas áreas de Cerrado do estado de Goiás e também evidencia um aumento nos padrões de distribuição conhecidos até o momento para esta espécie em Goiás, uma vez que, *A. sculptum* foi relatado por Martins et al. (2016) em três municípios da região norte do estado, sendo estes: Estrela Norte, Porangatu e Santa Tereza de Goiás e também no município de Cumari, região sudeste.

Foi comprovada por meio da análise morfológica a presença de um espécime fêmea de *A. cajennense* s.s. (Figura 10, 11) no município de Aparecida de Goiânia, Centro Oeste de Goiás. Este achado apresenta uma informação nova em termos de distribuição de *A. cajennense* s.s., até então relatado nos estados de Rondônia, Mato Grosso, Paraná, Maranhão, Tocantins e parte da divisa de Goiás com o estado do Tocantins (Martins et al. 2016). O espécime de *A. cajennense* s.s. foi coletado em *M. tridactyla* juntamente com um espécime fêmea de *A. sculptum*, delimitando uma possível nova área de sobreposição no estado de Goiás e ainda demonstrando que diferentes espécies do complexo *A. cajennense* podem parasitar simultaneamente o mesmo hospedeiro (Figura 10, 11).

A análise morfológica das fêmeas de *A. sculptum*, corroborou os resultados obtidos na análise molecular e atestam o protocolo proposto por Martins et al. (2016) para a identificação de fêmeas de *A. sculptum* e *A. cajennense* s.s. mediante a morfologia da abertura genital.

No caso dos espécimes de ninfas do complexo *A. cajennense*, não foi possível identifica-los com base na mensuração do escudo, considerando a relação (Larg./Compr.), pois os resultados obtidos não corroboram os da análise morfológica dos adultos, especificamente para o município de Bonópolis. Por tratar-se de um estudo envolvendo áreas de sobreposição de duas espécies do complexo *A. cajennense*, optamos por considerar somente os resultados obtidos na análise molecular desses espécimes de ninfas. Para os espécimes de ninfas cuja diagnose foi inespecífica denominamos *A. cajennense s.l.* (Martins et al. 2016). Os resultados obtidos com base nas mensurações das ninfas encontram-se relacionados na tabela do Anexo A. Tais resultados apontam para a necessidade de uma continuidade de estudos que envolvam novas avaliações da morfologia de ninfas de *A. sculptum* e *A. cajennense s.s.*, uma vez considerada a dificuldade da diagnose dessas formas imaturas em um grupo que apresenta elevada taxa de variação intraespecífica e assim estabelecer novos critérios de diagnose a serem incorporados no protocolo já descrito por Martins et al. (2016).

Para a caracterização molecular dos espécimes de *A. cajennense s.l.* utilizamos o gene COII, em decorrência desse marcador apresentar melhor sucesso na amplificação e também na reconstrução filogenética, além de ser utilizado em outros estudos de caracterização molecular de *A. cajennense s.l.* e assim dispor de sequências desse gene no *GenBank* para comparação e realização de análises (Burkman 2009; Beati et al. 2013; Bitencourth et al. 2016).

No presente estudo foram detectadas a presença de organismos do gênero *Rickettsia* nos municípios de Gameleira, Jandaia, Trindade e Ipameri. *R. felis* foi detectada por meio de análise molecular em duas amostras de *C. felis* (LIS 652D e LIS 652E), em área de fazenda. Este resultado aponta para o risco da circulação de riquetsias patogênicas em áreas de intensa movimentação de visitantes no município de Gameleira. Neste caso, *R. felis* pertence ao grupo FM (Labruna et al. 2011). Esta riquetsia é comumente relatada em *C. felis*, este sifonáptero é considerado vetor competente de *R. felis* (Parola et al. 2016). No presente estudo, os exemplares de *C. felis* infectados por *R. felis* foram coletados parasitando um cão, animal de hábito doméstico, o que pode contribuir para a ocorrência de infecções do hospedeiro e do homem (Gazêta et al. 2009; Pinter et al. 2016).

É importante ressaltar que a segunda maior FMVI no presente estudo deve-se a *R. felis* (33,33%) infectando *C. felis* no município de Gameleira (Tabela 6), município onde foi relatado o primeiro caso de FM no estado de Goiás.

A *Rickettsia felis* foi assinalada em diversos países e foi detectada em vetores distribuídos por todos os continentes (Reif; Macaluso 2009). Há relatos da patogenicidade dessa riquetsia em humanos, em países como: EUA (Texas) primeiro caso relatado em 1994, Espanha, Alemanha, França, Egito, México, Brasil, Tailândia, Taiwan, Coreia do Sul e Laos (Schriefer et al. 1994; Zavala-Velazquez et al. 2000; Raoult et al. 2001; Richter et al. 2002; Parola et al. 2003; Perez-Arellano et al. 2005; Choi et al. 2005; Znazen et al. 2006; Phongmany et al. 2006; Parker et al. 2007; Tsai et al. 2008; Reif; Macaluso 2009). Embora existam focos ativos dessa riquetsia em outros continentes, caso da África subsaariana, onde *R. felis* tem sido responsável por cerca de 15% da febre de origem desconhecida e ainda apresentado casos assintomáticos (Parola et al. 2016), no Brasil, no entanto, até o momento há apenas um relato de *R. felis* associada a casos humanos (Raoult et al. 2001). Dessa forma, embora *R. felis* esteja circulante nos estados brasileiros, incluindo o estado de Goiás, como assinalado no presente estudo e ocorra a presença de vetores competentes para disseminação deste bioagente (Moerbeck et al. 2016), não há registros de focos ativos desta riquetsia em território nacional.

No presente estudo foi detectado *R. bellii* mediante análise molecular em seis amostras, cinco provenientes de *A. cajennense* s.l., em área de mata no município de Ipameri e uma proveniente de *Amblyomma rotundatum* (Koch 1844), em área de mata, município de Jandaia. *A. rotundatum* comumente encontrado parasitando animais anfíbios e répteis não está envolvido no ciclo epidêmico da FM. No entanto apresenta uma importante função ecológica na regulação da população de anfíbios (Woehl 2002) e ainda é possível que contribua na manutenção de *R. bellii* em áreas de circulação dessa riquetsia (Horta et al. 2015).

A *R. bellii* embora pertença ao grupo ancestral (GA) das riquetsias, cuja a patogenicidade até o momento é desconhecida, tem sido assinalada com um importante papel na ecoepidemiologia das riquetsioses. Estudos tem levantado à hipótese de que *R. bellii* tem uma importante função na inibição da infecção por demais riquetsias patogênicas em carrapatos do gênero *Amblyomma*, quando já infectados por esta riquetsia (Pacheco et al. 2009). Esta hipótese tornar-se ainda mais coerente quando considerado o fato de que no Brasil, *R. bellii* é comumente



encontrada infectando carrapatos, principalmente do gênero *Amblyomma*, tanto em ambiente, como em hospedeiros vertebrados (Labruna et al. 2004a; Labruna et al. 2007; Pacheco et al. 2009; McIntosh et al. 2015). É possível que este fenômeno ocorra em alguns municípios de GO, principalmente no município de Ipameri, onde foi encontrada a maior FMVI com *R. bellii* (7%), seguido do município de Jandaia com FMVI de (3%).

Atualmente sabe-se que uma vez infectado por uma determinada *Rickettsia*, o carrapato torna-se refratário à infecção por uma segunda espécie de *Rickettsia* (Burgdorfer et al. 1981). Neste contexto, Macaluso et al. (2002) demonstrou experimentalmente que ao infectar um carrapato em laboratório com uma segunda *Rickettsia*, esta última tinha sua transmissão transovariana inibida.

Pacheco et al. 2009, verificaram uma elevada taxa de infecção (23,8%) por *R. bellii* em carrapatos da espécie *A. dubitatum*. Dos dezesseis municípios analisados, em dez foram verificados a presença de *R. bellii* em *A. dubitatum*. Neste mesmo trabalho, observaram a ausência de infecção por organismos de gênero *Rickettsia* em *A. sculptum*, portanto, retomam a discussão da possível participação de *R. bellii* na infecção de potenciais vetores de riquetsias, tornando-os refratários a infecção por outras riquetsias patogênicas. Tais dados, suscitam a relevância de novos estudos com a finalidade de aprofundar o conhecimento do real papel de *R. bellii* na ecoepidemiologia da FM no Brasil.

No presente trabalho *R. bellii* foi detectada somente em carrapatos do gênero *Amblyomma*, este resultado chama a atenção para a frequência da infecção por *R. bellii* em carrapatos deste gênero. Alguns autores tem relacionado estes relatos há um possível episódio de co-evolução simbiótica envolvendo esta riquetsia e os carrapatos do gênero *Amblyomma* (Labruna et al. 2004b; McIntosh et al. 2015).

Embora a patogenicidade de *R. bellii* seja desconhecida, alguns trabalhos já tem relatado determinada sintomatologia em cobaias infectados por *R. bellii* em laboratório (Ogata et al. 2006). Tal dado chama atenção para as áreas onde foram detectadas *R. bellii* no presente trabalho, pois ainda que não haja casos humanos de FM nessas áreas e *R. bellii* ainda apresente patogenicidade desconhecida ou indeterminada, a circulação de riquetsias do grupo GA em áreas não consideradas endêmicas da FM, indica que há viabilidade para que o ciclo desta riquetsia ocorra, logo estão incluídos nestas áreas (vetores, patógeno e hospedeiros). É importante ressaltar que mutações nestes organismos podem ocorrer e possibilitar o

aparecimento de novas estirpes de riquetsias, sendo estas patogênicas ou não (Blanc et al. 2007).

Outra riquetsia identificada no presente trabalho é *Rickettsia* sp. str. NOD em *A. nodosum*, coletado em *M. tridactyla* no município de Trindade. Esta riquetsia tem sido assinalada em outros estados do Brasil, como São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, sendo comumente relacionada com *A. nodosum*, embora haja relatos dessa riquetsia infectando outras espécies de carrapatos como *Amblyomma calcaratum* Neumann 1899 e *Amblyomma longirostre* (Koch 1844) (Ogrzewalska et al. 2009; Ogrzewalska et al. 2013; Witter et al. 2015).

No presente trabalho, apresentamos o primeiro relato de *Rickettsia* sp. str. NOD no estado de Goiás em área de Cerrado. Embora não existam casos humanos associados à *Rickettsia* sp. str. NOD, esta riquetsia apresenta uma filogenia próxima a riquetsias sabidamente patogênicas *R. parkeri*, *R. sibirica* e *R. africae* (Figuras 6, 7, 8 e 9). Novos estudos tem apontado *Rickettsia* sp. str. NOD como uma estirpe semelhante a *R. parkeri* e que considerando tal proximidade entre estirpes, *Rickettsia* sp. str. NOD deve ser considerada como um potencial agente patogênico para humanos (Ogrzewalska et al. 2013). Tais dados sobre *Rickettsia* sp. str. NOD suscitam a importância de trabalhos de vigilância epidemiológica no município de Trindade.

*Amblyomma nodosum*, espécie na qual foi detectada *Rickettsia* sp. str. NOD no presente trabalho, apresenta em sua forma imatura o hábito de parasitar aves, não apresentando especificidade parasitária (Pinheiro et al. 2015), já em sua forma adulta costuma parasitar tamanduás (Jones et al. 1972; Ogrzewalska et al. 2009; Pinheiro et al. 2015). Por parasitar hospedeiros que estão integrados as áreas de mata, é possível que *A. nodosum* esteja envolvido em ciclos enzoóticos de riquetsias, podendo contribuir para a manutenção de riquetsias patogênicas e não patogênicas em uma determinada área. Dessa forma, riquetsias patogênicas e de patogenicidade desconhecida, tem sido relatadas em *A. nodosum*, caso de *R. parkeri* (GFM), *R. bellii* (GA) e *Rickettsia* sp. str. NOD (GFM) (Ogrzewalska et al. 2009; Pinheiro et al. 2015). Tais dados apontam para a possibilidade de *A. nodosum* atuar na disseminação de riquetsias e participar de ciclos enzoóticos em área de mata preservada do IBAMA, município de Trindade.

A maior FMVI (100%) registrada no presente trabalho, deve-se a infecção de *Rickettsia* sp. str. NOD em um único exemplar de *A. nodosum* para o município de

Trindade, esse dado aponta para a probabilidade de demais espécimes de *A. nodosum* estarem infectados por *Rickettsia* sp. str. NOD na área de estudo, ressaltando o perigo da circulação de riquetsias consideradas como um potencial agente patogênico para humanos (Ogrzewalska et al. 2013) em áreas onde ainda não há casos humanos confirmados de FM.

No mapa dos principais municípios, biomas e recursos hídricos do estado de Goiás (Figura 10), é possível observar os pontos que delimitam os locais onde foram detectadas as riquetsias do presente trabalho e que coincidem com áreas próximas a rios. Estas áreas são relevantes, pois atraem uma diversidade de hospedeiros vertebrados em busca de água e demais recursos, portanto, há uma grande probabilidade de tornar-se infestada por carrapatos. O acesso de humanos a essas áreas aumenta a possibilidade de infecção por riquetsias (Nasser et al. 2015). Ressaltando que alguns desses pontos demarcam áreas do campus Samambaia da UFG, próximos ao no estado de Goiás, onde foi relatado recentemente um caso de FM em um professor de agronomia da universidade. Portanto, a aproximação de humanos com essas áreas de mata, rios e pastagens podem representar risco de novas infecções.

No mapa dos biomas e relevo do estado de Goiás (Figura 11) é possível observar que Goiás é constituído por áreas de planalto, sendo formado por planaltos baixos, planaltos médios e por serras e montanhas. Comprovadamente o aumento da temperatura e umidade podem influenciar processos como reprodução e oviposição de algumas espécies de carrapatos no período de vida livre, caso de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) comumente encontrado em bovinos (Santos Júnior et al. 2000). Logo áreas mais baixas, onde as temperaturas tendem a ser mais elevadas, podem estar mais suscetíveis a novos episódios de infestação. No mapa é possível avaliar que municípios endêmicos da FM, Gameleira e Goiânia, estão localizados exatamente em áreas de planalto baixo, ressaltando a hipótese do aspecto morfoclimático como um fator contribuinte para acelerar ou delongar os processos reprodutivos em carrapatos.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem fazer as seguintes conclusões:

- *Amblyomma sculptum*, *A. dubitatum*, *A. cajennense* s.l., *Rhipicephalus sanguineus* e *C. felis* foram as espécies encontradas, potencialmente envolvidas nos ciclos da FM;
- *Rickettsia felis* foi a única espécie sabidamente patogênica detectada em área de foco de FM no estado de Goiás;
- *Amblyomma sculptum* está presente em diferentes municípios e regiões, evidenciando um aumento nos padrões de distribuição para esta espécie no estado de Goiás e assinalando essas áreas como predispostas à formação de focos de FM;
- *Amblyomma cajennense* s.s. está presente em duas diferentes macrorregiões, assinalando o aumento da área de distribuição de esta espécie em área do bioma Cerrado, bem como sua possível sobreposição de nicho ecológico com *A. sculptum* na área de estudo;
- *Rickettsia bellii*, espécie de patogenicidade desconhecida para humanos, foi a riquetsia mais detectada, sendo registrada em diferentes regiões e espécies de carrapatos na área de estudo;
- *Rickettsia* sp. str. NOD foi relatada pela primeira vez no município de Trindade, estado de Goiás, área de Cerrado;
- *Myrmecophaga tridactyla* parece ser hospedeiro importante das espécies do complexo *A. cajennense* na área de estudo.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aljanabi SM, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. Nucl. Acids. Res. 1997; 25(22):4692-4693.

Amorim M, Serra-Freire NM. Chave dicotômica para identificação de larvas de algumas espécies do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). Entomol. Vect. 1999; 6(1):75-90.

Anisimova M, Gascuel O. Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. Syst. Biol. 2006; 55(4):539-52.

Aragão HB, Fonseca F. Notas de Ixodologia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1961; 59(2):115-130.

Araújo RP, Navarro MBMA, Cardoso TAO. Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. Cad. Saúde Colet. 2016; 23(4):354-361.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies: um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan; 2006.

Beati L, Nava S, Burkman EJ, Barros-Battesti DM, Labruna MB, Guglielmone AA, Abraham GC, Guzmán-Cornejo CM, León R, Durden LA, Faccini JLH. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. BMC Evol. Biol. 2013; 13(1):267.

Bicho CL, Ribeiro PB. Chave Pictórica para as principais espécies de Siphonaptera de importância médica e veterinária, no Brasil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 1998; 7(1):47-51.

Bitencourth KG, Voloch CM, Serra-Freire NM, Machado-Ferreira E, Amorim M, Gazêta GS. Analysis of *Amblyomma sculptum* haplotypes in an area endemic for Brazilian spotted fever. Med. Vet. Entomol. 2016; 30(3):342-50.

Blanc G, Ogata H, Robert C, Audic S, Suhre K, Vestris G, Claverie JM, Raoult D. Reductive Genome Evolution from the Mother of *Rickettsia*. PLoS Genet. 2007; 3(1): 103-114.

Burgdorfer W, Hayes SF, Mavros AJ. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer W, Anacker RL. Rickettsiae and rickettsial diseases. New York: Academic Press, Inc; 1981. 585-594,

Burket CT, Vann CN, Pinger RR, Chatot CL, Steiner FE. Minimum Infection Rate of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by *Ehrlichia chaffeensis* (Rickettsiales: Ehrlichieae) in Southern Indiana. J. Med. Entomol. 1998; 35(5): 653-665.

Burkman EJ. Genetic structure of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) populations based on mitochondrial gene sequences. Statesboro. Dissertação [Mestrado em Biologia]- Georgia Southern University; 2009.

Choi YJ, Jang WJ, Ryu JS, Lee SH, Park KH, Paik HS, Koh YS, Choi MS, Kim IS. Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(2):237-244.

Del Fiol FS, Junqueira FM, Rocha MCP, Toledo MI, Barberato-Filho S. A febre maculosa no Brasil. *Rev. Panam. Salud. Publica.* 2010; 27(6):461-466.

Dias E, Martins AV. Spotted Fever in Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1938; 19(2):103-108.

Durden LA, Keirans JE. Nymphs of the Genus *Ixodes* (Acari: Ixodidae) of the United states of America: Taxonomy, identification, key, distribution, hosts and medical veterinary importance. Minnesota: Entomological Society of America; 1996.

Evans GO, Till WM. Studies in the british Dermanyssidae (Acari: Mesostigmata) part II classification. *Bull.br.Mus.nat.Hist.Zool.* 1966; 14(5):107-370.

Faccini-Martínez AA, Costa FB, Hayama-Ueno TE, Ramírez-Hernández A, Cortés-Vecino JA, Labruna MB, Hidalgo M. *Rickettsia rickettsii* in *Amblyomma patinoi* Ticks, Colombia. *Emerg. Infect. Dis.* 2015; 21(3):537- 539.

Fonseca, F. Notas de acarologia. XLIV. Inquérito sobre a fauna acarológica de parasitas no Nordeste do Brasil. *Mem. Inst. Butantan.* 1957/58; 28:99-186.

Fournier PE, Raoult D. Current Knowledge on Phylogeny and Taxonomy of *Rickettsia* spp. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2009; 1166(1):1-11.

Furman DP. Laelapid mites (Laelapidae: Laelapinae) of Venezuela. *Brigham Young Univ. sci. bull.* 1972; 17(3):1-58.

Gazêta GS, Souza ER, Abboud-Dutra AE, Amorim M, Barbosa PR, Almeida AB, Gomes V, Gehrke FS, Marrelli MT, Schumaker TTS. Potential vectors and hosts of rickettsia spp: epidemiological studies in the Vale do Paraíba, state of Rio de Janeiro/Brazil. 2009; 15(2):269-270.

Gehrke FS, Gazeta GS, Souza ER, Ribeiro A, Marrelli MT, Schumaker TTS. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro / Brazil. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009; 15(2):267-268.

Gillespie JJ, Williams K, Shukla M, Snyder EE, Nordberg EK, Ceraul SM, Dharmanolla C, Rainey D, Soneja J, Shallom JM, Vishnubhat ND, Wattam R, Purkayastha A, Czar M, Crasta O, Setubal JC, Azad AF, Sobral BS. *Rickettsia* Phylogenomics: Unwinding the Intricacies of Obligate Intracellular Life. *PLoS One.* 2008; 3(4):1-34.

Guedes E, Leite RC, Prata MCA, Pacheco RC, Walker DH, Labruna MB. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2005; 100(8):841-845.

Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 2010; 59(3):307-321.

Horta MC, Ogrzewalska M, Azevedo MC, Costa FB, Ferreira F, Labruna MB. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis felis* from Five Geographic Regions of Brazil. Am. J. Trop. Med. 2014; 91(1):96-100. doi: 10.4269/ajtmh.13-0699

Horta MC, Saraiva DG, Oliveira GM, Martins TF, Labruna MB. *Rickettsia bellii* in *Amblyomma rotundatum* ticks parasitizing *Rhinella jimi* from northeastern Brazil. Microbes Infect. 2015; 17(11-12):856-8.

Jones EK, Clifford CM, Keirans JE, Kohls GM. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the western hemisphere. Brigham Young Univ. Sci. Bull. Biol. Ser. 1972; 17(4):1-40.

Karpathy SE, Slater KS, Goldsmith CS, Nicholson WL, Paddock CD. *Rickettsia amblyommatis* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia* associated with multiple species of *Amblyomma* ticks in north, central and south america. int j syst evol microbiol, 2016; 66(12): 5236-5243.

Krantz GW, Walter DE. A manual of acarology. 3. ed. Texastech University Press, Lubbock, 2009; 807.

Krawczak FS, Binder LC, Oliveira CS, Costa FB, Moraes-Filho J, Martins TF, Sponchiado J, Melo GL, Gregori F, Polo G, Oliveira SV, Marcelo B.L. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. Exp. Appl. Acarol. 2016; 70(2):219-29.

Labruna MB, Whitworth T, Horta MC. et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. J. Clin. Microb. 2004; 42(1):90-98a.

Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LMA, Camargo EP, Popov V, Wilker DH. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. J. Med. Entomol. 2004; 41(6):1073-1081b.

Labruna MB, Camargo LM, Terrassini FA, Ferreira F, Schumaker TS, Camargo EP. Ticks (Acari:Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. Syst. Appl. Acarol. 2005; 10(1):17-32.

Labruna MB, SanWlippo LF, Demetrio C, Menezes AC, Pinter A, Guglielmone AA, Silveira LF. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. Exp. Appl. Acarol. 2007; 43(2):147-160.

Labruna MB, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G, Abarca K, Romero L, Souza R, Oteo J, Zavala-Castro J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. Rev. MVZ Córdoba 2011; 16(2):2435-2457. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x

Linardi PM, Guimarães LR. Sifonápteros do Brasil. São Paulo: Museu de Zoologia da USP; 2000.

Lopes LB, Guterres A, Rozental T, Oliveira RC, Mares-Guia MA, Fernandes J, Figueredo JF, Anschau I, Jesus S, Almeida ABMV, Silva VC, Via AVGM, Bonvicino CR, D'Andrea PS, Barreira JD, Lemos ERS. *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, and Laguna Negra hantavirus in an Indian reserve in the Brazilian Amazon. Parasit. Vectors. 2014; 7(1):191.

Macaluso KR, Sonenshine DE, Ceraul SM, Azad AF. Rickettsial Infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Inhibits Transovarial Transmission of a Second *Rickettsia*. J. Med. Entomol. 2002; 39(6):809-813.

Martins MEP. Aspectos epidemiológicos da febre maculosa no município de Quirinópolis, Goiás, Brasil. Tese [Escola de Veterinária] - Universidade Federal de Goiás; 2009.

Martins MEP, Sousa-Martins KC. Riquetsioses (*Rickettsia* spp.) transmitidas por carrapatos. Encicl. Biosf. 2014; 10(18):2735-2756.

Martins MEP. Febre Maculosa: Revisão-atualização, situação brasileira e goiana spotted fever: Review-update, Brazilian and Goiana situation. Multi-Science Journal. 2016; 1(5):15-23.

Martins TF, Onofrio VC, Barros-Battesti DM, Labruna MB. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. Ticks Tick Borne Dis. 2010; 1(2):75-99.

Martins TF, Barbieri ARM, Costa FB, Terassini FA, Camargo LMA, Peterka CRL, Pacheco RC, Dias RA, Nunes PH, Marcili A, Scofield A, Campos AK, Horta MC, Guilloux AGA, Benatti HR, Ramirez DG, Barros-Battesti DM, Labruna MB. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). Parasit. Vectors. 2016; 9(186):1-14.

Matias J, Garcia MV, Cunha RC, Aguirre AAR, Barros JC, Csordas BG, Andreotti R. Spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2015; 6(2):107-110.

McIntosh D, Bezerra RA, Luz HR, Faccini JLH, Gaiotto FA, Giné GAF, Albuquerque GR. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. Braz. J. Microbiol. 2015; 46(3):879-883.



Melo AI, Witter R, Martins TF, Pacheco TA, Alves As, Chitarra CS, et al. A survey of tick-borne pathogens in dogs and their ticks in the Pantanal biome, Brazil. *Med. Vet. Entomol.* 2016; 30(1):112-116.

Moerbeck LM, Vizzoni VF, Machado-Ferreira E, Cavalcante RC, Oliveira SV, Soares CAG, Amorim M, Gazêta GS. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. *J. Med. Entomol.* 2016; 53(6):1458-1466.

Moura-Martinião NO. *Rickettsia* and Vector Biodiversity of Spotted Fever Focus, Atlantic Rain Forest Biome, Brazil. *Emerg. Infect. Diseases* 2014; 20(3):498-500.

Nasser JT, Lana RC, Silva CMS, Lourenço RW, Silva DCC, Donalísio MR. Urbanização da febre maculosa brasileira em município da região Sudeste: epidemiologia e distribuição espacial. *Rev. Bras. Epidemiol.* 2015; 18(2):299-312.

National Center for Biotechnology Information. BLAST Assembled Ref Seq Genomes. Nucleotide Blast. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, acessado em: 23 de janeiro de 2016.

Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. And *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5(3):252-276.

Nunes ECN, Vizzoni VF, Navarro DL, Lani FCM, Durães LS, Daemon E, Soares CAG, Gazêta, GS. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma sculptum* in endemic spotted fever area from southeastern Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2015; 110(8):1058-1061.

Ogata H, Scola BL, Audic S, Renesto P, Blanc G, Robert C, Fournier PE, Claverie JM, Raoult D. Genome Sequence of *Rickettsia bellii* Illuminates the Role of Amoebae in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. *PLoS Genet.* 2006; 2(5):733-744.

Ogrzewalska M, Pacheco RC, Uezu A, Richtzenhain LJ, Ferreira F, Labruna MB. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 2009; 103(5):413-425.

Ogrzewalska Maria, Martins T, Capek M, Literak I, Labruna MB. A *Rickettsia parkeri*-like agent infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks and Tick-borne Dis.* 2013; 4(1-2):145-147.

Oliveira SV, Guimarães JN, Reckziegel GC, Neves BMC, Araújo-Vilges KM, Fonseca LX, Pinna FV, Pereira SVC, Caldas EP, Gazêta GS, Gurgel-Gonçalves R. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2016; 22(22):1-8.a

Oliveira SV, Caldas EP, Colombo S, Gazêta GS, Labruna MB, Santos FCP, Angerami RN. A fatal case of Brazilian spotted fever in a non-endemic area in Brazil: the importance of having health professionals who understand the disease and its areas of transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2016; 49(5):653-655.

Pacheco RC, Horta MC, Pinter A, Moraes-Filho J, Martins TF, Nardi MS, Souza SSAL, Souza CE, Szabó MPJ, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2009; 42(3):351-353.

Parker TM, Murray CK, Richards AL, Samir A, Ismail T, Fadeel MA, Jiang J, Wasfy WO, Pimentel G. Concurrent infections in acute febrile illness patients in Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 77(2): 390-392.

Parola P, Miller RS, McDaniel P, Telford III SR, Rolain JM, Wongsrichanalai C, Raoult D. Emerging rickettsioses of the Thai-Myanmar border. *Emerg. Infect. Dis.* 2003; 9(5): 592-595.

Parola P, Davoust B, Raoult D. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.* 2005; 36(3):469-492.

Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, Abdad MY, Stenos J, Bitam I, Fournier PE, Raoult D. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013; 26(4):657-702.

Parola P, Musso D, Raoult D. *Rickettsia felis*: the next mosquito-borne outbreak? *Lancet Infect Dis.* 2016; 16(10): 1112-1113.

Perez-Arellano JL, Fenollar F, Angel-Moreno A, Bolaños M, Hernandez M, Santana E, Hemmersbach-Miller M, Martin AM, Raoult D. Human *Rickettsia felis* infection, Canary Islands, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2005; 11(12):1961-1964.

Phongmany S, Rolain JM, Phetsouvanh R, Blacksell SD, Soukkhaseum V, Rasachack B, Phiasakha K, Souk-khaseum S, Frichithavong K, Chu,etal V. Rickettsial infections and fever, Vientiane, Laos. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(2): 256-262.

Pinheiro MC, Lourenço EC; de Sá-Hungaro IJB; Famadas KM. *Amblyomma nodosum* (Neumann, 1899): observations on life cycle under laboratory conditions. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 2015; 24(3):357-360.

Pinter AS, Costal CS; Moreira M; Camarall M; Leitel RM. A Febre Maculosa Brasileira na Região Metropolitana de São Paulo. *BEPA* 2016; 13(151):1-45.

Raoult D, Roux V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 1997; 10(4):694-719.

Raoult D, Scola BL, Enea Ma, Fournier PE, Roux V, Fenollar F, Galvao MAM, Lamballerie X. A flea-associated *Rickettsia* pathogenic for humans. *Emerg. Infect. Dis.* 2001; 7(1):73-81.

- Regnery RI, Spruil CI, Plikaytis BD. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portion of two rickettsial genes. *J. Bacteriol.* 1991; 173(5):1576-1589.
- Reif KE, Macaluso KR. Ecology of *Rickettsia felis*: A Review. *J. Med. Entomol.* 2009; 46(4):723-736.
- Reis VM. Pesquisa de *Rickettsia* sp. e *Ehrlichia* spp. Em canídeos e felídeos selvagens de vida livre e cães domésticos da região do Parque Nacional das Emas, Goiás. Dissertação [Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal] - Universidade de São Paulo; 2012.
- Richter J, Fournier PE, Petridou J, Haussinger D, Raoult D. *Rickettsia felis* infection acquired in Europe and documented by polymerase chain reaction. *Emerg. Infect. Dis.* 2002; 8(2): 207-208.
- Rivera-Páez FA, Labruna MB, Martins TF, Sampieri BR, Camargo-Mathias MI. *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): First record confirmation in Colombia using morphological and molecular analyses. *Ticks Tick Borne Dis.* 2016; 7(5):842-8.
- Roux V, Rydkina E, Ereemeeva M, Raoult D. Citrate Synthase Gene Comparison, a New Tool for Phylogenetic Analysis, and Its Application for the Rickettsiae. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 1997; 47(2):252-261.
- Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*OmpB*). *Internat. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2000; 50(4):1449-1455.
- Rudakov NV, Shpynov SN, Samoilenko IE, Tankibaev MA. Ecology and epidemiology of spotted fever group *Rickettsia* and new data from their study in Russia and Kazakhstan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 990(1):12-24.
- Sabatini GS, Pinter A, Nieri-Bastos FA, Marcili A, Labruna MB. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their *Rickettsia* in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of São Paulo, Brazil. *J. Med. Entomol.* 2010; 47(5):913-916.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; 2001.
- Santos Júnior JCB, Furlong J, Daemon E. Controle do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica fluminense do Grande Rio - Rio de Janeiro. *Cienc. Rural.* 2000; 30(2):305-311.
- Schriefer ME, Sacci JBJr, Dumler JS, Bullen MG, Azad AF. Identification of a novel rickettsial infection in a patient diagnosed with murine typhus. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32(4):949-954.

Sekeyova Z, Roux V, Raoult D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. inferred by comparing sequences of 'gene D', which encodes an intracytoplasmic protein. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001; 51(4):1353-1360.

Silva N, Eremeeva ME, Rozental T, Ribeiro GS, Paddock CD, Ramos EAG, Favacho ARM, Reis MG, Dasch GA, Lemos ERS, KO AI. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 2011; 17(2):275-278.

Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN. Febre Maculosa - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SINAN Net. 2015 [acesso em 20mar 2017]. Disponível em: [http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/Fmaculosa/bases/febre\\_maculosabrnet.def](http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/Fmaculosa/bases/febre_maculosabrnet.def), acessado em 20 de março de 2017.

Stothard DR, Clark JB, Fuerst PA. Ancestral divergence of *Rickettsia bellii* from the spotted fever and typhus groups of *Rickettsia* and antiquity of the genus *Rickettsia*. *Int. J. Syst. Bacteriol* 1994; 44(4):798-804.

Szabó MPJ, Cunha TM, Pinter A, Andvicentini, F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Exp. Appl. Acarol.* 2001; 25:909-916.

Szabó MPJ, Labruna MB, Castagnolli KC, Garcia MV, Pinter A, Veronez VA, Magalhães GM, Castro MB, Vogliotti A. Ticks (Acari:Ixodidae) par-asiating humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. *Exp. Appl. Acarol.* 2006; 39:339-346. doi: 10.1007/s10493-006-9013-6

Szabó MPJ, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2013; 3(27):1-9.

Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 2013; 30(12):2725-2729.

Tripton, JV. The Genus *Laelaps*. With a Review of the Laelapinae and a New Subfamily Alphalaelaptinae (Acarina: Laelaptidae). *Univ. Calif. publ. entomol.* 1960; 16:233-327.

Tsai KH, Lu HY, Tsai JJ, Yu SK, Huang JH, Shu PY. Human case of *Rickettsia felis* infection, Tai- wan. *Emerg. Infect. Dis.* 2008; 14(12):1970-1972.

Vizzoni VF, Silva AB, Cardoso KM, dos Santos FB, Stenzel B, Amorim M, Oliveira SV, Gazêta GS. Genetic identification of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in an endemic area of a mild spotted fever in Southern Brazil. *Acta trop.* 2016; 162:142-145.

Weck B, Dall'Agnol B, Souza U, Webster A, Stenzel B, Klafke G, Martins JR, Reck J. Spotted Fever Group *Rickettsia* in the Pampa Biome, Brazil, 2015–2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2016; 22(11):2014-2016.

Witter R, Martins TF, Campos AK, Melo ALT, Corrêa SHR, Morgado TO, Wolf RW, May-Júniord JA, Sinkoc AL, Strüssmanne C, Aguiar DM, Rossif RV, Semedog TBF,

Camposh Z, Desbiezi ALJ, Labruna MB, Pacheco RC. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. *Ticks and Tick-borne Dis.* 2015; 7(3):415-23.

Woehl GJ. Infestação de *Amblyomma rotundatum* (Koch) (Acari, Ixodidae) em sapos *Bufo ictericus* (Spix) (Amphibia, Bufonidae): novo registro de hospedeiro. *Revta bras. Zool.* 2002; 19 (2):329-333.

Zavala-Velazquez JE, Ruiz-Sosa JA, Sanchez-Elias RA, Becerra-Carmona G, Walker DH. *Rickettsia felis* rickettsiosis in Yucatan. *The Lancet.* 2000; 356(9235):1079-1080.

Znazen, A, Rolain JM, Hammami A, Jemaa MB, Raoult D. *Rickettsia felis* infection, Tunisia. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12(1):138-140.

## 8 ANEXOS

### ANEXO A

Mensuração de ninfas do complexo de *Amblyomma cajennense* coletadas no período novembro de 2014 a março de 2016, área de Cerrado, em três diferentes macrorregiões do estado de Goiás (Norte, Centro Oeste e Sudeste), Brasil.

Macrorregião	Bonópolis	Mensurações (Larg)	Mensurações (Compr)	Relação (Larg) / (Compr)
Norte	Espécime 1	0,86 µm	0,57 µm	1,5 µm
	Espécime 2	0,94 µm	0,60 µm	1,5 µm
	Espécime 3	0,90 µm	0,50 µm	1,8 µm
	Espécime 4	0,87 µm	0,52 µm	1,6 µm
	Espécime 5	0,91 µm	0,58 µm	1,5 µm
	Espécime 6	0,88 µm	0,59 µm	1,4 µm
	Espécime 7	0,88 µm	0,54 µm	1,6 µm
	Espécime 8	0,88 µm	0,56 µm	1,5 µm
	Espécime 9	0,82 µm	0,58 µm	1,4 µm
	Espécime 10	0,89 µm	0,55 µm	1,6 µm
	Espécime 11	0,84 µm	0,55 µm	1,5 µm
	Espécime 12	0,89 µm	0,54 µm	1,6 µm
	Espécime 13	0,95 µm	0,63 µm	1,5 µm
Macrorregião	Ipameri	Mensurações (Larg)	Mensurações (Compr)	Relação (Larg) / (Compr)
Sudeste	Espécime 14	0,95 µm	0,57 µm	1,6 µm
	Espécime 15	0,85 µm	0,53 µm	1,6 µm
	Espécime 16	0,87 µm	0,54 µm	1,6 µm
	Espécime 17	0,72 µm	0,49 µm	1,4 µm
	Espécime 18	0,73 µm	0,46 µm	1,5 µm
	Espécime 19	0,80 µm	0,56 µm	1,4 µm
	Espécime 20	0,88 µm	0,50 µm	1,7 µm
	Espécime 21	0,88 µm	0,50 µm	1,7 µm
	Espécime 22	0,90 µm	0,58 µm	1,5 µm
	Espécime 23	0,92 µm	0,56 µm	1,6 µm
	Espécime 24	0,90 µm	0,48 µm	1,8 µm
Macrorregião	Goiânia	Mensurações (Larg)	Mensurações (Compr)	Relação (Larg) / (Compr)
Centro Oeste	Espécime 25	0,91 µm	0,65 µm	1,4 µm
	Espécime 26	0,85 µm	0,60 µm	1,4 µm
	Espécime 27	0,81 µm	0,50 µm	1,6 µm

Compr = Comprimento; Larg = Largura; µm = micrômetro

## ANEXO B

Sequências de *Amblyomma sculptum* obtidas no presente trabalho de fragmentos do gene COII e depositadas no *GenBank*, provenientes de alíquotas contendo espécime único, utilizados para a caracterização molecular de espécimes do complexo *Amblyomma cajennense* coletados no período de novembro de 2014 a março de 2016, em área de Cerrado, estado de Goiás, Brasil.

LIC 6749A / 1♂ / Município - Aparecida de Goiânia / Hospedeiro - *Myrmecophaga tridactyla*

TTAATGTGGTGGTTTAGTCCCCCCCACATAGCATCCATTTTTATTCTAGAA  
AATGAAAATAGGTTTCATGAGTGAATCACATCAGCTGATGTAATTAGAAATTT  
AATTATAGTATTAATGGAATTATTAATTGTTATCGGTTTCTAAAAGACGGA  
ATGAATTGATATCTAGATCTGTTTCTGGAATTAATAATGAGTCAAATTCCTT  
GTTGAAATCGGAGTATTCATATGACCAATATCATTGATGGCCGATAATTTTG  
ATTGATGTTTGGGCATTAAAAATATTTTCATCTGTAAATAAAGAAGATGAAG  
GGAAGGTAAAGCAATAAAAATTAATGTAATTGCGGGAATGACTGTTCAAAT  
AATCTCAATTTCTTGTCCTTCTATTATTGACCGTCTAGTAAAAGAGTTTATTA  
TAATATTAACAATTATATATATTGTAATAATAGTAATAGAAATAATGATTATTA  
TTGAGTGGTCATGAAAAAAGCTATTTGCTCCATAATGGGAGAATTTAA

LIC 6749B / 1♂ / Município - Aparecida de Goiânia / Hospedeiro - *Myrmecophaga tridactyla*

TAAATTCTCCCATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAAT  
AATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAAT  
AAACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATT  
TGAACAGTCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCA  
TCTTCTTTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATTAATAATTA  
TCGGCCATCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAAGAATT  
TGACTCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTT  
TAGAAACCGATAACAATTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCTA  
ATTACATCAGCTGATGTGATTCACTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATAA  
AAATGGATGCTATTCCAGGCCGACTAAACCAAACATTA

**Continuação Anexo B**

**LIC 6749C / 1♂ / Município - Aparecida de Goiânia / Hospedeiro -**

***Myrmecophaga tridactyla***

CCATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAATAATCATTAT  
TTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAATAAACTCTTT  
TACTAGACGGTCAATAACAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATTTGAACAGT  
CATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCATCTTCTTT  
ATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAATTATCGGCCA  
TCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAAGAATTTGACTCA  
TTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTTTAGAAAC  
CGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCTAATTACATC  
AGCTGATGTGATTCACTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATAAAAATGGA  
TGCTATTCCAGGCCGACTAA

**LIC 6749E / 1♀ / Município - Aparecida de Goiânia / Hospedeiro -**

***Myrmecophaga tridactyla***

TAAATTCACCCATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAAT  
AATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAAT  
AAACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATT  
TGAACAGTCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCA  
TCTTCTTTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAATTA  
TCGGCCATCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAAGAATT  
TGACTCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTT  
TAGAAACCGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCTA  
ATTACATCAGCTGATGTGATTCACTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATAA  
AAATGGATGCTATTCCAGGCCGACTAAACCAAACATTA



**Continuação Anexo B**

**LIC 6749F / 1♀ / Município - Aparecida de Goiânia / Hospedeiro -**  
***Myrmecophaga tridactyla***

CCATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAATAATCATTAT  
TTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAATAAACTCTTT  
TACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATTTGAACAGT  
CATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCATCTTCTTT  
ATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAATTATCGGCCA  
TCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAAGAATTTGACTCA  
TTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTTTAGAAAC  
CGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCTAATTACATC  
AGCTGATGTGATTCACTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATAAAAATGGA  
TGCTATTCCAGGCCGACTAAACCAAACATTA

**LIC 6749H / 1♀ / Município - Aparecida de Goiânia / Hospedeiro -**  
***Myrmecophaga tridactyla***

TAATGTTTGATTTAGTCGGCCTGGGATAGCATCCATTTTTATTCCCTAGTGAT  
GGAATGGTTCATGAGTGAATCACATCAGCTGATGTAATTAGAAATTTAATTA  
TAGTATTAATGGAATTATTAATTTGTTATCGGTTTCTAAAAGACGGAATGA  
ATTGATATCTAGATCTGTTTCTGGAATTAATAAATGAGTCAAATTCTTTGTTGA  
AATCGGAGTATTCATATGACCAATATCATTGATGGCCGATAATTTTGATTGA  
TGTTTGGGCATTAAAATTTTCATCTGTAAATAAAGAAGATGAAGGGAAGGT  
AAAGCAATAAAAATTAATGTAATTGCGGGAATGACTGTTCAAATAATCTCAA  
TTTCTTGTCCTTCTATTATTGACCGTCTAGTAAAAGAGTTTATTATAATATTA  
ACAATTATATATATTGTAATAATAGTAATAGAAATAATGATTATTATTGAGTG  
GTCATGAAAAAAGCTATTTGCTCCATAATGGGAGAATTTAATAA

## Continuação Anexo B

LIC 6751A / 1♂ / Município - Goiânia / Hospedeiro - *Hydrochoerus hydrochaeris*

CCTATGCAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAATAATCATTATTTCC  
TATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAATAAACTCTTTTAC  
TAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATTTGAACAGTCATT  
CCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCATCTTCTTTATTT  
AACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAAAATTATCGGCCATCAA  
TGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAAGAATTTGACTCATTTTT  
AATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTTTAGAAACCGAT  
AACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCTAATTACATCAGCT  
GATGTGATTCACTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATAAAAATGGATGCT  
ATCCCAGGCCGACTA

LIC 7285A / 1♂ / Município - Goiânia / Procedência - Mata

TTAATGTTTGGTTAGTCGGCCTGGAATAGCATCCATTTTTATTCCCTAGTGAT  
GGAATGGTTCATGAGTGAATCACATCAGCTGATGTAATTAGAAATTTAATTA  
TAGTATTAATGGAATTATTAATTTGTTATCGGTTTCTAAAAGACGGAATGA  
ATTGATATCTAGATCTGTTTCTGGAATTAATAATGAGTCAAATTTCTTTGTTGA  
AATCGGAGTATTCATATGACCAATATCATTGATGGCCGATAATTTTGATTGA  
TGTTTGGGCATTAATAATTTTCATCTGTAAATAAAGAAGATGAAGGGAAGGT  
AAAGCAATAAAAATTAATGTAATTGCGGGAATGACTGTTCAAATAATCTCAA  
TTTCTTGTCCTTCTATTATTGACCGTCTAGTAAAAGAGTTTATTATAATATTA  
ACAATTATATATATTGTAATAATAGTAATAGAAATAATGATTATTATTGAGTG  
GTCATGAAAAAAGCTATTTGCTGCATGATGGGGAGAATTTAACAA

## Continuação Anexo B

### **LIC 7287A / 1♂ / Município - Goiânia / Procedência - Ambiente**

TCGTAAATTCTCCCTATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCA  
ATAATAATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATT  
ATAATAAACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGA  
TTATTTGAACAGTCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCC  
CTTCATCTTCTTTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAA  
AATTATCGGCCATCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAA  
GAATTTGACTCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCC  
GTCTTTTAGAAACCGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTTAAA  
TTTCTAATTACATCAGCTGATGTGATTCACTCATGAACCATTCCATCACTAG  
GAATAAAAATGGATGCTATTCCAGGCCGACTAACCCCAAACATTAATAAA

### **LIC 7311A / 1N / Município - Goiânia / Hospedeiro - *Canis lupus familiaris***

TAAATTCACCAATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAAT  
AATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAAT  
AACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATT  
TGAACAGTCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCA  
TCTTCTTTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAATTA  
TCGGCCATCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAAGAATT  
TGACTCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTT  
TAGAAACCGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTTAAATTTCTA  
ATTACATCAGCTGATGTGATTCACTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATAA  
AAATGGATGCTATTCCAGGCCGACTAAACCAAACATTAATAA

## Continuação Anexo B

**LIC 6754Q / 1♂ / Município - Jandaia / Procedência - Mata**

TAAATTCTACCCATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAA  
TAATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTAAATATTATAA  
TAAACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTAT  
TTGAACAATCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTC  
ATCTTCTTTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAAT  
ATCGGCCATCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAATAAAGAAT  
TTGACTCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTT  
TTAGAAACCGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCT  
AATCACATCAGCTGATGTTATTCCTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATA  
AAAATGGATGCTATTCCAGGCCGACTAAACCAAACATTA

**LIC 6759B / 1♂ / Município - Trindade / Hospedeiro - *Myrmecophaga tridactyla***

TAAATTCTCCCATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAAT  
AATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTAAATATTATAAT  
AAACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATT  
TGAACAGTCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCA  
TCTTCTTTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATTAATAA  
TCGGCCATCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAAGAATT  
TGACTCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTT  
TAGAAACCGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCTA  
ATTACATCAGCTGATGTGATTCACTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATAA  
AAATGGATGCTATTCCAGGCCGACTAAACCAAACATTA

## Continuação Anexo B

### LIC 6758 / 1♂ / Município - Niquelândia / Procedência - Mata

AATTCTACCCATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAATA  
ATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAATA  
AACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATTT  
GAACAATCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCAT  
CTTCTCTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAATTAT  
CGGCCATCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAATAAAGAATTT  
GACTCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTTT  
AGAAACCGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCTAA  
TCACATCAGCTGATGTTATTCCTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATAAA  
AATGGATGCTATTCCAGGCCGACTAAACCAAACATTA

### LIC 6747 / 1♂ / Município - Alto Paraíso de Goiás / Procedência - Mata

TAAATTCACCCATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAAT  
AATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAAT  
AACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATT  
TGAACAGTCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCA  
TCTTCTCTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAATTA  
TCGGCCATCAATGATATTGATCATATGAATACTCCGATTTCAATAAAGAATT  
TGAATCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATACCAATTCATTCCGTCTT  
TTAGAAACCGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCT  
AATCACATCAGCTGATGTTATTCCTCATGAACCATTCCATCACTAGGAATA  
AAAATGGATGCTATTCCAGGCCGACTAAACCAAACATTA

**Continuação Anexo B**

**LIC 8010A / 1♀ / Município - Ipameri / Procedência - Pasto**

TAATGTTTGGTTTAGTCGGCCTGGAATAGCATCCATTTTTATTCCCTAGTGAT  
GGAATGGTTCATGAGTGAATCACATCAGCTGATGTAATTAGAAATTTAATTA  
TAGTATTAATGGAATTATTAATTTGTTATCGGTTTCTAAAAGACGGAATGA  
ATTGATATCTAGATCTGTTTCTGGAATTAATAATGAGTCAAATTCTTTGTTGA  
AATCGGAGTATTCATATGACCAATATCATTGATGGCCGATAATTTTGATTGA  
TGTTTGGGCATTAAAATTTTCATCTGTAAATAAAGAAGATGAAGGGAAGGT  
AAAGCAATAAAAATTAATGTAATTGCGGGAATGACTGTTCAAATAATCTCAA  
TTTCTTGTCCTTCTATTATTGACCGTCTAGTAAAAGAGTTTATTATAATATTA  
ACAATTATATATATTGTAATAATAGTAATAGAAATAATGATTATTATTGAGTG  
GTCATGAAAAAAGCTATTTGCTCCATAATGGGAGAATTTA

## ANEXO C

Sequências de *Amblyomma sculptum* obtidas no presente trabalho de fragmentos do gene COII e depositadas no *GenBank*, provenientes de alíquotas em *pool* de ninfas ou larvas do complexo *Amblyomma cajennense* identificadas mediante análise molecular, coletados no período de novembro de 2014 a março de 2016, em área de Cerrado, estado de Goiás, Brasil.

### **LIC 6753H / 30LL / Município - Jandaia / Procedência - Pasto**

TAAATTCTCCTATCATGGAGCAAATAGCTTTTTTTCATGACCACTCAATAAT  
AATCATTATTTCTATTACTATTATTACAATATATATAATTGTTAATATTATAAT  
AAACTCTTTTACTAGACGGTCAATAATAGAAGGACAAGAAATTGAGATTATT  
TGAACAGTCATTCCCGCAATTACATTAATTTTTATTGCTTTACCTTCCCTTCA  
TCTTCTTTATTTAACAGATGAAATTTTTAATGCCCAAACATCAATCAAATA  
TCGGCCATCAATGATATTGGTCATATGAATACTCCGATTTCAACAAAGAATT  
TGACTCATTTTTAATTCCAGAAACAGATCTAGATATCAATTCATTCCGTCTTT  
TAGAAACCGATAACAATTTAATAATTCCATTTAATACTATAATTAATTTCTA  
ATTACATCAGCTTGATGTGATTCACTCATGAACCATTCCCTTCCATTTTTGGA  
ATAAAAATGGATGCTATTCCAGGGCGGGGTAAACCAAACATTAATAAAA

### **LIC 7283B / 6LL / Município - Goiânia / Procedência - Mata**

TTAATGTTTGGTTTAATCGACCTGGAATAGCATCCATTTTTATTCTAGTGA  
TGGAATGGTTCATGAGTGAATAACATCAGCTGATGTGATTAGAAATTTAATT  
ATAGTATTAATGGAATTATTAATTTGTTATCGGTTTCTAAAAGACGGAATG  
AATTGATATCTAGATCTGTTTCTGGAATTAATAAATGAGTCAAATTCCTTTATTG  
AAATCGGAGTATTCATATGACCAATATCATTGATGGCCGATAATTTTGATTG  
ATGTTTGGGCATTAATAAATTTTCATCTGTAAATAGAGAAGATGAAGGGAAG  
GTAAAGCAATAAAAATTAATGTAATTGCGGGAATGATTGTTCAAATAATCTC  
AATTTCTTGTCCTTCTATTATTGACCGTCTAGTAAAAGAGTTTATTATAATAT  
TAACAATTATATATATTGTAATAATAGTAATAGAAATAATGATTATTATTGAG  
TGGTCATGAAAAAAGCTATTTGCTCCATGATGGGTGAATTACA

## Continuação Anexo C

LIC 7298B / 10LL / Município - Goiânia / Procedência - Curral

TAATGTTTGGTTTAGTCGCCCTGGAATAGCATCCATTTTTATTCCTAGTGAT  
GGAATGGTTCATGAGTGAATCACATCAGCTGATGTAATTAGAAATTTAATTA  
TAGTATTAATGGAATTATTAATTGTTATCGGTTTCTAAAAGACGGAATGA  
ATTGATATCTAGATCTGTTTCTGGAATTAATAATGAGTCAAATTCTTTGTTGA  
AATCGGAGTATTCATATGACCAATATCATTGATGGCCGATAATTTTGATTGA  
TGTTTGGGCATTAATAATTTTCATCTGTAAATAAAGAAGATGAAGGGAAGGT  
AAAGCAATAATAATTAATGTAATTGCGGGAATGACTGTTCAAATAATCTCAA  
TTTCTTGTCCTTCTATTATTGACCGTCTAGTAAAAGGGTTTATTATAATATTA  
ACAATTATATATATTGTAATAATAGTAATAGAAATAATGATTATTATTGAGTG  
GTCATGAAAAAAGCTATTTGCTGCATGATTGGTAAATTTA



## ANEXO D

### Números de acesso do *GenBank* das sequências do gene Citocromo Oxidase II (COII) utilizadas na reconstrução filogenética do complexo *Amblyomma cajennense*.

Espécie	Gene	Números de acesso ( <i>GenBank</i> )	Procedência
<i>Amblyomma cajennense</i> s.s.		KF787609, KF787610 KF787599, KF787608	Rondônia/ Brasil Guiana Francesa
<i>Amblyomma sculptum</i>	COII	KF787620, KF787619, KF787621, KF787618 KF787617, KF787616, KF614679, KF614683 KF614684, KF614678, KF614680, KF614677 KF614682, KF614681 KF787614, KF787615, KF787613, KF787612 KF787611	Mato Grosso/ Brasil Rio de Janeiro/ Brasil Rio de Janeiro/ Brasil Rio de Janeiro/ Brasil Yungas/ Argentina Yungas/ Argentina
<i>Amblyomma interandinum</i>		KF787627, KF787631	Peru
<i>Amblyomma mixtum</i>		KF787591, KF787595 KF787582, KF787587, KF787590 KF787572, KF787581 KF787583, KF787586	Texas México Equador Costa Rica
<i>Amblyomma tonelliae</i>		KF787622, KF787624- KF787626, KF787623	Argentina (Chaco), Paraguai
<i>Amblyomma patinoi</i>		KF787596, KF787598	Colômbia
<i>Amblyomma sphegodonti</i>		JN863731	Ilhas Stephens/ Nova Zelândia

COII - Citocromo Oxidase II / s.s. - *sensu stricto*

### Números de acesso do *GenBank* das sequências dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* utilizadas na reconstrução filogenética de *Rickettsia*.

Espécie	Números de acesso ( <i>GenBank</i> )		
	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>ompB</i>
<i>Rickettsia africae</i>	CP001612		AF123706
<i>Rickettsia akari</i>	CP000847	CP000847	CP000847
<i>Rickettsia amblyommatis</i>	CP012420	CP012420	CP012420
	CP003334	CP003334	CP003334
<i>Rickettsia andeanae</i>	KT153033	KF030932	KF030933
<i>Rickettsia asemboensis</i>	KX196267		KX544817
<i>Rickettsia australis</i>	CP003338	CP003338	CP003338
<i>Rickettsia bellii</i>	CP000087		
<i>Rickettsia conorii</i>	AE006914	NC_003103	AF123721
<i>Rickettsia felis</i>	CP000053		KF056801
<i>Rickettsia heilongjiangensis</i>	CP002912	CP002912	CP002912
<i>Rickettsia japonica</i>	AP017602	AP017602	AP017602
<i>Rickettsia massiliae</i>	CP000683	CP000683	CP000683
<i>Rickettsia montanensis</i>	NC_017043	FM883670	AF123716
<i>Rickettsia parkeri</i>	CP003341	CP003341	AF123717
<i>Rickettsia peacockii</i>	CP001227	FM883671	HF935081
<i>Rickettsia prowazekii</i>	CP004889	CP004889	CP004889
<i>Rickettsia rhipicephali</i>	CP003342	CP003342	AF123719
<i>Rickettsia rickettsii</i>	CP000766	CP000766	CP000766
<i>Rickettsia sibirica</i>	AABW01000001	U43807	AF123722
<i>Rickettsia slovaca</i>	CP003375	CP003375	CP003375
	KT153032	GQ855237	KX130669
<i>Rickettsia</i> sp. str. Atlantic rainforest	JQ906783	KT153044	KJ855086
		KT153045	GQ855236
<i>Rickettsia</i> sp. str. NOD	EU567177	EU567180	EU567179
<i>Rickettsia typhi</i>	CP003398	CP003398	CP003398

## ANEXO E

Sequências de organismos do gênero *Rickettsia* obtidas no presente trabalho do fragmento de gene *gltA* e depositadas no *GenBank*, provenientes de alíquotas contendo espécime único ou *pool* de espécimes do complexo *Amblyomma cajennense*, coletados no período de novembro de 2014 a março de 2016, em área de Cerrado, estado de Goiás, Brasil.

**LIC 6754Z / *Rickettsia bellii* / 30LL *Amblyomma rotundatum* / Município - Jandaia / Procedência - Mata**

TGCAAGTATCGGTGAGGATGTAATTGATATTAGTAAAGTATATTCTGAAGC  
GGATTGCTTTACTTACGATCCTGGTTTTATGTCTACTGCTTCGTGTAGATCA  
ACTATAACTTATATAGATGGTGATCAAGGAATTTTGCGGCATCGTGGTTAT  
GATATAAAAGATTTAGCCGAAAAAGCGACTTTTTAGAGGTGGCATATTTAT  
TGATTTATGGGGAATTACCAAATAATAAGCAGTATAATGATTTTACTAAAAC  
GGTTGCTCATCATGCGTTAGTTAATGAAAGATTACATTATTTATTCCAAACG  
TTTTGTAGCTCTTCGCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCGATTGGTTCT  
CTTTCTGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

**LIC 6759A / *Rickettsia* sp. str. NOD / 1♂ *Amblyomma nodosum* / Município - Trindade / Hospedeiro - *Myrmecophaga tridactyla***

TGCAAGTATCGGTGAGGATGTAATCGATATAAGTAGGGTATCTGCGGAAG  
CCGATTGCTTTACTTACGACCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAGTC  
TACTATCACCTATATAGATGGTGATAAAGGAATCTTGCGGCATCGAGGATA  
TGATATTAAAGACTTAGCTGAGAAAAGTGATTTTTAGAAAGTGGCATATTTA  
CTGATTTATGGGGAACTACCAAGTGGCGAGCAGTATAATAATTTCACTAAA  
CAGGTTGCTCATCATTATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTATTTCAA  
CCTTTGTAGCTCTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCTGTGCGTT  
CTTTTCGGCATTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

**Continuação Anexo E**

**LIS 652D / *Rickettsia felis* / 1♀ *Ctenocephalides felis* / Município -  
Gameleira / Hospedeiro - *Canis lupus familiaris***

AATTCAATAAATCAGGATAAAATGCCGAAAGAGAACCAACGGCCGCAAGCA  
TAATAGCCATAGGATGAGAAGAGCTACAAAATGTTTGAAATAAATAGTGTA  
TCTTTCATTCACTAATGAATGATGAGCAACCTGTTTAGTGAAATTATTATACT  
GCTCGATGCTTGGCAATTCTCCGTAGATTAGCAAATATGCCACTTCTAAAA  
AATCACTTTTCTCGGCTAAATCTTTAATGTCATATCCTCGATGTCGCAAGAT  
TCCTTTATCACCGTCTATATAAGTGATAGTAGACTGACAAGAAGCAGTAGA  
CATAAAGCCCGGGTCATAAGTAAAACAATCGGCTTCCGAAGATACCCTGCT  
TATATCGATTACATCCTCACG

**LIS 652E / *Rickettsia felis* / 1♂ *Ctenocephalides felis* / Município -  
Gameleira / Hospedeiro - *Canis lupus familiaris***

CGTGAGGATGTAATCGATATAAGCAGGGTATCTTCGGAAGCCGATTGTTTT  
ACTTATGACCCGGGCTTTATGTCTACTGCTTCTTGTCAGTCTACTATCACTT  
ATATAGACGGTGATAAAGGAATCTTGCGACATCGAGGATATGACATTAAAG  
ATTTAGCCGAGAAAAGTGATTTTTTAGAAGTGGCATATTTGCTAATCTACGG  
AGAATTGCCAAGCATCGAGCAGTATAATAATTTCACTAAACAGGTTGCTCA  
TCATTCATTAGTGAATGAAAGATTACACTATTTATTTCAAACATTTTGTAGCT  
CTTCTCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCCGTTGGTTCTCTTTCGGCAT  
TTTATCCTGATTTATTGAATT

**Continuação Anexo E**

**LIC 8010E1 / *Rickettsia bellii* / 3NN *Amblyomma cajennense* s. l. /  
Município - Ipameri / Procedência - Pasto**

CTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGATAAAAATGCAGAAAGAGAACCAACCG  
CCGCAAGCATAACATAGCACATAGGATACGTTGCAGAGCTACAAAACGTTTG  
GAATAAATAATGTAATCTTTCATTAACGCGATGATGAGCAACCTTTTTTA  
GTAAAATCATTATACTGCTTATTATTTGGTAATTCCCCATAAATCAATAAATA  
TGCCACCTCTAAAAAGTCGCTTTTTTTCGGCTAAATCTTTTATATCATAACCA  
CGATGCCGCAAAAATTCCTTGATCACCATCTATATAAGTTATAGTTGATCTAC  
ACGAAGCAGTAGACATAAAACCCGGATCGTAAGTAAAGCAATCCGCTTCA  
GAATATACTTTACTAATATCAATTACATCCTCACCGATACTTGCA

**LIC 8010F1 / *Rickettsia bellii* / 3NN *Amblyomma cajennense* s. l. /  
Município - Ipameri / Procedência - Pasto**

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAATTGATATTAGTAAAGTATATTCTGAAGCG  
GATTGCTTTACTTACGATCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCGTGTAGATCAA  
CTATAACTTATATAGATGGTGATCAAGGAATTTTGCGGCATCGTGGTTATG  
ATATAAAAGATTTAGCCGAAAAAAGCGACTTTTTAGAGGTGGCATATTTATT  
GATTTATGGGGAATTACCAAATAATAAGCAGTATAATGATTTTACTAAAAAG  
GTTGCTCATCATGCGTTAGTTAATGAAAGATTACATTATTTATTCCAAACGT  
TTTGTAGCTCTTCGCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCGGTTGGTTCTC  
TTTCTGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTTTAAGGAAGCA

## Continuação Anexo E

### **LIC 8010G1 / *Rickettsia bellii* / 3NN *Amblyomma cajennense* s. l. / Município - Ipameri / Procedência - Pasto**

GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGATAAAATGCAGAAAGAGAACCAACC  
GCCGCAAGCATAATAGCCATAGGATGCGAAGAGCTACAAAACGTTTGGAA  
TAAATAATGTAATCTTTCATTAACGCGATGATGAGCAACCTTTTTAGTAA  
AATCATTATACTGCTTATTATTTGGTAATCCCCATAAATCAATAAATATGCC  
ACCTCTAAAAGTCGCTTTTTTCGGCTAAATCTTTTATATCATAACCACGAT  
GCCGCAAATTCCTTGATCACCATCTATATAAGTTATAGTTGATCTACACGA  
AGCAGTAGACATAAAACCCGGATCGTAAGTAAAGCAATCCGCTTCAGAATA  
TACTTTACTAATATCAATTACATCCTCACCGATACTTGCA

### **LIC 8012K1 / *Rickettsia bellii* / 20LL *Amblyomma cajennense* s. l. / Município - Ipameri / Procedência - Pasto**

CGTGAGGATGTAATTGATATTAGTAAAGTATATTCTGAAGCGGATTGCTTTA  
CTTACGATCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCGTGTAGATCAACTATAACTTA  
TATAGATGGTGATCAAGGAATTTTGCGGCATCGTGGTTATGATATAAAAGA  
TTTAGCCGAAAAAAGCGACTTTTTAGAGGTGGCATATTTATTGATTTATGGG  
GAATTACCAAATAATAAGCAGTATAATGATTTTACTAAAAAGGTTGCTCATC  
ATGCGTTAGTTAATGAAAGATTACATTATTTATTCCAAACGTTTTGTAGCTCT  
TCGCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCGGTTGGTTCTTTCTGCATTTT  
ATCCTGATTTATTGAATT

**Continuação Anexo E**

**LIC 8012L1 / *Rickettsia bellii* / 20LL *Amblyomma cajennense* s. l. /  
Município - Ipameri / Procedência - Pasto**

TGCAAGTATCGTGAGGATGTAATTGATATTAGTAAAGTATATTCTGAAGCG  
GATTGCTTTACTTACGATCCGGGTTTTATGTCTACTGCTTCGTGTAGATCAa  
CTATAACTTATATAGATGGTGATCAAGGAATTTTGCGGCATCGTGGTTATG  
ATATAAAAGATTTAGCCGAAAAAAGCGACTTTTTAGAGGTGGCATATTTATT  
GATTTATGGGGAATTACCAAATAATAAGCAGTATAATGATTTTACTAAAAAG  
GTTGCTCATCATGCGTTAGTTAATGAAAGATTACATTATTTATTCCAAACGT  
TTTGTAGCTCTTCGCATCCTATGGCTATTATGCTTGCGGCGGTTGGTTCTC  
TTTCTGCATTTTATCCTGATTTATTGAATTT

## ANEXO F

Sequências de organismos do gênero *Rickettsia* obtidas no presente trabalho do fragmento de gene *ompA* e depositadas no *GenBank*, provenientes de alíquotas contendo espécime único ou *pool* de espécimes do complexo *Amblyomma cajennense*, coletados no período de novembro de 2014 a março de 2016, em área de Cerrado, estado de Goiás, Brasil.

LIC 6759A / *Rickettsia* sp. str. NOD / 1♂ *Amblyomma nodosum* / Município - Trindade / Hospedeiro - *Myrmecophaga tridactyla*

TATTTCTCCAAAATTATTTCAAAAAGCAATACAACAAGGTCTTAAAGCCGCT  
TTATTCACCACCTCAACCGCAGTCGATAATGCTGAGTAGTAGCGGGGCAC  
TCGGTGTTGCTGCAGGTGTTATTGCTACTAATAATAATGCAGCATTAGTG  
ATAATGTTGGCAATAATAATTGGAATGAGATAACGGTTGCAGGGGTAGCTA  
GTGATGTTCCCTGCTGGCAGTCCTCAAAACAATTGGGCATTTACTTACGGTG  
GTGATTATACTATCACTGCAGATGCAGCCGATCGTATTATTACGGCTATAA  
ATGTTGCGGGTACTACTCCCGTAGGTCTAAATATTGCTCAAATACCGTTG  
TTGGTTCGATTATAACGAGAGGTAACCTTCTTGCTGTTACTATTACTGCCG  
GCAAAGCTTAACTTTAAACGGTAATAATGCTGTTGCTGCAAATCATGGTTT  
TGATGCTCCTGCCGATAATATATAGTAGGTTTAGGAGATATAGCTTTAGGG  
GGAGC

LIS 652D / *Rickettsia felis* / 1♀ *Ctenocephalides felis* / Município - Gameleira / Hospedeiro - *Canis lupus familiaris*

TATTTCTCCAAAATTATTTCAAAAAGCAATTCAAAAAGGTCTTAAACTGCTT  
TATTCACCACCTCAACCGCAGCGATAATGCTAACCGGTAGTGGAGTCCTTG  
GTGCTGCAAGAACCGTAACTGCTGATGGTGCAGAGCTTGCAGCCGGAACA  
AATATAGGTCCTGGAGCCGGTGCTTTTGTAGCGGGTTCTACTTTACAATAT  
ACCGGTGCTTTTACGGTACTGATGCTGACGTAAGTGTTTCGTGCATTAGAT  
TTAAATAATTTTGCAGCAGGTCTTTTTTCAGTAACTGGTGATATTTTCATTAG  
GTTTCAGTGGTAGATACGGGAGGAGCTAATAAACTTGCAGTTAATATTGATG  
ATGGTTTAACTTAACTTTAACAGGTACCGGTACTGCAGCCTACGGTGCAA  
ATCCTGCGTTGTTATTCCAAGGTGGACAAGCTGCTGCTAATAATACATATA  
CTGCTTTAGGTAATAACTCTAGGGGGAGCGAATGCTGCACTA

## ANEXO G

Sequências de organismos do gênero *Rickettsia* obtidas no presente trabalho do fragmento de gene *ompB* e depositadas no *GenBank*, provenientes de alíquotas contendo espécime único ou *pool* de espécimes do complexo *Amblyomma cajennense*, coletados no período de novembro de 2014 a março de 2016, em área de Cerrado, estado de Goiás, Brasil.

**LIC 6759A / *Rickettsia* sp. str. NOD / 1♂ *Amblyomma nodosum* / Município - Trindade / Hospedeiro - *Myrmecophaga tridactyla***

TACCATAGTAGCCAGTTTTGCAGGTTGAGCTATGGGTGCTGCTATACAGCA  
GAATAGAACAACAAACGCAGATGCTACAACCTGTTGATGGTGCGGGATTTGA  
CCAACTGCAGTTCCTGCAAATGTTGCAGTTCCTCTAAATGCAGTTACT  
GCTGCTGTTTATAAGGGTATTAATTTAAATACTCCAGCCGGTAGTTTTAACG  
GTTTGTAAAAATACTGCAAACAATTTAGCAGTGACAGTGAGTGAAGATAC  
TACCTTAGGGTTCATCACTCGTGCTGTTAATAACGCTAACTTCTTTAACCTT  
ACGCTTAATGCCGGTAAAACTCTTACTATAACAGGTCAAGGTATTACTAATG  
TACAAGCTGCTGCTACAAAAAATGCTCAAAATGTTGTTGTACAAGTTAATAA  
TGGTGCTGCTATTGAAAATAATGATCTTCAAGGTGTAGGAACAATAGACTT  
CGGTGCTGCGGCTTCTACATTAGTATTTAATTTAGCAAATCCTACAACCTCAA  
AAAGCTCCTCTTATACTTGGAGATAATGCTATAATAGTTAATGGTGCTAACG  
GTACATTAATGTTACTAATGGATTTATTGAAGTTTCAAGTAAAAGTTTTGCT  
ACTGTTAATGCAATTAATATCGGTGACGGTCAAGGTATCATATTCAATACTG  
ATGCTAATAATGCTAATGCTTTAAATTTACAAGCAGGTGGTACTACTATTAA  
TTTTAATGGAACAGACGGTACGGGTAGATTAGTATTGTTAAGTAAGAATGC  
TGCTGCTACCGACTTTAACGTTACAGGAAGTT



**Continuação Anexo G**

**LIC 652D / *Rickettsia felis* / 1♀ *Ctenocephalides felis* / Município -  
Gameleira / Hospedeiro - *Canis lupus familiaris***

GCAGCATTACTAATACTAATACTAATCGGTACCGGTACCGTCTGTAAAATT  
AATAGTAGCACCACCTACTTGTAATTTAAAGCATTACCGGCAGTAGCATC  
AGTATTGAAAATGAAACCTTGACCGTCACCGATATTAATTGTCTTAATAGTA  
GCAAAAGTTTCATCTGAAACTTGAATAAATCCATTAGTAACATTTAATGTAC  
CGTTAGCACCATTAGCTATTACAGCATTATCTCCAAGTATAAGAGGAGCTC  
TTTGAGTTGTAGGGTTTGTAAATTAATACTAATGTAGAAGGCGCAGCAC  
CAAATCTATTGTTCCACACCGCTAAGATCATTATTGGCAATAGCATTACC  
ACCATTAACCTTGTCACAGCATTGAGCATTGAGCATTGAGCAGCAGCTTGT  
CCAGCAGTAATACCTTGTCCTGTTATGGTAAGAGTTTTACCGGCACCAAGA  
GTAAAATTAAGAAGTTACCGTTATTAGCAGCATTAGTGATAAATCCTAAAG  
TAGTATCTTCACTAACTGTCGCTGCTAAATTGTTTGCAGTATCTAAAAACAA  
ACCGTTAAAACCTGCTGGAGTATTAATAAATTAATACCATTATTAGCATT  
GCCGTAATAACTGCATTTGGAGCAACTGCAAGATTTGCAGGAGCGGCAGT  
TTGGTCAAATCCCGCACCGTCAACAGTTGTAGCAGCTCCGACTGTTGTTCT  
ATTCTGCTGTGTAGCAGCACCCATAGCTGAGCCTGCGAAGCCGGCTACTA  
TGGTAGCTGTAGAAGCAGTTACA

**Continuação Anexo G**

**LIC 652E / *Rickettsia felis* / 1♂ *Ctenocephalides felis* / Município -  
Gameleira / Hospedeiro - *Canis lupus familiaris***

ATAGTAGCCGGCTTCGCAGGCTCAGCTATGGGTGCTGCTACACAGCAGAA  
TAGAACAAACAGTCGGAGCTGCTACAACCTGTTGACGGTGCGGGATTTGACC  
AACTGCCGCTCCTGCAAATCTTGCAGTTGCTCCAAATGCAGTTATTACGG  
CTAATGCTAATAATGGTATTAATTTAATACTCCAGCAGGTAGTTTTAACGG  
TTTGTTTTAGATACTGCAAACAATTTAGCAGCGACAGTTAGTGAAGATACT  
ACTTTAGGATTTATCACTAATGCTGCTAATAACGGTAACTTCTTTAATTTTAC  
TCTTGGTGCCGGTAAACTCTTACCATAACAGGACAAGGTATTACTGCTGG  
ACAAGCTGCTGCTACAAAAAATGCTCAAATGCTGTTGCACAAGTTAATGG  
TGGTAATGCTATTGCCAATAATGATCTTAGCGGTGTAGGAACAATAGATTTT  
GGTGCTGCGCCTTCTACATTAGTATTTAATTTAACAAACCCTACAACCTCAA  
GAGCTCCTCTTATACTTGGAGATAATGCTGTAATAGCTAATGGTGCTAACG  
GTACATTAATGTTACTAATGGATTTATTCAAGTTTCAGATGAAACTTTTGCT  
ACTATTAAGACAATTAATATCGGTGACGGTCAAGGTTTCATTTTCAACTG  
ATGCTACTGCCGGTAATGCTTTAAATTTACAAGTAGGTGGTGCTACTATTAA  
TTTTAACGGAACAGACGGTACCGGTAGATTAGTATTATTAAGTAATGCTGC  
TGGTGGCGGTGCTACCGACTTTAATGTTACAGGAAGTTTAGGCGGA

## ANEXO H

Frequência absoluta de vetores coletados (*N*) e de exemplares submetidos a PCR (espécime único e *pools*) (*n*) provenientes de 14 municípios do estado de Goiás, Brasil.

Vetores	Hospedeiros																			TOTAL	
	Ambiente		<i>Canis lupus familiaris</i>		<i>Myrmecophaga tridactyla</i>		<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>		<i>Didelphis sp.</i>		Rodentia		Marsupialia		<i>Bos taurus</i>		<i>Bufo spp.</i>		22	100%	
Isodida	<i>N</i>	<i>n</i>	<i>N</i> = 9	40,91%	<i>N</i> = 3	13,64%	<i>N</i> = 1	4,55%	<i>N</i> = 2	9,09%	<i>N</i> = 2	9,09%	<i>N</i> = 1	4,55%	<i>N</i> = 3	13,64%	<i>N</i> = 1	4,55%			
<i>Amblyomma cajennense s.l.</i>	1560 <sup>a,d,g,h,i-m</sup>	344 <sup>a,d,g,h,i-m</sup>	1 <sup>g</sup>	1 <sup>g</sup>	20 <sup>b,c,n</sup>	4 <sup>b,c,n</sup>	10 <sup>g</sup>	3 <sup>g</sup>	27 <sup>g</sup>	11 <sup>g</sup>	0	0	137 <sup>g</sup>	60 <sup>g</sup>	0	0	0	0	1735 <sup>a-d,g,h-n</sup>	422 <sup>a-d,g,h-n</sup>	
<i>Amblyomma cajennense s.s.</i>	3 <sup>d</sup>	1 <sup>d</sup>	0	0	1 <sup>b</sup>	1 <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4 <sup>b,d</sup>	2 <sup>b,d</sup>	
<i>Amblyomma dubitatum</i>	2379 <sup>g</sup>	25 <sup>g</sup>	0	0	0	0	2 <sup>g</sup>	2 <sup>g</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2381 <sup>g</sup>	27 <sup>g</sup>	
<i>Amblyomma naponense</i>	1 <sup>j</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>j</sup>	0	
<i>Amblyomma nodosum</i>	0	0	0	0	3 <sup>c,n</sup>	2 <sup>c,n</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3 <sup>c,n</sup>	2 <sup>c,n</sup>	
<i>Amblyomma parvum</i>	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>a</sup>	1 <sup>a</sup>	
<i>Amblyomma rotundatum</i>	49 <sup>j</sup>	34 <sup>j</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>e</sup>	1 <sup>e</sup>	50 <sup>e,j</sup>	35 <sup>e,j</sup>	
<i>Amblyomma sculptum</i>	202 <sup>a,g,h,i-k</sup>	52 <sup>a,g,h,i-k</sup>	1 <sup>g</sup>	1 <sup>g</sup>	15 <sup>b,c,n</sup>	7 <sup>b,c,n</sup>	3 <sup>g</sup>	1 <sup>g</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	219 <sup>a-c,g,h,i-k,n</sup>	61 <sup>a-c,g,h,i-k,n</sup>	
<i>Dermacentor nitens</i>	217 <sup>f</sup>	120 <sup>f</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	217 <sup>f</sup>	120 <sup>f</sup>	
<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	572 <sup>g</sup>	35 <sup>g</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	40 <sup>g</sup>	7 <sup>g</sup>	0	0	612 <sup>g</sup>	42 <sup>g</sup>	
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	0	39 <sup>g</sup>	13 <sup>g</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	39 <sup>g</sup>	13 <sup>g</sup>	
Siphonaptera																					
<i>Ctenocephalides felis</i>	0	0	8 <sup>f,g</sup>	7 <sup>f,g</sup>	0	0	0	0	1 <sup>g</sup>	1 <sup>g</sup>	0	0	0	0	0	0	0	0	9 <sup>f,g</sup>	8 <sup>f,g</sup>	
<i>Xenopsylla sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1 <sup>g</sup>	1 <sup>g</sup>	0	0	0	0	0	0	1 <sup>g</sup>	1 <sup>g</sup>	
Mesostigamata																					
<i>Androlaelaps sp.</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2 <sup>g</sup>	0	0	0	0	0	0	0	2 <sup>g</sup>	0	
TOTAL	4984	612	49	22	37	14	15	6	28	12	3	1	137	60	40	7	1	1	5294	734	

Municípios do estado de Goiás: <sup>a</sup>Alto Paraíso de Goiás, <sup>b</sup>Aparecida de Goiânia, <sup>c</sup>Bela Vista de Goiás, <sup>d</sup>Bonópolis, <sup>e</sup>Cavalcante, <sup>f</sup>Gameleira de Goiás, <sup>g</sup>Goiânia, <sup>h</sup>Indiara, <sup>i</sup>Ipameri, <sup>j</sup>Jandaia, <sup>k</sup>Niquelândia, <sup>l</sup>Piracanjuba, <sup>m</sup>Rio Quente, <sup>n</sup>Trindade.