

UFRRJ
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS

TESE

Epidemiologia descritiva de carrapatos (Acari: Ixodidae), piolhos (Phthiraptera: Trichodectidae) e *Rickettsia* spp. em quatis (*Nasua nasua*) de hábitos sinantrópicos no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil

Paulo Cesar Magalhães Matos

2018



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**EPIDEMIOLOGIA DESCRITIVA DE CARRAPATOS (ACARI: IXODIDAE),
PIOLHOS (PHTHIRAPTERA: TRICHODECTIDAE) E *Rickettsia* spp. EM QUATIS
(*Nasua nasua*) DE HÁBITOS SINANTRÓPICOS NO PARQUE NACIONAL DO
IGUAÇU, PARANÁ, BRASIL**

PAULO CESAR MAGALHÃES MATOS

Sob orientação do Professor
Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Ciências Veterinárias.

**Seropédica, RJ
Fevereiro de 2018**

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M188e Magalhães-Matos, Paulo Cesar, 1989-
Epidemiologia descritiva de carrapatos (Acari: Ixodidae), piolhos (Phthiraptera: Trichodectidae) e Rickettsia spp. em quatis (Nasua nasua) de hábitos sinantrópicos no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil / Paulo Cesar Magalhães-Matos. - 2018.
68 f.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.
Tese (Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2018.

1. Carrapatos. 2. Piolhos. 3. Rickettsia. 4. Quati. 5. Parque Nacional do Iguaçu. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

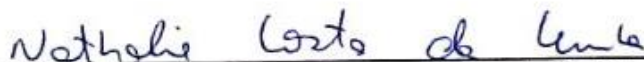
PAULO CESAR MAGALHÃES MATOS

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Ciências Veterinárias.

TESE APROVADA EM 07 / 02 / 2018.



Aivaldo Henrique da Fonseca. Dr. UFRRJ
(Orientador)



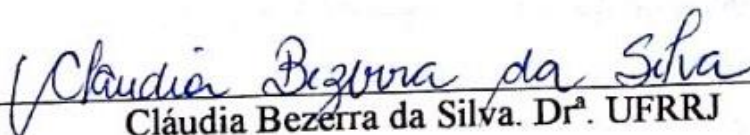
Nathalie Costa da Cunha. Dr^a. UFF



Maria Halina Ogrzawska. Dr. FIOCRUZ



Carlos Luiz Massard. Dr. UFRRJ



Cláudia Bezerra da Silva. Dr^a. UFRRJ

DEDICATÓRIA

Aos meus avós, Raimunda Magalhães e José Ferreira, in memoriam
À minha mãe, Selma Magalhães, e ao meu pai, Pedro Matos.
À minha filha, Ana Letícia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por toda bondade e providência, por ter sido sustento nos momentos de fraqueza e mão amiga na caminhada.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, bem como ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias por terem aberto as portas pra eu fazer o curso de doutorado e por serem tão acolhedores com cada ruralino brasileiro.

Ao prof. Adivaldo Henrique da Fonseca por aceitar me orientar no doutorado e por assim o fazer durante esses quatro anos. Agradeço pela confiança que teve em mim mesmo pouco me conhecendo em 2014 e por ser exemplo de orientador e amigo. À prof.^a Marília Massard por ter sido tão receptiva e acolhedora comigo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), por financiar minha bolsa de doutorado de 2014 a 2016, dando plenas condições pra eu me manter no Rio de Janeiro na primeira parte do curso. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), por financiar minha bolsa de doutorado de 2016 a 2018, embora os atrasos em série dos pagamentos, que dificultaram em demasia a vida de todos os bolsistas dessa instituição.

Aos funcionários do Parque Nacional do Iguazu e do Projeto Carnívoros do Iguazu, especialmente Marina Xavier, Mauro Costa, Pedro Fogaça e Raphael Xavier, pela recepção e enorme apoio durante as coletas. Sem a ajuda de vocês o trabalho sem dúvida teria sido muito maior.

À Marcela Figueiredo Duarte Moraes, pela parceria nas coletas de amostras dos quatis e pela sua empolgação ter sido estímulo e encorajamento no dia a dia intenso das coletas. À Fabíola Vieira e ao Danilo Badke pela mão estendida durante as capturas.

Ao prof. Douglas McIntosh por todos os ensinamentos em diagnóstico molecular e por sempre estar disposto para esclarecer dúvidas.

Ao Alexandro Guterres, pelo apoio fundamental na construção das árvores filogenéticas.

Agradeço muitíssimo aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) por toda a parceria durante estes anos, desde o acolhimento no Rio de Janeiro até coletas de campo e apoio na bancada do laboratório. À Priscilla Nunes, Jaqueline Valim, Michelle Bahia, Izabela Mesquita, Márcio Cepeda, Andrea Kill, Gustavo Castro, Matheus Cordeiro, Claudia Bezerra, Bruna Land, Juliana Ferreira, Adlilton Pacheco, Carolina Marotta, Patrícia Cepeda, Carla Carolina Uzedo, Neide Gomes, Bruna Baêta, Taiana Rodrigues, Taís Carvalho, Priscila Vieira, Taís Figueroa, Yasmin Kaulich, Yuri Miguez e Letícia Rodrigues, meus sinceros agradecimentos. Ao Thiago Bernardo Pedro que, mesmo não sendo do LDP, sempre foi uma amizade tão presente.

Aos parceiros do alojamento, pelos momentos de descontração e apoio em vários momentos durante minha estadia em Seropédica, especialmente a Francisco Andrade, Ingrid Oliveira, Rodrigo Caldeira, Antônio Alexandre João, Gleice Oliveira, Arturo Romero e Davy Hidalgo. À Osvanira Alves, pela amizade e apoio que sempre me deu, tanto quando morava no alojamento quanto depois, no Rio.

A toda a minha família, por sempre me apoiar mesmo à distância.

Aos meus avós Raimunda Magalhães de Araújo e José Ferreira de Araújo, que partiram sem eu poder estar presente. Eu jamais esquecerei minha avó dizer que “O Meirelles vai voltar Doutor do Rio de Janeiro!”, e que infelizmente eu farei isso mas sem ela estar por aqui fisicamente, embora eu saiba que ela está, sim, aqui. Obrigado por ser, junto com a minha mãe, meus maiores referenciais de professor.

À minha mãe, Selma Magalhães, e meu pai, Pedro Matos, por serem meus maiores incentivadores e por quem sempre vou me esforçar pra ser o melhor que eu posso. Se devo a

alguém todas as minhas conquistas profissionais e a educação que recebi, é a vocês. Obrigado pelo apoio financeiro e, principalmente, sentimental de toda uma vida, que foram fundamentais pra eu chegar até aqui.

Às minhas lindas irmãs Ana Paula Magalhães e Caroline Araújo, por serem o tempero da minha vida e por me fazerem entender que ser irmão é um misto de muito, muito amor e paciência. Tenho orgulho de todas as conquistas de vocês. Agradeço também a minha filha Ana Letícia, a quem tanto eu amo e que enche **todos** os meus dias de alegria. Por ela tento ser um ser humano melhor a cada dia.

Ao meu marido Marcos Lemos, por ter sido tão companheiro, compreensivo e fundamental na minha vida, e por ser um estímulo diário para novas conquistas. Muito obrigado por dividir comigo o peso do tempo e da distância.

Ao meu gato Pierrot, o qual eu perdi sem poder me despedir. Meus sinceros agradecimentos por ter sido o paciente, chato e irritado que eu mais sinto falta na vida.

A todos que de alguma forma juntaram as mãos para culminar nesta tese de doutorado, meus sinceros agradecimentos!

BIOGRAFIA

Paulo Cesar Magalhães Matos, filho de Pedro Paulo de Matos e Selma Lucia Magalhães Matos, nasceu em 29 de dezembro de 1989 no município de Castanhal, estado do Pará. cursou o ensino fundamental e médio majoritariamente na Escola Estadual Cônego Luiz Leitão, concluindo seus estudos no Instituto de Educação Darwin, em 2006.

No ano de 2007 ingressou no curso de bacharelado em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pará (UFPA). Durante o período acadêmico realizou estágios em diversas áreas, integrando projetos de pesquisa e extensão universitária, principalmente na área de parasitologia animal. Foi bolsista pela Pró-Reitoria de Extensão da UFPA (PROEX) de agosto de 2009 a março de 2012, sendo também bolsista de Iniciação Científica da Fundação Amazônia de Amparo a Estudos e Pesquisas (FAPESPA) de setembro de 2010 a agosto de 2011. Essas atividades foram realizadas junto ao Laboratório de Parasitologia Animal do Instituto de Medicina Veterinária da UFPA, no município de Castanhal, Pará. Em 02 de março de 2012 obteve o título de Médico Veterinário.

Ainda em março de 2012 ingressou no Programa de Pós-Graduação em Saúde Animal na Amazônia da UFPA, área de concentração Saúde Animal, em nível de mestrado, onde foi bolsista da CAPES. Foi contemplado com o Prêmio “Hélio Martins” de melhor trabalho da área de protozoologia apresentado no XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária (2014), cujo tema integrou sua dissertação de mestrado. Recebeu o título de Mestre em Saúde Animal em fevereiro de 2014.

Em dezembro de 2013 foi aprovado em 1º lugar no curso de doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Ciências Veterinárias, da UFRRJ, no qual ingressou em março de 2014. Dessa data até fevereiro de 2016 foi bolsista do CNPq, sendo então contemplado com a bolsa FAPERJ Nota-10, com a qual permanece até o presente momento. Participou de 61 publicações científicas em revistas científicas indexadas e eventos científicos nacionais e internacionais, desde a sua graduação até o doutorado.

Nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Ciências Veterinárias.

RESUMO GERAL

MAGALHÃES-MATOS, Paulo Cesar. **Epidemiologia descritiva de carrapatos (Acari: Ixodidae), piolhos (Phthiraptera: Trichodectidae) e *Rickettsia* spp. em quatis (*Nasua nasua*) de hábitos sinantrópicos no Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil.** 2018. 73p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Diferentes espécies do gênero *Rickettsia* têm registro confirmado no território brasileiro, tais como *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia amblyommatis*, sendo a primeira mais importante como causadora de doença em humanos. Há um vasto conhecimento sobre a importância de carrapatos na ecologia dessas bactérias, contudo, ainda é limitado o conhecimento sobre alguns hospedeiros mamíferos silvestres. O presente trabalho tem por objetivos avaliar a diversidade de carrapatos e piolhos parasitos de quatis, bem como realizar a detecção molecular de *Rickettsia* spp. em quatis de hábitos selvagens e sinantrópicos e nos carrapatos que os infestam, no Parque Nacional do Iguaçu (PNI), estado do Paraná, sul do Brasil. Amostras de pele e ectoparasitos foram obtidos de quatis que frequentam as áreas turísticas do PNI. Os ectoparasitos foram identificados morfolologicamente e amostras de cada espécie foram depositadas na CAVAISS da FIOCRUZ. Para pesquisa de DNA de *Rickettsia* spp., foi realizada Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) para fragmentos dos genes *htrA*, *gltA*, *ompA* e *ompB*. As amostras positivas foram sequenciadas em ambas as direções e submetidas à pesquisa de homologia pelo Genbank, sendo realizada também análise filogenética. Dentre os quatis avaliados, 99% (85/86) encontravam-se infestados por ectoparasitos, sendo observados carrapatos em 99% dos animais, dos quais foram identificadas larvas de *Amblyomma* spp. (n=23), ninfas de *Amblyomma brasiliense* (n=77), *Amblyomma coelebs* (n=427) e *Haemaphysalis juxtakochi* (n=6), além de adultos de *Amblyomma ovale* (n=46). Piolhos foram encontrados em menor prevalência (13%; 11/86), sendo observadas ninfas (n=31) e adultos (n=9) de *Neotrichodectes pallidus*. Em relação a infecção por *Rickettsia* spp., 3,00% (17/566) dos carrapatos avaliados amplificaram DNA de *Rickettsia* sp., *Rickettsia amblyommatis* e *Rickettsia bellii*. Em amostras de pele dos quatis, 1% (1/75) amplificou DNA de *Rickettsia rhipicephalis*. Quatis de hábitos selvagens e sinantrópicos, bem como os carrapatos que os infestam, são infectados por *Rickettsia* spp. no PNI, estado do Paraná, sul do Brasil.

Palavras-chave: carrapatos, piolhos, *Rickettsia*, quati, Parque Nacional do Iguaçu.

GENERAL ABSTRACT

MAGALHÃES-MATOS, Paulo Cesar. **Descriptive epidemiology of ticks (Acari: Ixodidae), lice (Phthiraptera: Trichodectidae) and *Rickettsia* spp. in quatis (*Nasua nasua*) of sinanthropic habits in the Iguaçu National Park, Paraná, Brazil.** 2018. 73p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Sciences, Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Different species of the genus *Rickettsia* have been confirmed in the Brazil, such as *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia amblyommatis*, being the first most important as causing disease in humans. There is extensive knowledge about the importance of ticks in the ecology of these bacteria, but there is still limited knowledge about some wild mammalian hosts. We aimed to evaluate the diversity of ticks parasites of coatis, as well as perform the molecular detection of *Rickettsia* spp. in ticks and coatis of sylvatic and synanthropic habits in the Iguaçu National Park (INP), state of Paraná, south of Brazil. Skin samples and ectoparasites were obtained from coatis that frequent the tourist areas of the INP. The ectoparasites were identified morphologically and samples of each species were deposited in the CAVAISC of FIOcruz. For analysis of *Rickettsia* spp. DNA, PCR was performed for fragments of the *htrA*, *gltA*, *ompA* and *ompB* genes. Positive samples were sequenced in both directions and submitted to homology research by Genbank. Among the coatis evaluated, 99% (85/86) were infested by ectoparasites, and ticks were observed in 99% of the animals, of which *Amblyomma* spp. larvae (n=23), nymphs of *Amblyomma brasiliense* (n=77), *Amblyomma coelebs* (n=427) e *Haemaphysalis juxtakochi* (n=6), as well as *Amblyomma ovale* adults (n=46). Lice were found in a lower prevalence (13%, 11/86), with nymphs (n=31) and adults (n=9) of *Neotrichodectes pallidus*. In relation to *Rickettsia* spp. infection, 3.00% (17/566) of the evaluated ticks amplified DNA of *Rickettsia* sp., *Rickettsia amblyommatis* and *Rickettsia bellii*. In skin samples, 1% (1/75) amplified *Rickettsia rhipicephali* DNA. Coatis with sylvatic and synanthropic habits, as well as the ticks that infest them, are infected by *Rickettsia* spp. in the INP, state of Paraná, southern Brazil.

Keywords: Ticks, lice, *Rickettsia*, coatis, Iguazu National Park.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 2 |
| 2.1 Parque Nacional do Iguaçu | 2 |
| 2.2 <i>Nasua nasua</i> : o quati | 4 |
| 2.3 Ectoparasitismo em quatis | 4 |
| 2.4 Riquetsias patogênicas para seres humanos e outros animais | 5 |
| CAPÍTULO I - Carrapatos (Acari: Ixodidae) e piolhos (Phthiraptera: Trichodectidae) infestando quatis (<i>Nasua nasua</i> Linnaeus, 1766) de vida livre com hábitos selvagens e sinantrópicos no Parque Nacional do Iguaçu, estado do Paraná | 7 |
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| 1 INTRODUÇÃO | 10 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 11 |
| 2.1 Aspectos éticos e legais da pesquisa científica | 11 |
| 2.2 Critérios de inclusão e amostragem | 11 |
| 2.3 Área de estudo e origem dos animais | 12 |
| 2.4. Captura e contenção dos animais | 13 |
| 2.5. Pesquisa e identificação dos ectoparasitos | 13 |
| 2.6. Determinação dos índices de ecologia parasitária | 14 |
| 3 RESULTADOS | 15 |
| 4 DISCUSSÃO | 19 |
| 5 CONCLUSÃO | 21 |
| 6 REFERÊNCIAS | 22 |
| CAPÍTULO II - Quatis (<i>Nasua nasua</i> Linnaeus, 1766) (Carnivora: Procyonidae) e carrapatos (Acari: Ixodidae) como hospedeiros de <i>Rickettsia</i> spp. no Parque Nacional do Iguaçu, estado do Paraná, sul do Brasil | 25 |
| RESUMO | 26 |
| ABSTRACT | 27 |
| 1 INTRODUÇÃO | 28 |
| 2 MATERIAL E MÉTODOS | 29 |

| | |
|--|-----------|
| 2.1 Aspectos éticos e legais da pesquisa científica | 29 |
| 2.2 Área de estudo | 29 |
| 2.3 Obtenção das amostras | 29 |
| 2.4 Análises moleculares | 30 |
| 2.4.1 Extração de DNA | 30 |
| 2.4.2 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) | 30 |
| 2.4.3 Eletroforese e análise dos resultados | 31 |
| 2.4.4 Sequenciamento | 31 |
| 2.5 Análise filogenética | 31 |
| 3 RESULTADOS | 32 |
| 4 DISCUSSÃO | 40 |
| 5 CONCLUSÃO | 43 |
| 6 REFERÊNCIAS | 44 |
| 3 CONCLUSÕES GERAIS | 49 |
| 4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| ANEXOS | 53 |
| Anexo I – Artigo publicado referente ao capítulo I | 54 |
| Anexo II – Declaração de aprovação – CEUA – IV | 55 |
| Anexo III – Autorização para atividades com finalidade científica - ICMBio..... | 56 |
| Anexo IV – Modelo da ficha de coleta de amostras biológicas a campo | 57 |
| Anexo V – Protocolo de extração de DNA (Fenol/Fenol-clorofórmio) segundo Santolin (2014) | 58 |
| Anexo VI – Contigs das amostras sequenciadas de <i>Rickettsia</i> spp. | 59 |

1 INTRODUÇÃO GERAL

A Mata Atlântica é a segunda maior floresta pluvial tropical do continente americano. Apesar de aproximadamente 91,5% de sua área original ter sido destruída, esse bioma ainda é responsável por abrigar mais de 20.000 espécies de plantas, 849 espécies de aves, 370 espécies de anfíbios, 200 espécies de répteis, 270 de mamíferos e cerca de 350 espécies de peixes (MYERS et al., 2000, MMA, 2018). As unidades de conservação desempenham um papel importante na manutenção da biodiversidade, embora elas possam ser consideradas pequenas quando comparadas as áreas remanescentes da floresta (MYERS et al., 2000).

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) é uma das maiores áreas de conservação da Mata Atlântica, que compreende uma extensão de 185 mil hectares e abriga as Cataratas do Iguaçu (FERNANDES; GARCIA, 2011), recebendo anualmente cerca de 1,5 milhão de visitantes de diversas regiões do mundo (ICMBIO, 2016). O PNI apresenta abundante riqueza faunística, merecendo destaque mamíferos como onça-pintada, anta, quati, veado, cutia e caititu, dentre outras espécies (FERNANDES; GARCIA, 2011).

As diferentes espécies de animais silvestres podem funcionar como reservatórios de agentes zoonóticos na natureza e, quando em contato íntimo com seres humanos, funcionam como veiculadores desses patógenos para os *habitats* antrópicos (JORGE et al., 2010). Os quatis (*Nasua nasua*) são carnívoros da família Procyonidae que estão amplamente distribuídos na América do Sul, sendo uma das espécies que apresentam maior sinantropia nas áreas de visitação do PNI, especialmente próximo ao mirante das cataratas (FERNANDES; GARCIA, 2011). Dessa forma, é importante o conhecimento sobre a ecoepidemiologia de agentes zoonóticos que infectam esses animais de hábitos sinantrópicos, uma vez que eles podem servir como fonte de infecção aos seres humanos.

Carrapatos, piolhos e pulgas são considerados os principais artrópodes que infestam os animais. Esses ectoparasitos apresentam importância não só por causarem espoliação sanguínea e/ou dano epitelial nos hospedeiros, mas também pela capacidade de algumas espécies em transmitir patógenos para os animais, incluindo os seres humanos (TUFF, 1977; LINARDI; GUIMARÃES, 2000; BARROS-BATTESTI et al., 2006). *Borrelia* spp. e *Rickettsia* spp., por exemplo, são bactérias que necessitam de artrópodes para completar seu ciclo de transmissão para outros hospedeiros (CUTLER et al., 2010; PAROLLA et al., 2013).

As bactérias do gênero *Rickettsia* são responsáveis por causar, pelo menos, duas rickettsioses no território brasileiro. A Febre Maculosa é causada por *Rickettsia rickettsii* e transmitida por *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma sculptum* (complexo *Amblyomma cajennense*) (SZABÓ et al., 2013a). Há alguns anos, a Febre Maculosa da Mata Atlântica, uma rickettsiose mais branda que a FM, foi descrita por Spolidorio et al. (2010), sendo causada por *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica e transmitida por *Amblyomma ovale* e *A. aureolatum* (SZABÓ et al., 2013b).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Parque Nacional do Iguazu

O Parque Nacional do Iguazu (PNI) é uma unidade de conservação federal administrada pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio). Está localizado na mesorregião Oeste do estado do Paraná (Fig. 1-A, 1-B), no Sul do Brasil, sendo o segundo parque nacional criado no território brasileiro, no ano de 1939 (FERNANDES; GARCIA, 2011).

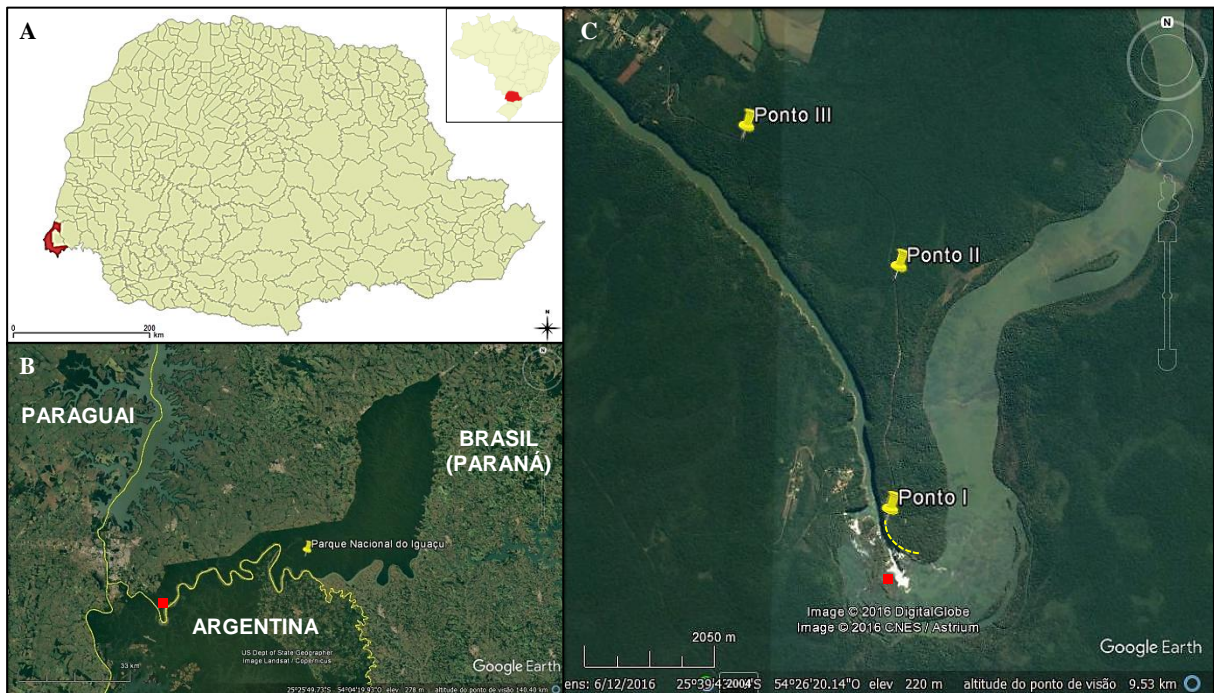


Figura 1. Localização do Parque Nacional do Iguazu (PNI). A) Mapa do estado do Paraná, com destaque ao município de Foz do Iguazu (vermelho); B) Limites do Parque Nacional do Iguazu (área contínua verde no território brasileiro) que compreende 14 municípios paranaenses, com destaque à área turística do parque (ponto vermelho); C) Locais de acesso aos pontos turísticos do PNI: Ponto I – mirantes das cataratas; Ponto II – acesso ao passeio de barco; Ponto III – acesso aos passeios de ecoturismo (de carro, bicicleta ou a pé).

Sua área constitui o maior remanescente de Mata Atlântica do Sul do Brasil, apresentando 185 mil hectares de área verde distribuídos em 14 municípios paranaenses (Fig. 1-B), além de situar o Rio Iguazu e as mundialmente conhecidas Cataratas do Iguazu. A sede do PNI (Fig. 1-C) está localizada no município de Foz do Iguazu, no extremo Oeste do estado do Paraná, fazendo fronteira com o Paraguai e a Argentina (Fig. 1-B). Nessa área do Parque está localizado o acesso turístico às Cataratas do Iguazu (Ponto I, Fig. 1-C), onde concentra-se todo fluxo de visitantes do PNI (FERNANDES; GARCIA, 2011).

O complexo das Cataratas do Iguazu recebe anualmente cerca de um milhão e meio de visitantes de diversas regiões do mundo (ICMBIO, 2016), atraídos pela beleza e pela rica biodiversidade do Parque. Além da visita ao mirante das cataratas e seu entorno (ponto I, Figura 1), os visitantes podem ter acesso ainda a uma trilha de nove quilômetros em meio à floresta

(ponto III, Figura1) que pode ser percorrida de bicicleta ou a pé, e também a outra trilha de três quilômetros (ponto II, Figura 1) que leva ao rio Paraná para o passeio de bote inflável até a queda das cataratas (FERNANDES; GARCIA, 2011).

Em todos os passeios do parque, seja pelas trilhas ou acerca das cataratas, é praticamente inevitável se avistar pelo menos algumas espécies da fauna local. Insetos, anfíbios, répteis e, principalmente, aves e mamíferos, são facilmente visualizados, tornando o passeio ainda mais atrativo. Dentre os mamíferos, onça-pintada, quati, veado, anta, cachorro-do-mato e caititu (Fig. 2) são algumas das espécies mais encontradas pelas trilhas e na rodovia BR-469, estrada que atravessa o PNI. Os quatis (*Nasua nasua*) são, sem dúvida, a espécie que apresenta maior sinantropia no parque, uma vez que frequentam as mesmas áreas que os visitantes em busca de sobras de alimento, inclusive em lanchonetes e restaurantes (MYERS et al., 2000, FERNANDES; GARCIA, 2011).

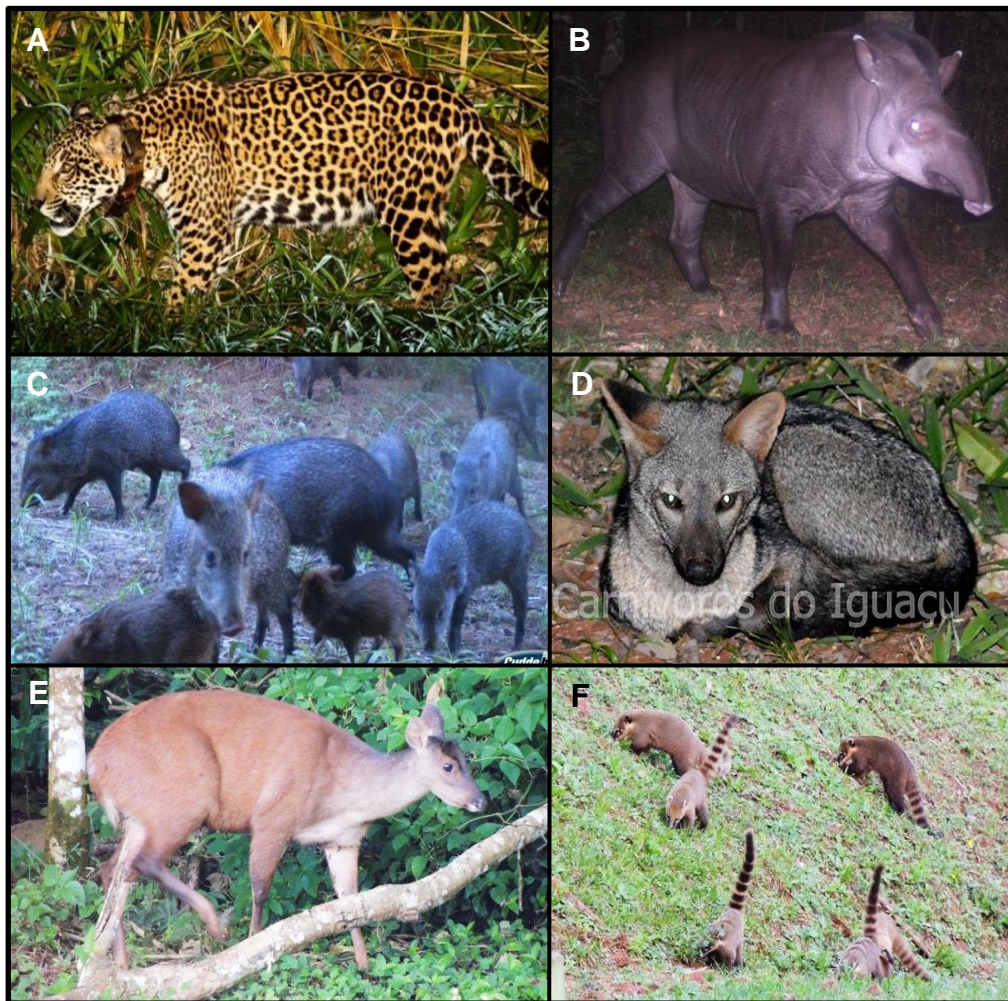


Figura 2. Algumas espécies de mamíferos silvestres do Parque Nacional do Iguazu. A) Onça-pintada (*Panthera onca*); B) Anta (*Tapirus terrestris*); C) Queixada (*Tayassu pecari*); D) Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*); E) Veado-mateiro (*Mazama americana*); F) Quatis (*Nasua nasua*). Fontes: Figs. A – D: Projeto Carnívoros do Iguazu; Fig. E – F: arquivo pessoal.

2.2 *Nasua nasua*: o quati

Nasua nasua, conhecido popularmente como quati ou coati, é um carnívoro de pequeno a médio porte pertencente a Família Procyonidae. Apresenta orelhas pequenas e arredondadas, cabeça triangular, focinho afilado e bastante móvel, membros anteriores mais curtos que os posteriores e cauda longa ornamentada por vários anéis escuros. Apresenta pelagem longa que varia de alaranjada a marrom-escura (Figura 3) (CHEIDA; SANTOS, 2010).



Figura 3. Quatis adultos forrageando na BR-469, interior do PNI. Fonte: Arquivo pessoal.

A distribuição dos quatis vai desde o sul da Colômbia até o sul do Paraguai, estendendo-se também ao norte da Argentina (EISENBERG; REDFORD, 1999). Eles são encontrados em todo o território brasileiro exceto em algumas regiões do Rio Grande do Sul (CHEIDA; SANTOS, 2010). A espécie ocorre em qualquer tipo de vegetação de florestas tropicais e costuma viver em grupos de até vinte animais. Os machos permanecem no bando até os dois ou três anos de idade, quando são então expulsos pelas fêmeas. Esses carnívoros possuem hábitos diurnos e são onívoros, apesar da maior parte de sua alimentação ser a base de frutas (EISENBERG; REDFORD, 1999).

Os quatis podem albergar uma diversidade de agentes parasitários e, devido à alta dispersão dentro de seu território, acabam se tornando também dispersores desses agentes nos habitats silvestres. Esses procionídeos já foram assinalados como hospedeiros de *Leishmania shawi* (LAINSON et al., 1989), *Dirofilaria imcrassata* (VICENTE et al., 1997), *Hepatozoon procyonis* (RODRIGUES et al., 2007), *Trypanosoma evansi* (HERRERA et al., 2004; MAGALHÃES-MATOS et al., 2016), *Trypanosoma cruzi* (HERRERA et al., 2008), *Leishmania panamensis* (LAINSON et al., 2010), *Dirofilaria repens*, *Dirofilaria immitis*, *Achantocheilomena reconditum*, *Mansonella* sp. e *Brugia* sp. (MORAES et al., 2017).

2.3 Ectoparasitismo em quatis

A infestação por ectoparasitos em quatis, assim como ocorre com outras espécies de carnívoros, pode ser considerada um achado comum. Embora escassas, as descrições desses parasitos em quatis demonstram a ocorrência frequente da infestação por carrapatos, além de piolhos e pulgas (LABRUNA et al., 2005; RODRIGUES et al., 2006; GARCIA et al., 2013; ESTEVAM, 2017).

No Brasil, registros prévios da infestação por carrapatos em quatis descrevem o parasitismo por *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma coelebs*, *Amblyomma humerale*, *Amblyomma naponense*, *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma rotundatum*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tigrinum*, *Ixodes loricatus*, *Rhipicephalus microplus* e larvas de *Amblyomma* spp. (ARAGÃO, 1936; BARROS; BAGGIO, 1992; PEREIRA et al., 2000; ARZUA et al., 2005; LABRUNA et al., 2005a; RODRIGUES et al., 2006; GARCIA et al., 2013; ACOSTA et al., 2016; WITTER et al., 2016; ESTEVAM, 2017).

Comparada aos carrapatos, a diversidade de piolhos e pulgas sobre quatis é bem menor. Em relação às pulgas, é registrada infestação apenas por *Ctenocephalides felis felis* e *Rhopalopsyllus lutzi lutzi* em quatis no território brasileiro. De forma semelhante, *Neotrichodectes pallidus* é a única espécie de piolho que tem sido encontrada sobre esses animais (RODRIGUES et al., 2006; ESTEVAM, 2017).

Juntos, carrapatos, piolhos e pulgas são os principais artrópodes que infestam os animais. Esses ectoparasitos apresentam importância não só por causarem espoliação sanguínea e/ou dano epitelial nos hospedeiros, mas também pela capacidade de algumas espécies em transmitir patógenos para os animais, incluindo os seres humanos (TUFF, 1977; LINARDI; GUIMARÃES, 2000; BARROS-BATTESTI et al., 2006). *Borrelia* spp. e *Rickettsia* spp., por exemplo, são bactérias que necessitam de artrópodes para completar seu ciclo de transmissão para outros hospedeiros (CUTLER et al., 2010; PAROLLA et al., 2013).

2.4 Riquétsias patogênicas para seres humanos e outros animais

O gênero *Rickettsia* é formado por bactérias pleomórficas gram-negativas e divide-se em quatro grupos de acordo com padrões antigênicos, morfológicos, moleculares e ecológicos: o Grupo Tifo, que compreende as espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, associadas a piolhos e pulgas, respectivamente; o Grupo da Febre Maculosa, composto por mais de 20 espécies, estando a grande maioria associada a carrapatos; o Grupo *Rickettsia canadenses*, com *R. canadensis* sendo transmitida por carrapatos; e o Grupo *Rickettsia bellii*, constituída por *R. bellii* e outras cepas simbiotes, encontradas em carrapatos (MERHEJ; RAOULT, 2011). No Brasil, as principais espécies responsáveis por causar doença em humanos são *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* (PAROLLA et al., 2013; SZABÓ et al., 2013a).

A Febre Maculosa (FM), também conhecida como febre das montanhas rochosas, é uma enfermidade que tem como agente etiológico *Rickettsia rickettsii*, uma bactéria que parasita o endotélio vascular de seres humanos, animais domésticos e silvestres (SANGIONI, 2010). *R. rickettsii* pode ser transmitida por uma diversidade de espécies de carrapatos como, por exemplo, *Dermacentor variabilis* nos Estados Unidos (CARMICHAEL; FUERST, 2010), *A. aureolatum* e *A. sculptum*, vetores do agente no Brasil (SZABÓ et al., 2013a).

Em humanos, a FM apresenta um quadro clínico inicial semelhante a outras rickettsioses, o que dificulta o diagnóstico preciso. Porém, a doença pode evoluir desenvolvendo febre, mialgia, trombocitopenia, distúrbios renais, gastrointestinais e hemorrágicos, sendo as petéquias e sufusões cutâneas os sintomas mais característicos (ANGERAMI et al., 2006). No Brasil, a FM é considerada uma doença com alta letalidade (SVS/MS, 2010).

No ambiente doméstico, cães e equinos são os principais reservatórios de *R. rickettsii*. Equinos apresentam grande importância epidemiológica, pois também são os principais hospedeiros do vetor *A. sculptum* (LE MOS et al., 1996). Sinais clínicos observados em cães assemelham-se aos descritos em seres humanos, incluindo febre, letargia, anorexia, lesões oculares, trombocitopenia e anemia (PIRANDA et al., 2008).

No início desta década, Spolidorio et al. (2010) descreveram o quadro clínico de uma doença febril aguda em um homem com registro de picada de carrapato em área de mata Atlântica no estado de São Paulo. Além do quadro sistêmico, o paciente desenvolveu uma lesão papular com escaras no local da picada do carrapato. Análises moleculares e filogenéticas demonstraram que a doença foi causada por uma cepa de *Rickettsia* até então desconhecida, detectada em fragmento de pele próximo a lesão. Anos após, Szabó et al. (2013b) isolaram um agente riquetsial de *A. ovale* coletado também no estado de São Paulo, que apresentou 100% de similaridade com *Rickettsia* sp. detectada em humano por Spolidorio et al. (2010). Com base nas evidências moleculares e epidemiológicas, uma vez que ambas as detecções ocorreram em áreas de Mata Atlântica, este agente foi definido por *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. É provável que este agente pertença à espécie *Rickettsia parkeri*, uma vez que a cepa está estritamente relacionada a essa espécie de acordo com as análises filogenéticas (SPOLIDORIO et al., 2010; SZABÓ et al., 2013b). Atualmente acredita-se também que *A. aureolatum* é um possível vetor desse agente no Brasil (BARBIERI et al., 2014).

Em relação aos hospedeiros silvestres, algumas espécies têm apresentado soropositividade para agentes riquetsiais, embora o seu isolamento e detecção molecular sejam difíceis. A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) tem sido considerada o principal sentinela e amplificador da bactéria (SOUZA et al., 2009).

Soropositividade para agentes etiológicos de rickettsioses já foi registrada em procionídeos, como no estudo realizado por Castellaw et al. (2011) nos Estados Unidos, que detectou anticorpos anti-*Rickettsia parkeri* em guaxinins (*Procyon lotor*). Inoue et al. (2011) também detectaram soropositividade, dentre outros agentes, para *Rickettsia japonica* em guaxinins de vida livre no Japão. No Brasil, entretanto, pesquisas sorológicas ou mesmo moleculares em procionídeos ainda são incipientes.

CAPÍTULO I

CARRAPATOS (ACARI: IXODIDAE) E PIOLHOS (PHTHIRAPTERA: TRICHODECTIDAE) INFESTANDO QUATIS (*Nasua nasua* LINNAEUS, 1766) DE VIDA LIVRE COM HÁBITOS SELVAGENS E SINANTRÓPICOS NO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU, ESTADO DO PARANÁ

**Artigo publicado na revista *Systematic & Applied Acarology*
Vol. 22, n. 6, p. 779–784 (2017)
(Anexo I)**

RESUMO

MAGALHÃES-MATOS, Paulo Cesar. **Carrapatos (Acari: Ixodidae) e piolhos (Phthiraptera: Trichodectidae) infestando quatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) de vida livre com hábitos selvagens e sinantrópicos no Parque Nacional do Iguaçu, estado do Paraná.** 2018. 18p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Este trabalho descreve a infestação por carrapatos e piolhos em quatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) de vida livre com hábitos selvagens e sinantrópicos do Parque Nacional do Iguaçu (PNI), estado do Paraná, sul do Brasil. Durante os meses de setembro de 2014 e março-abril de 2015, carrapatos e piolhos foram coletados de 86 coatis de hábitos sinantrópicos no PNI. Dentre os animais analisados, 99% (85/86) encontravam-se infestados por ectoparasitos, sendo observadas larvas de *Amblyomma* spp. (n=23), ninfas de *Amblyomma brasiliense* (n=77), *Amblyomma coelebs* (n=427) e *Haemaphysalis juxtakochi* (n=6), além de adultos de *Amblyomma ovale* (n=46). Piolhos foram encontrados em menor prevalência (13%, 11/86), sendo observadas ninfas (n=31) e adultos (n=9) de *Neotrichodectes pallidus*. Os resultados obtidos demonstram quatis selvagens com hábitos sinantrópicos como hospedeiros competentes para carrapatos ixodídeos e piolhos, artrópodes responsáveis pela transmissão de patógenos para carnívoros, outros animais selvagens e seres humanos. Este trabalho apresenta o primeiro registro de *H. juxtakochi* infestando quatis no Brasil.

Palavras-chave: Procyonidae, carrapatos, piolhos, Mata Atlântica, Parque Nacional do Iguaçu, Brasil.

ABSTRACT

MAGALHÃES-MATOS, Paulo Cesar. **Ticks (Acari: Ixodidae) and lice (Phthiraptera: Trichodectidae) infesting free-living coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with sylvatic and synanthropic habits in the Iguaçu National Park, state of Parana.** 2018. 18p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Sciences, Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

This research describes the infestation by ticks and lice in free-living coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with synanthropic habits living at the Iguaçu National Park (INP), state of Parana, southern Brazil. During the months of September 2014 and from March to April 2015, ticks and lice were collected from 86 free-living coatis with synanthropic habits from INP. Among the animals analyzed, 99% (85/86) were infested with ectoparasites, *Amblyomma* spp. larvae (n=23), nymphs of *Amblyomma brasiliense* (n=77), *Amblyomma coelebs* (n=427) and *Haemaphysalis juxtakochi* (n=6) being observed, as well as *Amblyomma ovale* adults (n=46). Lice were found in lower prevalence (13%, 11/86), nymphs (n=31) and adults (n=9) of *Neotrichodectes pallidus*. Summary results show feral coatis with synanthropic habits as competent hosts for ixodid ticks and lice, arthropods responsible for the transmission of pathogens for carnivores, others wildlife and humans. This paper presents the first record of *H. juxtakochi* infesting coatis in Brazil.

Keywords: Procyonidae, ticks, lice, Atlantic forest, Iguaçu National Park, Brazil.

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos, piolhos e as pulgas são considerados os principais artrópodes que infestam os animais. Esses ectoparasitos apresentam importância não só por poder causar espoliação sanguínea e/ou dano epitelial nos hospedeiros, mas também pela capacidade de algumas espécies em transmitir patógenos para os animais, incluindo o ser humano (TUFF, 1977; LINARDI; GUIMARÃES, 2000; BARROS-BATTESTI et al., 2006). Animais silvestres apresentam uma considerável diversidade de espécies de ectoparasitos (BARROS-BATTESTI et al., 2006), embora pouco se conheça sobre a ecoepidemiologia dessas infestações nas diferentes regiões do Brasil.

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) é uma das maiores áreas de conservação da Mata Atlântica, que compreende uma extensão de 185 mil hectares e abriga as Cataratas do Iguaçu (FERNANDES; GARCIA, 2011), recebendo anualmente mais de 1,5 milhão de visitantes de diversas regiões do mundo (ICMBIO, 2016). O PNI apresenta abundante riqueza faunística, merecendo destaque mamíferos como onça-pintada, anta, quati, veado, cutia e caititu, dentre outras espécies. Os quatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) são carnívoros da família Procyonidae que estão amplamente distribuídos na América do Sul, sendo uma das espécies que apresentam maior sinantropia nas áreas de visitação do PNI, especialmente próximo ao mirante das cataratas (CÁCERES, 2011).

O conhecimento sobre a dinâmica da infestação por ectoparasitos em quatis é fundamental, uma vez que estabelece o papel da espécie como hospedeira de diferentes ectoparasitos, inclusive aqueles transmissores de patógenos para outros animais e seres humanos que frequentam os mesmos *habitats* (SPOLIDORIO et al., 2010; SZABÓ et al., 2013; SOARES et al., 2015). Assim, o objetivo deste estudo foi descrever a infestação por carrapatos e piolhos em quatis de hábitos selvagens e sinantrópicos nas áreas de visitação do PNI, estado do Paraná, sul do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos e legais da pesquisa científica

Esta pesquisa foi realizada após aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (nº 058/2014 CEUA-IV/UFRRJ) (Anexo II). A captura dos animais, a coleta a campo e o transporte de amostras biológicas foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob o nº 43614-3 (Anexo III).

2.2 Critérios de inclusão e amostragem

Os critérios de inclusão utilizados neste trabalho foram (1) a avaliação de quatis selvagens sub-adultos e adultos que apresentassem hábitos selvagens e sinantrópicos em (2) locais com fluxo intenso de visitantes no PNI. Partindo desses critérios, foram escolhidos três pontos de coleta no interior do PNI (Fig. 4.3).

O número amostral necessário para esta pesquisa foi calculado de acordo com a prevalência esperada (MEDRONHO, 2009), obtido através da fórmula de amostragem aleatória simples, representada a seguir:

$$n = \frac{[z_{(\alpha/2)}]^2 \pi (1 - \pi)}{\varepsilon^2}$$

Onde:

n = Número amostral

$z_{(\alpha/2)}$ = Valor-z de nível α (para intervalo de confiança de 95%: 1,96)

π = Prevalência esperada (com base na literatura: 0,631)

ε = Erro esperado (0,05)

Baseando-se na prevalência para ninfas de carrapatos obtidas de quatis em Juiz de Fora, Minas Gerais (RODRIGUES et al., 2006), obteve-se um valor amostral de 358 animais. Contudo, sabendo-se que a população de quatis sinantrópicos no PNI é bem menor que o valor exigido, foi realizado um cálculo de redução para populações finitas. O valor foi obtido a partir da seguinte equação:

$$n' = \frac{n}{1 + \frac{n}{N}}$$

Onde:

n' = Número amostral ajustado;

n = População real (≈ 100);

N = Número amostral exigido (n = 358).

O valor da população real de quatis sinantrópicos foi obtido segundo estimativa informada pelos funcionários do Parque. Após o ajuste no valor amostral, obteve-se um **n** mínimo de 78 animais.

2.3 Área de estudo e origem dos animais

Os animais analisados nesta pesquisa foram amostrados das áreas de visitação turística do PNI, no município de Foz do Iguaçu, localizado na mesorregião Oeste do estado do Paraná. As áreas amostradas compreendem os mirantes das cataratas (ponto I - 25°41'03"S, 54°26'24"W, com uma extensão total de aproximada de 1,2 Km) e o acesso a duas trilhas no interior da floresta (ponto II - 25°39'05"S, 54°26'16"W e ponto III - 25°37'36"S, 54°27'39"W) (Figura 4).

Os quatis sub-adultos e adultos foram amostrados a medida que eram avistados nesses pontos, sendo realizada assim uma amostragem não-probabilística acidental. Além dos pontos de captura, também foram examinados quatis acidentalmente atropelados na rodovia BR-469 no interior do parque, logo após que eram recolhidos pelos funcionários do Projeto Carnívoros do Iguaçu. No interior do PNI, essa rodovia interliga a entrada principal à área do mirante das cataratas, tendo extensão aproximada 10,6 Km e interligando os três pontos de coleta.

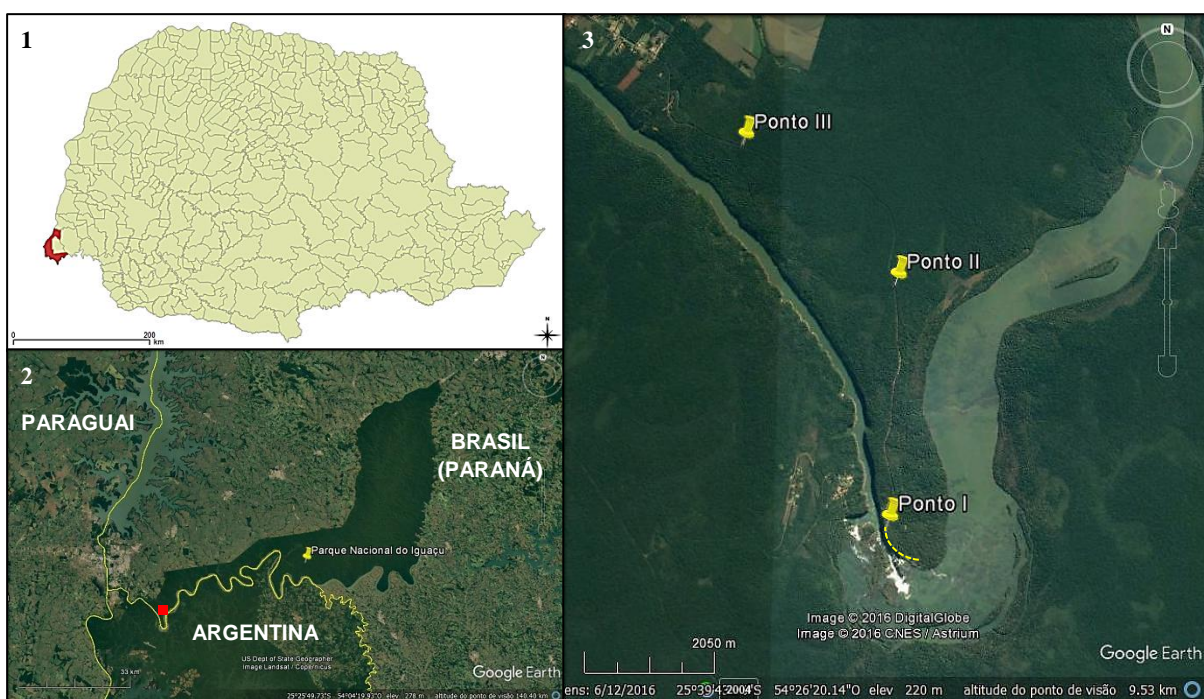


Figura 4. Local de captura dos animais avaliados. 4.1) Mapa do estado do Paraná, com destaque ao município de Foz do Iguaçu (vermelho); 4.2) Limites do Parque Nacional do Iguaçu (área contínua verde no território brasileiro) com destaque à área turística do parque, onde foram realizadas as coletas (ponto vermelho); 4.3) Pontos de amostragem dos quatis nas áreas turísticas do parque.

O ponto I consiste no entorno do mirante das cataratas e de um hotel no interior do parque, enquanto que os pontos II e III são os acessos a duas trilhas em meio à floresta, que eram avaliados até um raio de 100 metros ao longo da rodovia e das trilhas.

As capturas dos quatis foram realizadas durante o mês de setembro de 2014 e entre os meses de março e abril de 2015, totalizando um esforço amostral de 42 dias de coleta realizadas nos períodos matutino e vespertino (das 9:00 as 16:00 horas).

2.4. Captura e contenção dos animais

Os trajetos definidos eram executados até se avistar um bando de quatis, fazendo-se então a atração do bando com iscas de banana, abacaxi ou pasta de amendoim. A captura ativa foi feita com auxílio de puçá (nylon multifilamento, 60 x 120cm), sendo então realizada a contenção com o auxílio dos pés e manualmente com luvas de couro, pra evitar que o animal se debatesse na rede do puçá. Além da busca ativa, armadilhas modelo tomahawk (90x45x50cm e 50x21,5x20 cm) foram instaladas durante todo o dia, uma por ponto de coleta, sendo conferidas ao final de cada manhã e tarde.

Os quatis foram contidos quimicamente recebendo uma pré-anestesia de Atropina 1% (Sulfato de Atropina[®], UCB, 1mg/Kg SC) e Xilazina 2% (Anasedan[®], Cespo, 2mg/Kg IM) (exceto fêmeas gestantes), sendo anestesiados com uma associação de Tiletamina + Zolazepan (Zoletil[®] 50, Virbac, 7mg/mL, IM).

Durante o plano anestésico, os animais eram monitorados quantos aos seus parâmetros vitais (frequência cardíaca, frequência respiratória e temperatura retal), sendo registrados em uma ficha epidemiológica (Anexo IV). Dados biológicos (sexo, biometria, idade estimada, fase reprodutiva), sanitários (manifestação de sinais clínicos, presença de lesões, infestação por ectoparasitos), comportamentais (invasão de lixeiras, hábito gregário/solitário) e outros dados relevantes também foram registrados nessa ficha.

Os quatis capturados foram identificados com brincos numerados para se evitar a recaptura. Após recuperação completa da anestesia, os animais foram reintroduzidos aos respectivos *habitats* de origem.

2.5 Pesquisa e identificação dos ectoparasitos

Carrapatos e piolhos foram pesquisados em toda a superfície corporal dos quatis. Os carrapatos foram removidos manualmente através de movimentos circulares em sentido horário para evitar a danificação das estruturas do aparelho bucal, importantes para a identificação morfológica. Os piolhos foram removidos manualmente ou com auxílio de pente fino. Após a coleta de todos os carrapatos e piolhos encontrados, as amostras foram identificadas por hospedeiro, armazenadas em RNAlater[®] e encaminhadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias (UFRRJ) para identificação.

A identificação taxonômica dos carrapatos foi realizada em microscópio estereoscópio (Olympus[®] SZX16, programa cellSens 1.12) com base nos aspectos morfológicos, de acordo com Barros-Battesti et al. (2006) para adultos, Cooley (1946) e Kohls (1960) para ninfas de *Haemaphysalis* e Martins et al. (2010) para ninfas de *Amblyomma*. Larvas de carrapatos foram classificadas apenas em nível de gênero por não haver literatura para identificação específica no Brasil.

Os piolhos foram clarificados em Hidróxido de Potássio 10% (KOH) e identificados pela morfologia em microscópio óptico (Olympus BX45[®]) com base em Tuff (1977) e comparados com a descrição de Werneck (1936).

Após identificadas, as espécies de carrapato e piolho foram depositadas na Coleção de Artrópodes Vetores Ápteros de Importância na Saúde das Comunidades do Instituto Oswaldo Cruz (CAVAISC – FIOcruz), na cidade do Rio de Janeiro. Outros ectoparasitos como pulgas e ácaros não foram considerados para este estudo.

2.6. Determinação dos índices de ecologia parasitária

Para esta pesquisa foram determinadas a prevalência, a intensidade média e a abundância parasitária da infestação por carrapatos, piolhos e por ambos. Os parâmetros de ecologia parasitária analisados foram calculados e expressos segundo Bush et al. (1997).

3 RESULTADOS

Durante as coletas foram obtidas amostras de 86 quatis do PNI, sendo 84 oriundos de captura e dois atropelados. Um total de 619 ectoparasitos foi coletado desses animais, compreendendo 579 carrapatos e 40 piolhos.

Dentre os carrapatos, que infestaram 99% (85/86) dos quatis, foram obtidas amostras de larvas de *Amblyomma* spp., ninfas de *Haemaphysalis juxtakochi* (Figs. 5.1 e 5.2), *Amblyomma brasiliense* (Fig. 5.3 e 5.4) e *Amblyomma coelebs* (Fig. 5.5 e 5.6), bem como adultos de *Amblyomma ovale* (Figs. 5.7 a 5.10; Figs. 7.2 e 7.4). Em relação aos piolhos (Fig. 6), amostras de ninfas e adultos de *Neotrichodectes pallidus* foram coletadas de 13% (11/86) dos quatis. A diversidade de espécies, estágios de desenvolvimento, números absolutos de parasitos e os índices de ecologia parasitária são apresentados na Tabela 1. Amostras dos ectoparasitos foram depositadas na coleção sob os números CAVAIISC-IXO 2424, 2425, 2426, 2427, 2428 e 2429 para carrapatos e CAVAIISC-PHT 190 e 191 para piolhos.

Tabela 1. Ectoparasitos e índices de ecologia parasitária obtidos de quatis de vida livre do Parque Nacional, Paraná, Brasil.

| Táxon | Estágio | Número de parasitos | Prevalência (+/t) | Intensidade média ± DP | Abundância média ± DP |
|---------------------------------|--------------------|------------------------|-------------------|------------------------|-----------------------|
| Ixodidae | | | | | |
| <i>Amblyomma</i> sp. | Larvas | 23 | 14% (12/86) | 1,9±1,3 | 0,3±0,8 |
| <i>Amblyomma brasiliense</i> | Ninfas | 77 | 45% (39/86) | 2,0±1,0 | 0,9±1,2 |
| <i>Amblyomma coelebs</i> | Ninfas | 427 | 96% (83/86) | 5,1±4,5 | 5,0±4,5 |
| <i>Haemaphysalis juxtakochi</i> | Ninfas | 6 | 6% (5/86) | 1,2±0,4 | 0,1±0,3 |
| <i>Amblyomma ovale</i> | Adultos | 46 (22♂, 24♀) | 23% (20/86) | 2,3±2,5 | 0,5±1,5 |
| Phthiraptera | | | | | |
| <i>Neotrichodectes pallidus</i> | Ninfas, Adultos | 40 (31n, 6♂, 3♀) | 13% (11/86) | 3,6±2,6 | 0,5±1,5 |
| Total | | 619 | 99% (85/86) | 7,3±6,1 | 7,2±6,1 |

+/t: animais infestados/total. DP: desvio padrão.

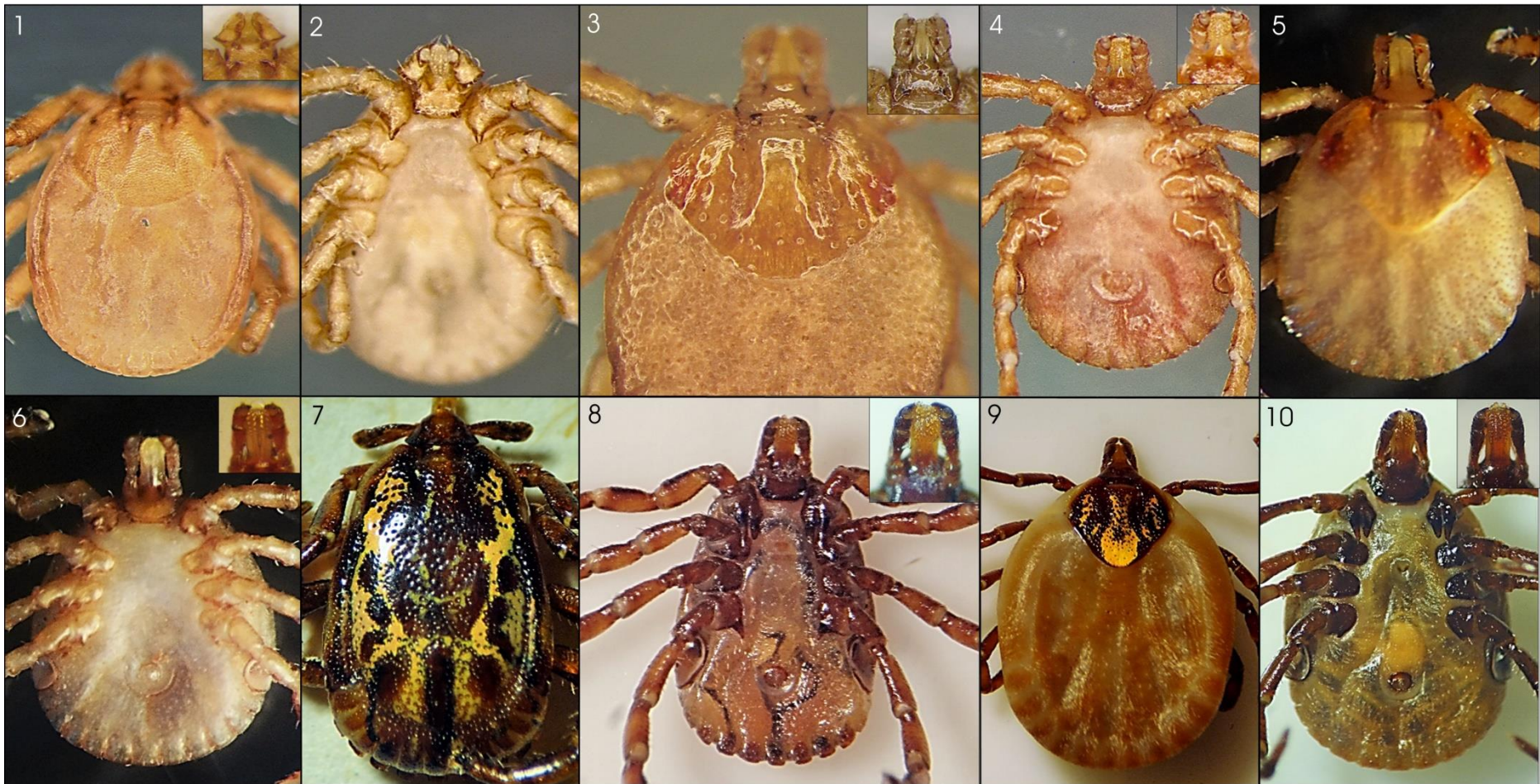


Figura 5: Ixodídeos que infestam quatis no Parque Nacional do Iguaçu. 5.1) vistas dorsal e 5.2) ventral de ninfa de *Haemaphysalis juxtakochi*; 5.3) vistas dorsal e 5.4) ventral de ninfa de *Amblyomma brasiliense*; 5.5) vistas dorsal e 5.6) ventral de ninfa de *Amblyomma coelebs*; *Amblyomma ovale* adultos: **macho**, vistas 5.7) dorsal e 5.8) ventral; **fêmea**, vistas 5.9) dorsal e 5.10) ventral. Fonte: Arquivo pessoal.

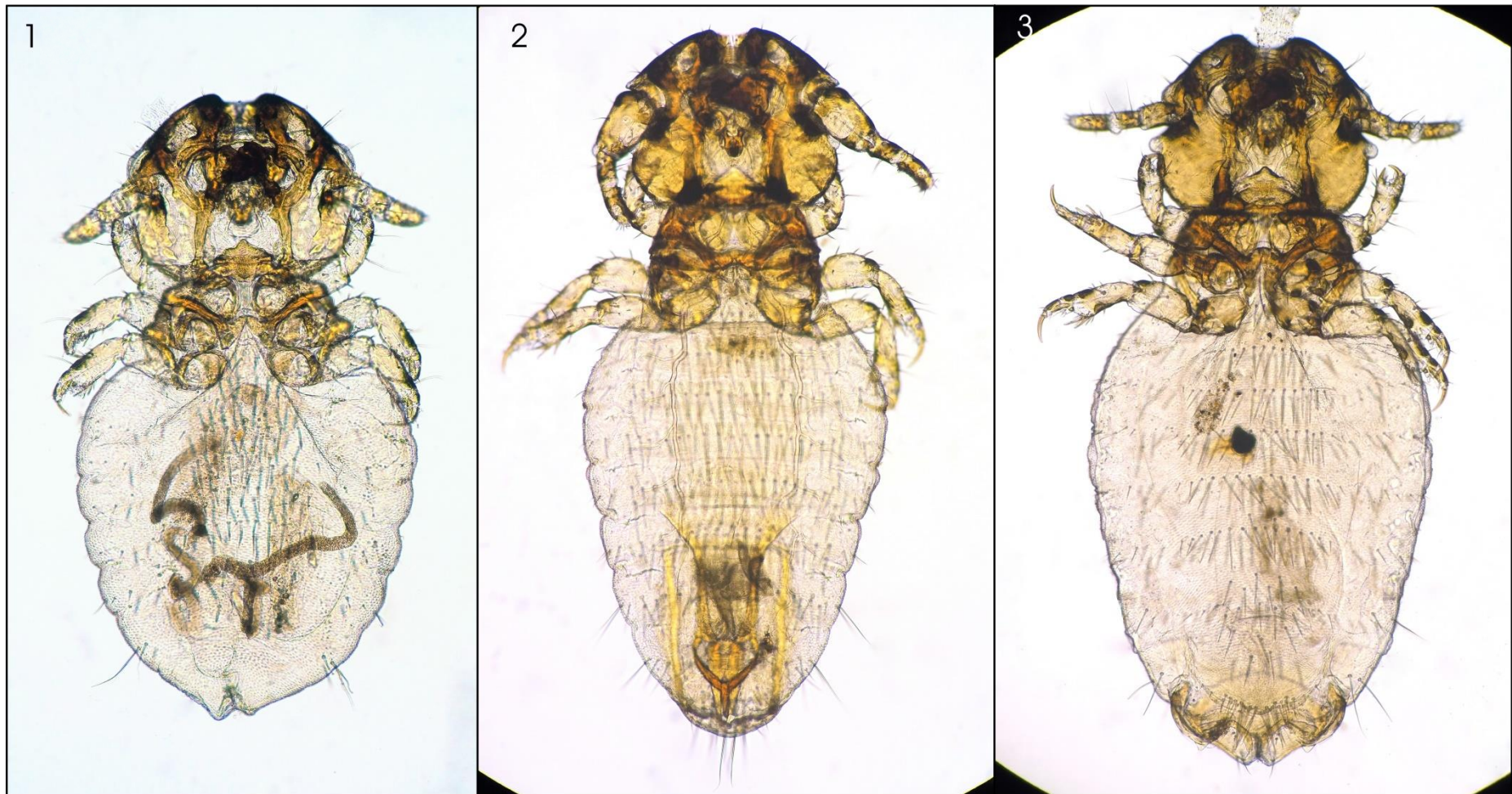


Figura 6: Piolhos que infestam quatis no Parque Nacional do Iguaçu. 6.1) ninfa e adultos 6.2) macho e 6.3) fêmea de *Neotrichodectes pallidus*. Aumento de 1000X. Fonte: Arquivo pessoal.

Os carrapatos infestavam principalmente as regiões ventrais abdominal e torácica, comissura labial, região ventral do pescoço e espaço interdigital. A infestação por piolhos foi observada principalmente no tronco (dorsal e ventral) e na cauda (Fig. 7).



Figura 7. Infestação por carrapatos e piolhos em quatis do Parque Nacional do Iguaçu. 7.1) Ninfas de carrapatos na região abdominal, próximo a um mamilo; 7.2) Fêmeas de *Amblyomma ovale* infestando a região torácica ventral, entre os membros anteriores; 7.3) Ninfas de carrapatos infestando a comissura labial; 7.4) Fêmea de *A. ovale* na região ventral do pescoço; 7.5) Ninfas de carrapato no espaço interdigital do membro posterior direito; 7.6) Piolhos adultos infestando a região inguinal de um quati adulto. Fonte: Arquivo pessoal.

4 DISCUSSÃO

Os quatis analisados apresentaram altas prevalência (99%) e abundância (7.2) de infestação por ectoparasitos, representados principalmente por carrapatos, que corresponderam a 93% do total de ectoparasitos obtidos. A espécie de carrapato mais abundante e a que também infestou a maioria dos animais foi *Amblyomma coelebs* Neumann, 1899, sugerindo que os quatis apresentam uma importância para a ecologia desta espécie de carrapato no PNI.

No Brasil, registros prévios da infestação por carrapatos em quatis descrevem o parasitismo por *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772), *Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908, *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787, *Amblyomma coelebs* Neumann, 1899, *Amblyomma humerale* Koch, 1844, *Amblyomma naponense* (Packhard, 1869), *Amblyomma nodosum* Neumann, 1899, *Amblyomma oblongoguttatum* Koch, 1844, *Amblyomma ovale* Koch, 1844, *Amblyomma parvum* Aragão, 1908, *Amblyomma rotundatum* Koch, 1844, *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844, *Ixodes loricatus* Neumann, 1899, *Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1887 e larvas de *Amblyomma* spp. (ARAGÃO, 1936; BARROS; BAGGIO, 1992; PEREIRA et al., 2000; ARZUA et al., 2005; LABRUNA et al., 2005a; RODRIGUES et al., 2006; GARCIA et al., 2013; ACOSTA et al., 2016; WITTER et al., 2016; ESTEVAM, 2017).

É importante destacar a ocorrência de *A. ovale* infestando quatis no PNI, espécie de carrapato cuja forma adulta infesta comumente carnívoros (LABRUNA et al. 2005a) e é vetor de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma riquetsiose recentemente descrita com importância para humanos (SZABÓ et al. 2013). Ressalta-se também que existe uma espécie de protozoário que infecta procionídeos, *Hepatozoon procyonis*, cujo vetor ainda é desconhecido (CLARK et al. 1973, MASSARD; MASSARD, 1978, RODRIGUES et al. 2007). Deve ser investigado se *A. ovale* possui papel vetorial para esse agente, uma vez que essa espécie de carrapato já é vetor conhecido de *Hepatozoon canis* para cães domésticos (FORLANO et al. 2005), podendo também ter importância para quatis. Este trabalho também registra a infestação por *Haemaphysalis juxtakochi* Cooley, 1946, espécie da qual LABRUNA et al. (2005b) isolaram a bactéria *Rickettsia rhipicephali* Burgdorfer et al., 1978 no estado de Rondônia, na Amazônia brasileira.

Amblyomma coelebs, *A. brasiliense* Aragão, 1908 e *A. ovale* foram recentemente registrados infestando quatis do Parque Nacional del Iguazú, em Puerto Iguazú, Argentina (LAMATTINA et al. 2014). Embora esta área seja fisicamente separada do PNI pelo rio Iguazú, similaridades entre a fauna de ectoparasitos de ambas as áreas pôde ser observada. Isto pode ser explicado pela similaridade entre as condições climáticas e ambientais de ambos os parques, como temperatura, umidade, pluviosidade, bem como pela co-ocorrência de espécies hospedeiras das formas adultas desses carrapatos, que são antas (*Tapirus terrestris* Linnaeus, 1758), porcos-do-mato (caititu *Pecari tajacu* Linnaeus, 1758 e queixada *Tayassu pecari* Link, 1795) e carnívoros, respectivamente (BARROS-BATTESTI et al. 2006).

Diferente do que foi reportado na Argentina por Lamattina et al. (2014), no presente estudo foi observada infestação por ninfas de *H. juxtakochi*, uma espécie cujos adultos infestam mamíferos da família Cervidae (BARROS-BATTESTI et al. 2006), tal como *Mazama americana* Erxleben, 1777 (JONES et al. 1972) e *Mazama nana* Hensel, 1872 (MARTINS et al. 2007). Formas imaturas de *H. juxtakochi* parasitam aves como *Pyrrhocomma ruficeps* Strickland, 1844 (ARZUA et al. 2005) e *Harpia harpyja* Linnaeus, 1758 (LABRUNA et al. 2010), podendo infestar também mamíferos como roedores, primatas, antas e porcos-do-mato (JONES et al. 1972). Embora ninfas de *H. juxtakochi* tenham sido registradas parasitando quatis

no Panamá (FAIRCHILD et al. 1966), este é o primeiro registro da espécie infestando quatis no Brasil.

Em menor prevalência e abundância (13%; 0.47) foi observada a infestação por piolhos *Neotrichodectes pallidus* (Piaget, 1880), diferente do que foi registrado por Rodrigues et al. (2006). Este estudo foi realizado com quatis de uma área urbana de Mata Atlântica na cidade de Juiz de Fora, estado de Minas Gerais, no sudeste do Brasil, sendo que *N. pallidus* foi observado em 52.6% (10/19) dos animais e em maior abundância (3.21) que a observada no presente trabalho. Esses dados sugerem que os quatis analisados na Mata Atlântica de Juiz de Fora apresentam um papel epidemiológico mais importante para a manutenção de piolhos que os quatis do PNI que, por sua vez, têm sido mais importantes como hospedeiros de carrapatos do gênero *Amblyomma*, devido sua maior prevalência, intensidade e abundância parasitárias.

5 CONCLUSÃO

Quatis selvagens de hábitos sinantrópicos nas áreas turísticas do PNI são altamente infestados por carrapatos e piolhos, principalmente por carrapatos *A. coelebs*, agindo também como hospedeiros e dispersores de carrapatos vetores de patógenos, como *A. ovale* e *H. juxtakochi*.

Registra-se pela primeira vez a infestação por *H. juxtakochi* em quatis no Brasil.

6 REFERÊNCIAS

- ACOSTA, I.C.L., MARTINS, T.F., MARCILI, A., SOARES, H.S., KRAWCZAK, F.S., VIEIRA, F.T., LABRUNA, M.B. Ticks (Acari: Ixodidae, Argasidae) from humans, domestic and wild animals in the state of Espírito Santo, Brazil, with notes on rickettsial infection. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 3–4, p. 66–69, 2016.
- ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759–843, 1936.
- ARZUA, M., ONOFRIO, V.C., BARROS-BATTESTI, D.M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de Historia Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 623–632, 2005.
- BARROS, D.M., BAGGIO, D. Ectoparasites Ixodida Leach, 1817 on wild mammals in the State of Paraná, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p. 291–296, 1992.
- BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, B.H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 223 p., 2006.
- BUSH, A.O., LAFFERTY, K.D., LOTZ, J.M., SHOSTAK, A.W. Parasitology meets ecology: on its own terms: Margolis et al. revisited. **Journal of Parasitology**, v. 83, p. 575–583, 1997.
- CÁCERES, N.C. Mamíferos. In: FERNANDES, C.R., GARCIA, H. (eds.) **Parque Nacional do Iguaçu: Patrimônio natural da humanidade**. São Paulo, Iphis Gráfica e Editora, p. 198–215, 2011.
- CLARK, K.A., ROBINSON, R.M., WEISHUHN, L.L. *Hepatozoon procyonis* infections in Texas. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 9, p. 182–193, 1973.
- COOLEY, R.A. **The genera *Boophilus*, *Rhipicephalus*, and *Haemaphysalis* (Ixodidae) of the new world**. Washington, Government Printing Office, 54 p., 1946.
- ESTEVAM, L.G.T.M. **Avaliação de hemoparasitos e ectoparasitos em quatis (*Procyonidae: Nasua nasua*) no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais**. 2017. 68f. Dissertação (mestrado em Parasitologia), Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- FAIRCHILD, G.B., KOHLS, G.M., TIPTON, V.J. The ticks of Panamá (Acarina: Ixodoidea). In: WENZEL, R.L., TIPTON, V.J. (eds). **Ectoparasites of Panama**. Chicago, Field Museum of Natural History, p. 167–219, 1966.
- FERNANDES, C.R., GARCIA, H. (eds.) **Parque Nacional do Iguaçu: Patrimônio natural da humanidade**. São Paulo, Iphis Gráfica e Editora, 256 p., 2011.
- FORLANO, M., SCOFIELD, A., ELISEI, C., FERNANDES, K.R., EWIN, S.A., MASSARD, C.L. Diagnosis of *Hepatozoon* spp. in *Amblyomma ovale* and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 1–7, 2005.
- GARCIA, M.V., SILVA, D.C., ALMEIDA, R.F.C., CUNHA, R.C., MATIAS, J., BARROS, J.C., ANDREOTTI, R., SZABÓ, M.J.P. Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in

Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 124-128, 2013.

ICMBIO (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade). **Dados de visitação (2007–2016), Ranking de visitantes 2012–2016**. Disponível em http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/comunicacao/noticias/2017/dados_de_visitacao_2012_2016.pdf (acesso 21 Dez. 2017), 2016.

JONES, E.K., CLIFFORD, C.M., KEIRANS, J.E., KOHLS, G.M. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the western hemisphere. **Provo, Brigham Young University Science Bulletin**, 40 p., 1972.

KOHL, G.M. Records and new synonymy of new world *Haemaphysalis* ticks, with descriptions of the nymph and larva of *H. juxtakochi* Cooley. **Journal of Parasitology**, v. 46, n. 355–361, 1960.

LABRUNA, M.B., JORGE, R.S.P., SANA, D.A., JÁCOMO, A.T.A., KASHIVAKURA, C.K., FURTADO, M.M., FERRO, C., PEREZ, S.A., SILVEIRA, L., SANTOS JR., T.S., MARQUES, S.R., MORATO, R.G., NAVA, A., ADANIA, C.H., TEIXEIRA, R.H.F, GOMES, A.A.B, CONFORTI, V.A., AZEVEDO, F.C.C., PRADA, C.S., SILVA, J.C.R., BATISTA, A.F., MARVULO, M.F.V, MORATO, R.L.G., ALHO, C.J.R, PINTER, A., FERREIRA, P.M., FERREIRA, F., BARROS-BATTESTI, D.M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, p. 149–163, 2005a.

LABRUNA, M.B., CAMARGO, L.M.A., CAMARGO, E.P., WALKER, D.H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 169– 174, 2005b.

LABRUNA, M.B., BARBIERI, F.S., MARTINS, T.F., BRITO, L.G., RIBEIRO, F.D.S. New tick records in Rondônia, Western Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, p. 192–194, 2010.

LAMATTINA, D., TARRAGONA, E.L., COSTA, S.A., GUGLIELMONE, A., NAVA, S. Ticks (Acari: Ixodidae) of northern Misiones Province, Argentina. **Systematic and Applied Acarology**, v. 19, p. 393–398, 2014.

LINARDI, P.M., GUIMARÃES, L.R. **Sifonápteros do Brasil**. São Paulo, Museu de Zoologia USP/FAPESP, 291 p., 2000.

MARTINS, J.R., SALOMÃO, E.L., DOYLE, R.L., ONOFRIO, V.C., BARROS-BATTESTI, D.M., GUGLIELMONE, A.A. *Haemaphysalis juxtakochi* Cooley, 1946 (Acari: Ixodidae) parasitando *Mazama nana* (Hensel, 1872) (Artiodactyla: Cervidae) no Estado do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 16, n. 171–173, 2007.

MARTINS, T.F., ONOFRIO, V.C., BARROS-BATTESTI, D.M., LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 1, n. 75–99, 2010.

MASSARD, C.A., MASSARD C.L. *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protozoa: Haemogregarinidae) em *Procyon cancrivorus* (Goldman) no estado do Rio de Janeiro. **Anais Congresso Brasileiro da Sociedade de Medicina Tropical, III Edição da Sociedade Brasileira de Parasitologia**, p. 401. 1978.

MEDRONHO, R., BLOCH, K.V., LUIZ, R.R., WERNECK, G.L. (eds.) **Epidemiologia**. São Paulo, Atheneu, 2ª ed, 790 p., 2009.

PEREIRA, M.C., SZABÓ, M.P.J., BECHARA, G.H., MATUSHIMA, E.R., DUARTE, J.M.B., RECHAV, Y., FIELDEN, L., KEIRANS, J.E. Ticks on wild animals from the Pantanal region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 979–983, 2000.

RODRIGUES, A.F.S.F., DAEMON, E. & MASSARD, C.L. Ectoparasites of *Nasua nasua* (Carnivora, Procyonidae) from an urban Forest in Southeastern Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, 58, 969–97, 2006.

RODRIGUES, A.F.S.F., DAEMON, E., MASSARD, C. L. Morphological and morphometrical characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procionid *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). **Parasitology Research**, v. 100, p. 347-350, 2007.

SZABÓ, M.P.J., NIERI-BASTOS, F.A., SPOLIDORIO, M.G., MARTINS, T.F., BARBIERI, A.M., LABRUNA, M.B. *In vitro* isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, p. 719–728, 2013.

TUFF, D.W. A key to lice of man and domestic animals. **Texas Journal of Science**, v. 28, p. 145–159, 1977.

WITTER, R., MARTINS, T.F., CAMPOS, A.K., MELO, A.L.T, CORRÊA, S.H.R., MORGADO, T.O., WOLF, R.W., MAY-JÚNIOR, J.A., SINKOC, A.L., STRÜSSMANN, C., AGUIAR, D.M., ROSSI, R.V., SEMEDO, T.B.F., CAMPOS, Z., DESBIEZ, A.L.J., LABRUNA, M.B., PACHECO, R.C. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) of wild animals in midwestern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 415–423, 2016.

WERNECK, F.L. Contribuição ao conhecimento dos Mallophagos de mamíferos sul-americanos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 391–589, 1936.

CAPÍTULO II

QUATIS (*Nasua nasua* LINNAEUS, 1766) (CARNIVORA: PROCYONIDAE) E CARRAPATOS (ACARI: IXODIDAE) COMO HOSPEDEIROS DE *Rickettsia* spp. NO PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU, ESTADO DO PARANÁ, SUL DO BRASIL

RESUMO

MAGALHÃES-MATOS, Paulo Cesar. **Quatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) (Carnivora: Procyonidae) e carrapatos (Acari: Ixodidae) como hospedeiros de *Rickettsia* spp. no Parque Nacional do Iguaçu, estado do Paraná, sul do Brasil.** 2018. 24p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Ciências Veterinárias). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Animais silvestres apresentam considerável importância na ecologia de agentes infecciosos, uma vez que podem funcionar como seus hospedeiros ou mesmo de possíveis vetores. O presente trabalho teve por objetivo realizar a detecção molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos oriundos de quatis e em pele de quatis selvagens e sinantrópicos do Parque Nacional do Iguaçu (PNI), estado do Paraná. Este trabalho foi realizado sobre um total de 566 carrapatos descritos por Magalhães-Matos et al. (2017), compreendendo larvas de *Amblyomma* spp., ninfas de *Haemaphysalis juxtakochi*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma coelebs* e adultos de *A. ovale*. Além disso foram obtidas também amostras de peles de quatis do PNI. A extração de DNA dos carrapatos foi realizada individualmente através do método de fenol-clorofórmio, enquanto que as amostras de pele foram extraídas com um kit comercial. A triagem das amostras pela PCR foi realizada através da amplificação de fragmentos dos genes *htrA* e *gltA*. Amostras positivas para ambos os alvos foram também testadas para os genes *ompA* e *ompB*. O fragmento de cada amostra positiva foi sequenciado para os genes *gltA*, *ompA* e *ompB* em ambas as direções e submetidos a pesquisa de homologia no Genbank. Amostras de *A. brasiliense* (3%, 2/75), *A. coelebs* (2,14%, 9/420), *A. ovale* (13%, 6/45) e pele de quati (1%, 1/75) amplificaram DNA de *Rickettsia* spp. Através do sequenciamento, observou-se identidade com *Rickettsia bellii* em *A. ovale* e *Rickettsia amblyommatis* em *A. coelebs*, enquanto que na amostra de pele foi detectado *Rickettsia rhipicephali*. Quatis de hábitos selvagens e sinantrópicos que habitam o PNI, bem como seus carrapatos, são infectados por *Rickettsia* spp.

Palavras-chave: Procyonidae, carrapatos, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia amblyommatis*, Mata Atlântica.

ABSTRACT

MAGALHÃES-MATOS, Paulo Cesar. **Coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) (Carnivora: Procyonidae) and ticks (Acari: Ixodidae) as host of *Rickettsia* spp. in the Iguaçu National Park, state of Paraná, southern Brazil.** 2018. 24p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Sciences, Veterinary Sciences). Instituto de Veterinária, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2018.

Wild animals are of considerable importance in the ecology of infectious agents, since they can function as their hosts or even their vectors. We aim to perform the molecular detection of *Rickettsia* spp. in ticks and skin from coatis of sylvatic and synanthropic habits of the Iguaçu National Park (PNI), state of Parana. This survey was carried out on a total of 566 ticks described by Magalhães-Matos et al. (2017), comprising larvae of *Amblyomma* spp., nymphs of *Haemaphysalis juxtakochi*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma coelebs*, and adults of *Amblyomma ovale*. DNA extraction from ticks was performed individually using the phenol-chloroform method, while the skin sample was extracted with a commercial kit. Screening of samples by PCR was performed by the analysis of fragments of *htrA* and *gltA* genes. Positive samples for both fragments were also tested for the *ompA* and *ompB* genes. The fragment from each positive sample of tick was sequenced to *gltA*, *ompA* e *ompB* in both directions and subjected to homology screening at Genbank. Samples of *A. brasiliense* (3%, 2/75), *A. coelebs* (2.14%, 9/420), *A. ovale* (13%, 6/45) and coati skin (1%, 1/75) amplified *Rickettsia* spp. DNA. Through sequencing, it was observed that *A. ovale* were infected by *Rickettsia bellii* and *A. coelebs* by *Rickettsia amblyommatis*, while skin samples amplified *Rickettsia rhipicephalis* DNA. Coatis of sylvatic and synanthropic habits as well as their ticks are infected by *Rickettsia* spp. in PNI, state of Paraná, southern Brazil.

Keywords: Procyonidae, ticks, *Rickettsia rhipicephali*, *Rickettsia amblyommatis*, Atlantic Rainforest.

1 INTRODUÇÃO

O Parque Nacional do Iguaçu (PNI) é uma das maiores áreas de conservação da Mata Atlântica, que compreende uma extensão de 185 mil hectares e abriga as Cataratas do Iguaçu (FERNANDES; GARCIA, 2011), recebendo anualmente cerca de 1,5 milhão de visitantes de diversas regiões do mundo (ICMBIO, 2016).

O PNI apresenta abundante riqueza faunística, merecendo destaque mamíferos como onça-pintada, anta, quati, veado, cutia e caititu, dentre outras espécies. Os quatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) são carnívoros da família Procyonidae que estão amplamente distribuídos na América do Sul, sendo uma das espécies que apresentam maior sinantropia nas áreas de visitação do PNI, especialmente próximo ao mirante das cataratas (CÁCERES, 2011).

O conhecimento sobre a dinâmica da infestação por ectoparasitos em quatis é fundamental, uma vez que estabelece o papel da espécie como hospedeira de diferentes ectoparasitos, inclusive aqueles transmissores de patógenos para outros animais e seres humanos que frequentam os mesmos *habitats* (SPOLIDORIO et al., 2010; SZABÓ et al., 2013; SOARES et al., 2015). Carrapatos, por exemplo, são importantes vetores de bactérias dos gêneros *Rickettsia* e *Borrelia* (CUTLER et al., 2010; PAROLLA et al., 2013), além de ser um achado frequente em quatis (RODRIGUES et al., 2006; ESTEVAM, 2017). Contudo, ainda é pouco conhecida a importância direta dos quatis como hospedeiros de microrganismos transmitidos por carrapatos, tais como aqueles dos gêneros *Rickettsia*.

Nesse sentido, o objetivo do presente trabalho foi realizar o diagnóstico molecular de *Rickettsia* spp. em carrapatos oriundos de quatis e em pele de quatis selvagens e sinantrópicos do Parque Nacional do Iguaçu (PNI), estado do Paraná, sul do Brasil.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Aspectos éticos e legais da pesquisa científica

Esta pesquisa foi realizada após aprovação pela Comissão de Ética para o Uso de Animais do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (nº 058/2014 CEUA-IV/UFRRJ) (Anexo II). A captura dos animais, a coleta a campo e o transporte de amostras biológicas foi autorizada pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio), sob o nº 43614-3 (Anexo III).

2.2 Área de estudo

Este estudo foi desenvolvido no PNI, uma unidade de conservação federal administrada pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio). O PNI está localizado no município de Foz do Iguaçu, na mesorregião Oeste do estado do Paraná, e compreende uma área total de 185 mil hectares com grande riqueza de fauna e flora (FERNANDES; GARCIA, 2011). O PNI recebe anualmente cerca de 1,5 milhão de turistas de diversas regiões do mundo, sendo um dos parques brasileiros que mais atraem visitantes (ICMBIO, 2016).

As capturas dos quatis foram realizadas durante o mês de setembro de 2014 e entre os meses de março e abril de 2015, totalizando um esforço amostral de 42 dias de coleta realizadas nos períodos matutino e vespertino (das 9:00 as 16:00 horas). Na área turística do PNI foram escolhidos três pontos de coleta: os mirantes das cataratas (ponto I - 25°41'03"S, 54°26'24"W, com uma extensão total de aproximada de 1,2 Km) e o acesso a duas trilhas no interior da floresta (ponto II - 25°39'05"S, 54°26'16"W e ponto III - 25°37'36"S, 54°27'39"W) (Figura 4).

2.3 Obtenção das amostras

Quando avistados, quatis sub-adultos e adultos eram atraídos com isca de banana, abacaxi ou pasta de amendoim e capturados ativamente com auxílio de puçá (nylon multifilamento, 60 x 120 cm). Armadilhas modelo tomahawk (90x45x50cm e 50x21,5x20 cm) também foram instaladas durante todo o dia, uma em cada ponto de coleta. Após contidos, os quatis receberam uma pré-anestesia com Atropina 1% (Sulfato de Atropina[®], UCB, 1mg/Kg SC) e Xilazina 2% (Anasedan[®], Cespo, 2mg/Kg IM) (exceto fêmeas gestantes), sendo anestesiados com uma associação de Tiletamina + Zolazepan (Zoletil[®] 50, Virbac, 7mg/mL, IM).

Com o objetivo de avaliar o potencial de quatis como hospedeiros de *Rickettsia* spp. utilizando tecidos coletados de forma não invasiva, optou-se pela coleta de fragmentos de pele. Um fragmento desse tecido foi coletado da borda posterior da base da orelha esquerda de cada quati. Antes da coleta foram realizadas tricotomia e assepsia do local com etanol 70°, seguido de secção com tesoura cirúrgica e pinça dente de rato. Os fragmentos foram armazenados em microtubos de 1,5mL com solução de RNAlater[®] e imediatamente congelados a -20°C até a extração de DNA.

Neste estudo foi avaliado um total de 566 carrapatos, dentre eles larvas de *Amblyomma* spp., ninfas de *Haemaphysalis juxtakochi*, *Amblyomma brasiliense* e *Amblyomma coelebs*, e adultos de *Amblyomma ovale*, previamente descritos por Magalhães-Matos et al. (2017), excetuando-se as amostras que foram depositadas em coleção ixodológica. Os ectoparasitos foram armazenados em RNAlater[®] e, após identificados, foram congelados a -20°C.

Informações individuais dos animais foram registradas em uma ficha de coleta. A estimativa da idade foi realizada de acordo com Olifiers et al. (2010), sendo classificados em filhotes (até 6 meses), sub-adultos (6 meses a 2 anos) e adultos (acima de dois anos).

Todos os animais analisados foram marcados com brincos enumerados para evitar a recaptura. Após as coletas, os animais foram monitorados até a recuperação total da anestesia, quando eram reintroduzidos no mesmo *habitat* de origem.

2.4 Análises moleculares

2.4.1 Extração de DNA

Antes da extração de DNA, todos os carrapatos foram sequencialmente lavados em solução de hipoclorito de sódio a 1%, álcool etílico 70% e Tampão fosfato-salino (PBS). A extração de DNA foi realizada individualmente de cada carrapato pelo método fenol-clorofórmio, de acordo com o protocolo estabelecido por Santolin (2014) (Anexo V). Para extração de DNA da pele dos quatis foi utilizado um kit comercial (DNeasy[®] Blood & Tissue, QIAGEN), seguindo o protocolo de extração de DNA para tecidos animais indicado pelo fabricante.

O DNA extraído dos carrapatos e da pele dos quatis foi quantificado, analisado quanto a pureza (NanoDrop[™] 2000/2000c Spectrophotometers) e padronizado a 50ng para a realização das análises moleculares.

2.4.2 Reação em cadeira pela polimerase (PCR)

A PCR foi utilizada para pesquisa de DNA de *Rickettsia* spp. tanto nas amostras de carrapatos quanto de pele. Para triagem das amostras foram empregados os iniciadores 17k3 e 17k5, que amplificam um fragmento de 549pb do gene *htrA* (que codifica um antígeno de membrana de 17kD) e os iniciadores CS-239 e CS-1069, que amplificam um fragmento de 834pb do gene *gltA* (que codifica a enzima citrato sintase), específicos para o gênero *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004a). Foram consideradas positivas as amostras que amplificaram para ambos os genes avaliados.

As amostras positivas na triagem foram submetidas a dois protocolos adicionais de PCR: um utilizando os iniciadores Rr190.70p e Rr190.602n, que amplificam um fragmento de 532pb do gene *ompA* (que codifica um antígeno de membrana de 190kD) (REGNERY et al., 1991); e outro protocolo com os iniciadores 120-M59 e 120-807, que amplificam 856pb do gene *OmpB* de *Rickettsia* spp. (ROUX; RAOULT, 2000).

Para todas as reações, o *master mix* continha tampão 1X (5X Colorless GoTaq[®], Promega[®]), 2,5mM de MgCl₂ (Promega[®] MgCl₂ Solution), 200μM de DNTP's, 10pmoles de cada iniciador, 0,75U de Taq polimerase (GoTaq DNA Polymerase, Promega[®]), 100ng de DNA e água proporcional para se obter um volume final de 25μL.

As seguintes condições foram utilizadas para as reações de PCR: desnaturação inicial a 95°C por cinco minutos, seguidos por 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 52°C por 20 segundos e 72°C por 25 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos (MCINTOSH et al., 2015, modificado). As reações ocorreram em termociclador modelo T100 (Bio-rad[®]). Como controle positivo das reações foi utilizado DNA de *Rickettsia parkeri* cepa At24 isolada de *Amblyomma triste* em Paulicéia, estado de São Paulo (SILVEIRA et al., 2007). Como controles negativos foi utilizado água ultra pura aplicada dentro e fora do fluxo laminar de preparação do *master mix*, além de um controle de extração (amostra sabidamente negativa extraída junto com as amostras teste).

2.4.3 Eletroforese e análise dos resultados

Um volume de 10 µL dos *amplicons* obtidos da PCR foram aplicados em gel de agarose a 1,5% (UltraPure™ LMP Agarose, Invitrogen®), sendo separados por eletroforese (5V/cm), corados com brometo de etídio (0,5µg/mL) e visualizados em transiluminador de luz UV (L-PIX Sti, Loccus). Para se estimar o tamanho dos fragmentos amplificados, os mesmos foram comparados com um padrão de peso molecular de 100pb (GeneRuler 100bases DNA Ladder, product #SM024, Thermo Scientific).

2.4.4 Sequenciamento

As amostras de DNA de *Rickettsia* em carrapatos foram sequenciadas para os genes *gltA*, *ompA* e *ompB*, enquanto que nas amostras de pele foram avaliados os genes *htrA* e *gltA*. O material para sequenciamento foi purificado a partir de 15µL do produto de PCR das amostras positivas, sendo tratados com Exo-Sap-IT (GE Healthcare®), seguindo o protocolo indicado pelo fabricante. Os fragmentos foram sequenciados em ambas as direções em um analisador genético automatizado (ABI 3730 DNA Analyser, Thermo Fisher Scientific®). As sequências obtidas foram alinhadas através do programa ClustalW e submetidas a pesquisa de homologia com outras sequências depositadas no GenBank, utilizando-se a ferramenta BLASTn.

2.5 Análise filogenética

As árvores filogenéticas foram construídas a partir dos fragmentos dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* das amostras positivas para *Rickettsia* spp. em carrapatos. Para todas as análises filogenéticas realizadas, as sequências obtidas no sequenciamento e as obtidas em bancos de dados foram alinhadas pela ferramenta MUSCLE (EDGAR, 2004) no programa Seaview4 (GOUY et al., 2010). As relações filogenéticas foram estimadas usando inferência filogenética por Máxima Verossimilhança (MV) implementado na ferramenta PhyML (GUINDON; GASCUEL, 2003) sob um modelo de evolução de sequência que foi escolhido depois de testes de modelos alternativos hierarquicamente pela computação usando o critério de informação Bayesiano, determinado no MEGA versão 7 (KUMAR et al., 2016). O suporte estatístico dos clados foi medido por uma busca heurísticas com 1.000 repetições de *bootstrap*.

3 RESULTADOS

Embora as 566 amostras de carrapatos tenham sido obtidas de 86 animais (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017), amostras de pele foram coletadas de apenas 75 quatis. Dentre estes, 49 eram fêmeas e 26 machos, enquanto que em relação a idade, nove eram filhotes, 33 sub-adultos e 33 adultos.

Através da PCR, 3,00% (17/566) dos carrapatos e 1% (1/75) dos quatis amplificaram DNA de *Rickettsia* spp. para os genes avaliados (Tab. 2; Figs. 8, 9, 10, 11 e 12). As sequências de todas as amostras positivas são apresentadas no anexo VI.

Tabela 2. Números de amostras coletadas e prevalência de *Rickettsia* spp. por hospedeiro.

| Espécie do hospedeiro | Número de amostras | Espécie de <i>Rickettsia</i> | Prevalência molecular | |
|---------------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| | | | <i>htrA</i> e <i>gltA</i> | <i>ompA</i> e <i>ompB</i> |
| <i>Amblyomma</i> spp. | 21 | – | 0% | NA |
| <i>Haemaphysalis juxtakochi</i> | 5 | – | 0% | NA |
| <i>Amblyomma brasiliense</i> | 75 | <i>Rickettsia</i> sp. | 3% (2/75) | 3% (2/75) |
| <i>Amblyomma coelebs</i> | 420 | <i>Rickettsia amblyommatis</i> | 2,14% (9/420) | 2,14% (9/420) |
| <i>Amblyomma ovale</i> | 45 | <i>Rickettsia bellii</i> | 13% (6/45) | 0% |
| <i>Nasua nasua</i> (pele) | 75 | <i>Rickettsia rhipicephali</i> | 1% (1/75) | 1% (1/75) |

*NA: não avaliado.

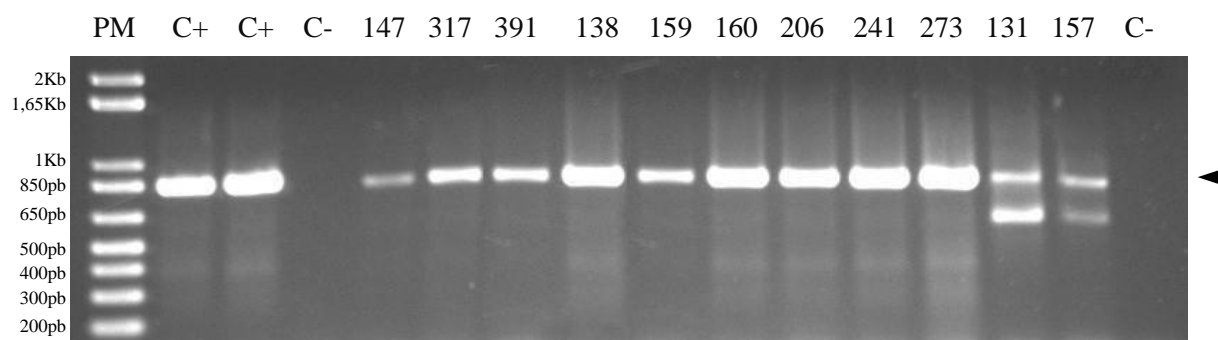


Figura 8. Fotografia de gel de agarose demonstrando os produtos de PCR obtidos após amplificação de um fragmento do gene *gltA* de *Rickettsia* spp., com aproximadamente 834 pares de base (seta), em amostras de carrapatos: padrão molecular (PM), controles positivos de *Rickettsia parkeri* cepa At24 (C+), controle negativo (C-: água distribuída dentro do fluxo laminar), amostras teste positivas (147, 317, 391 – *A. ovale*; 138, 159, 160, 206, 241, 273 – *A. coelebs*; 131, 157 – *A. brasiliense*) e controle negativo (C-: Controle ambiental). Fonte: Arquivo pessoal.

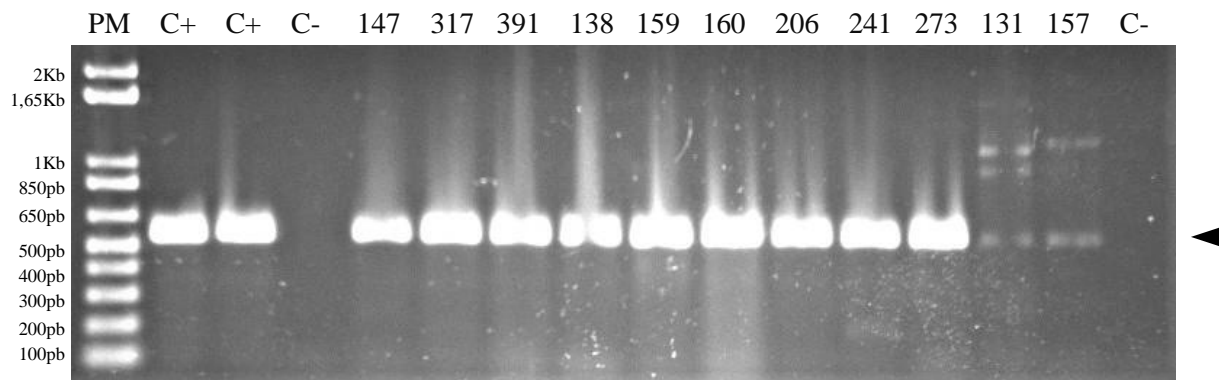


Figura 9. Fotografia de gel de agarose demonstrando os produtos de PCR obtidos após amplificação de um fragmento do gene *htrA* de *Rickettsia* spp., com aproximadamente 549 pares de base (seta), em amostras de carrapatos: padrão molecular (PM), controles positivos de *Rickettsia parkeri* cepa At24 (C+), controle negativo (C-: água distribuída dentro do fluxo laminar), amostras teste positivas (147, 317, 391 – *A. ovale*; 138, 159, 160, 206, 241, 273 – *A. coelebs*; 131, 157 – *A. brasiliense*) e controle negativo (C-: Controle ambiental). Fonte: Arquivo pessoal.

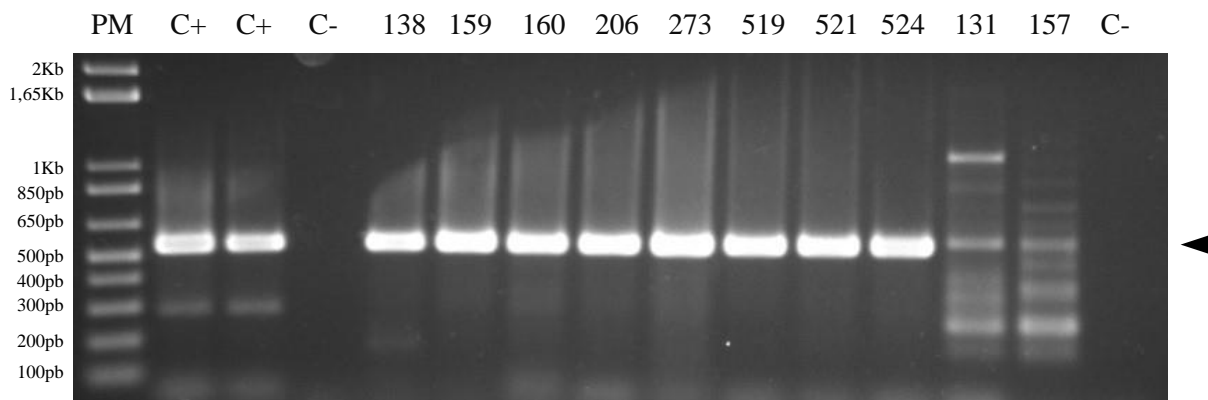


Figura 10. Fotografia de gel de agarose demonstrando os produtos de PCR obtidos após amplificação de um fragmento do gene *ompA* de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa, com aproximadamente 533 pares de base (seta), em amostras de carrapatos: padrão molecular (PM), controles positivos de *Rickettsia parkeri* cepa At24 (C+), controle negativo (C-: água distribuída dentro do fluxo laminar), amostras teste positivas (138, 159, 160, 206, 273, 519, 521, 524 – *A. coelebs*; 131, 157 – *A. brasiliense*) e controle negativo (C-: controle ambiental). Fonte: Arquivo pessoal.

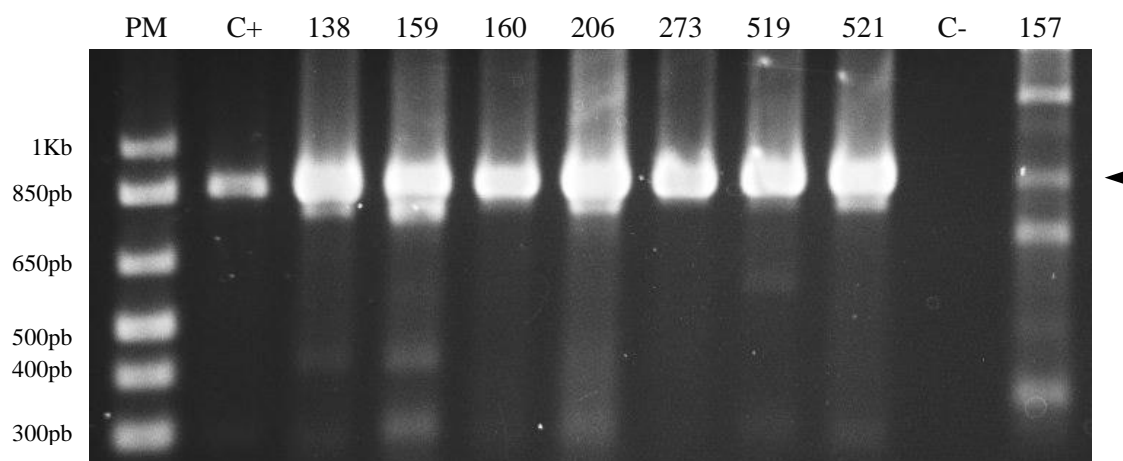


Figura 11. Fotografia de gel de agarose demonstrando os produtos de PCR obtidos após amplificação de um fragmento do gene *ompB* de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa, com aproximadamente 856 pares de base (seta), em amostras de carrapatos: padrão molecular (PM), controle positivo de *Rickettsia parkeri* cepa At24 (C+), amostras teste positivas (138, 159, 160, 206, 273, 519, 521 – *A. coelebs*; 157 – *A. brasiliense*) e controle negativo (C-: controle ambiental). Fonte: Arquivo pessoal.

Das seis amostras de *A. ovale* positivas na triagem (*htrA* e *gltA*), duas foram oriundas de fêmeas e quatro de machos, que infestavam 6% (5/86) dos quatis. O resultado do sequenciamento do fragmento do gene *gltA* demonstrou que duas das sequências obtidas (amostras 5 e 16) apresentaram 100% de identidade com cepas de *R. bellii* (Tab. 3), enquanto uma terceira (amostra 22), muito próxima a essas, possui um máximo de 99,8% (601/602) de identidade com *R. bellii* cepa RB-CL (KX137900). A análise filogenética para *gltA* demonstrou que essas sequências estão no mesmo clado que *R. bellii*, sendo que a amostra 22 diferenciou-se das demais (Fig. 12). As sequências das outras três amostras (8, 17 e 39) apresentam 99,3% identidade com cepas de *R. bellii* (Tab. 3), sendo idênticas entre si. No dendograma formado, essas amostras também se apresentaram dentro do clado de *R. bellii*, porém em um *cluster* diferente. Estas amostras foram consideradas como uma cepa diferente, definida como *R. bellii* cepa AoNa (Fig. 12). Nenhuma das seis amostras positivas de *A. ovale* amplificou para o gene *ompA* e *ompB*, o que é esperado uma vez que *R. bellii* não pertence ao Grupo da Febre Maculosa.

Um total de 7% (6/86) dos quatis apresentou-se infestado por *A. coelebs* positivos para *Rickettsia* sp. Todas as amostras positivas na triagem foram também positivas para os genes *ompA* e *ompB*.

Em relação aos fragmentos dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB*, o sequenciamento revelou identidade com cepas de *R. amblyommatis* (Tabs. 3, 4 e 5). Nas análises filogenéticas, observou-se que para todos os genes avaliados, *R. amblyommatis* detectada no presente trabalho encontrou-se no mesmo clado que outras sequências de *R. amblyommatis* (ou *R. amblyommi*) depositados no Genbank, porém agrupadas em um *cluster* diferente (Figs. 12, 13 e 14). Desse modo, propõe-se que o agente em questão seja uma cepa diferente, denominada como *Rickettsia amblyommatis* cepa Foz.

Tabela 3. Sequências homólogas aos fragmentos do gene *gltA* de *Rickettsia* spp. detectados em carrapatos de quatis do Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil.

| Espécie de carrapato | Espécie/cepa homóloga | Número de acesso | Homologia | QC*; E valor | Gaps |
|----------------------|--|------------------|-----------------|--------------|------|
| <i>A. ovale</i> | <i>R. bellii</i> cepa RB-CL ¹ | KX137900 | 100% (602/602) | 99%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. bellii</i> cepa CR00012 ¹ | KX009410 | 100% (602/602) | 99%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. bellii</i> cepa AdMG ¹ | KX020409 | 100% (602/602) | 99%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. bellii</i> cepa RB-CL ² | KX137900 | 99,3% (598/602) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. bellii</i> cepa CR00012 ² | KX009410 | 99,3% (598/602) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>Rickettsia</i> sp. cepa LIC2937A-CS4 ² | KF195974 | 99,3% (598/602) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. bellii</i> cepa AdMG ² | KX020409 | 99,3% (598/602) | 100%; 0.0 | 0 |
| <i>A. coelebs</i> | <i>R. amblyommatis</i> cepa LIC 5303A | KY273595 | 99,6% (599/602) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. amblyommatis</i> cepa An13 | CP015012 | 99,5% (599/602) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. amblyommatis</i> cepa Ac37 | CP012420 | 99,5% (599/602) | 100%; 0.0 | 0 |

*Query cover. ¹Sequências homólogas à cepa de *R. bellii* encontrada nas amostras 5 e 16. ²Sequências homólogas à *R. bellii* cepa AoNa, encontrada no presente trabalho.

Tabela 4. Sequências homólogas aos fragmentos do gene *ompA* de *Rickettsia* sp. cepa Foz detectados em *A. coelebs* de quatis do Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil.

| Espécie de carrapato | Espécie/cepa homóloga | Número de acesso | Homologia | QC*; E valor | Gaps |
|----------------------|---|------------------|-----------------|--------------|------|
| <i>A. coelebs</i> | <i>Candidatus R. amblyommii</i> clone Mato Grosso 1 | KT722803 | 100% (473/473) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>Rickettsia</i> sp. cepa A45 | JN615562 | 100% (473/473) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. amblyommatis</i> clone 4872 | KX576685 | 100% (473/473) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>Rickettsia amblyommii</i> cepa Texas A&M | EF194096 | 99,8% (472/473) | 100%; 0.0 | 0 |

*Query cover.

Tabela 5. Sequências homólogas aos fragmentos do gene *ompB* de *Rickettsia* sp. cepa Foz detectados em *A. coelebs* de quatis do Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil.

| Espécie de carrapato | Espécie/cepa homóloga | Número de acesso | Homologia | QC*; E valor | Gaps |
|----------------------|--|------------------|-----------------|--------------|------|
| <i>A. coelebs</i> | <i>Candidatus R. amblyommii</i> clone HsAmFJ0001 | KX363846 | 97,8% (677/692) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. amblyommatis</i> cepa Ac/Pa | KX151487 | 97,8% (677/692) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. amblyommatis</i> cepa Ac37 | CP012420 | 97,8% (677/692) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. amblyommatis</i> clone Viana | KY628368 | 97,8% (677/692) | 100%; 0.0 | 0 |

*Query cover.

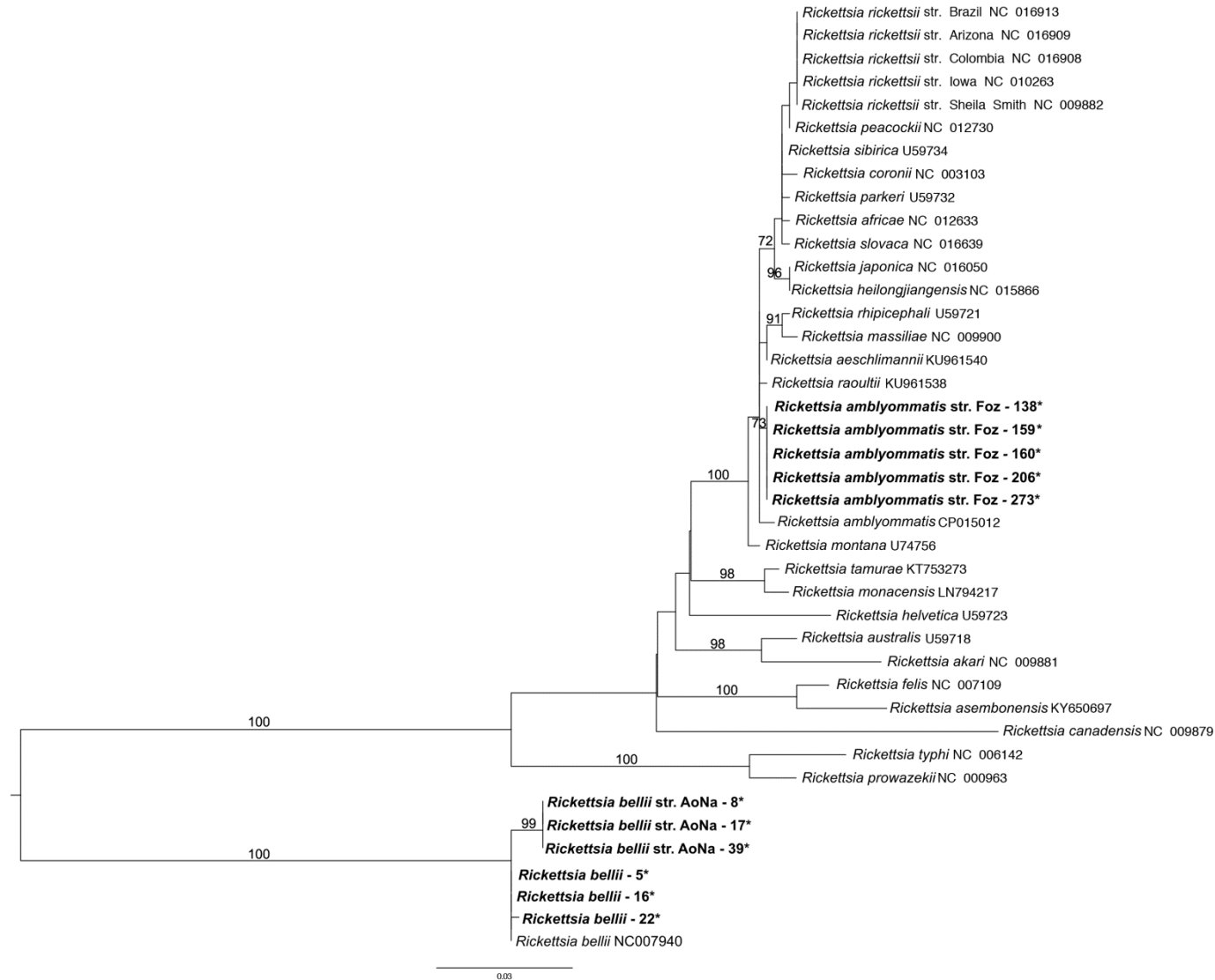


Figura 12. Análise filogenética de *Rickettsia amblyommatis*, *Rickettsia belli* e outras espécies de *Rickettsia* baseada em seqüências do gene *gltA* utilizando o método de máxima verossimilhança. Modelo evolutivo Tamura 3-parameter + Gamma. *Bootstrap*: 1000. *: presente estudo

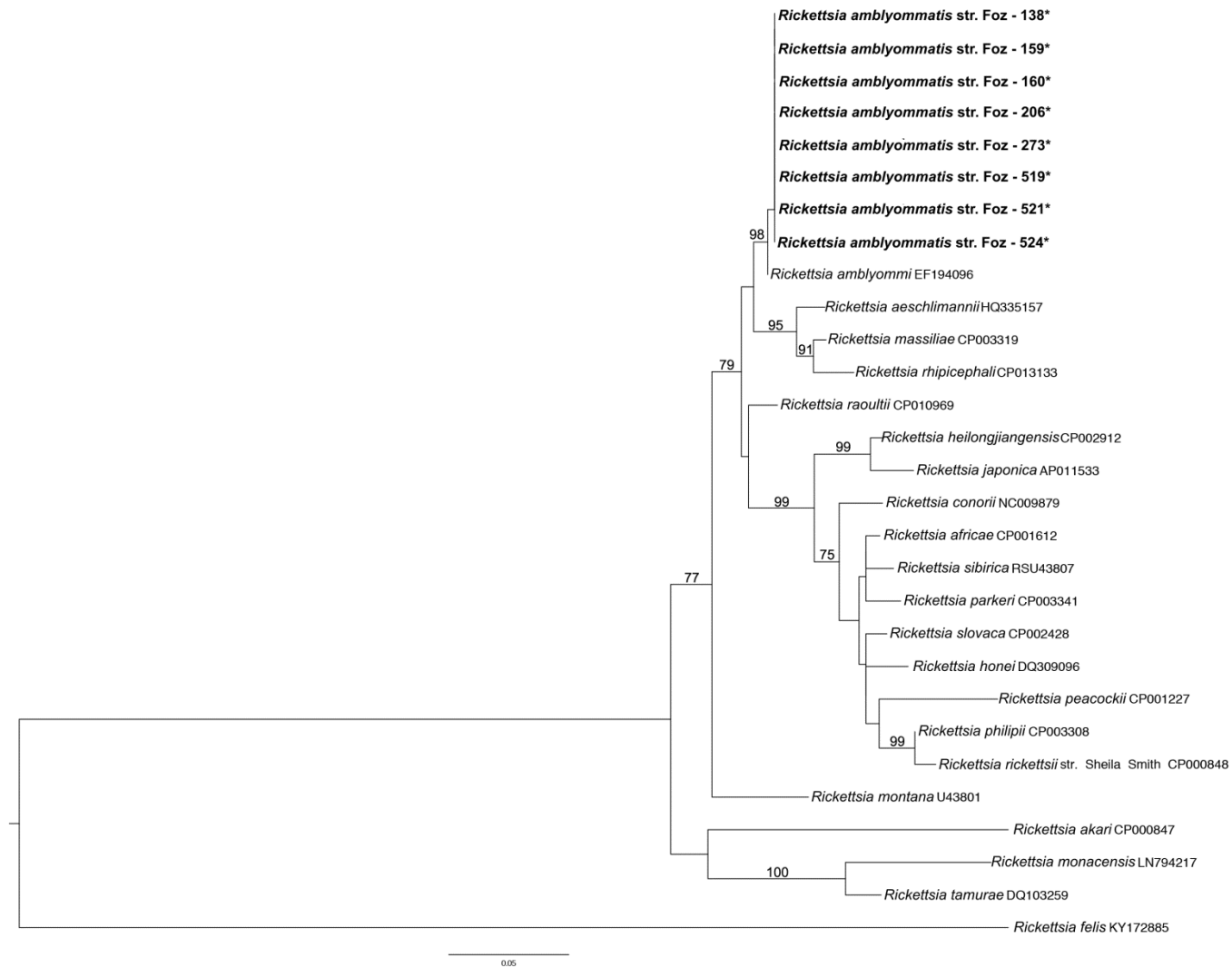


Figura 13. Análise filogenética de *Rickettsia amblyommatis* e outras espécies de *Rickettsia* baseada em sequências do gene *ompA* utilizando o método de máxima verossimilhança. Modelo evolutivo Tamura 3-parameter + Gamma. *Bootstrap*: 1000. *: presente estudo.

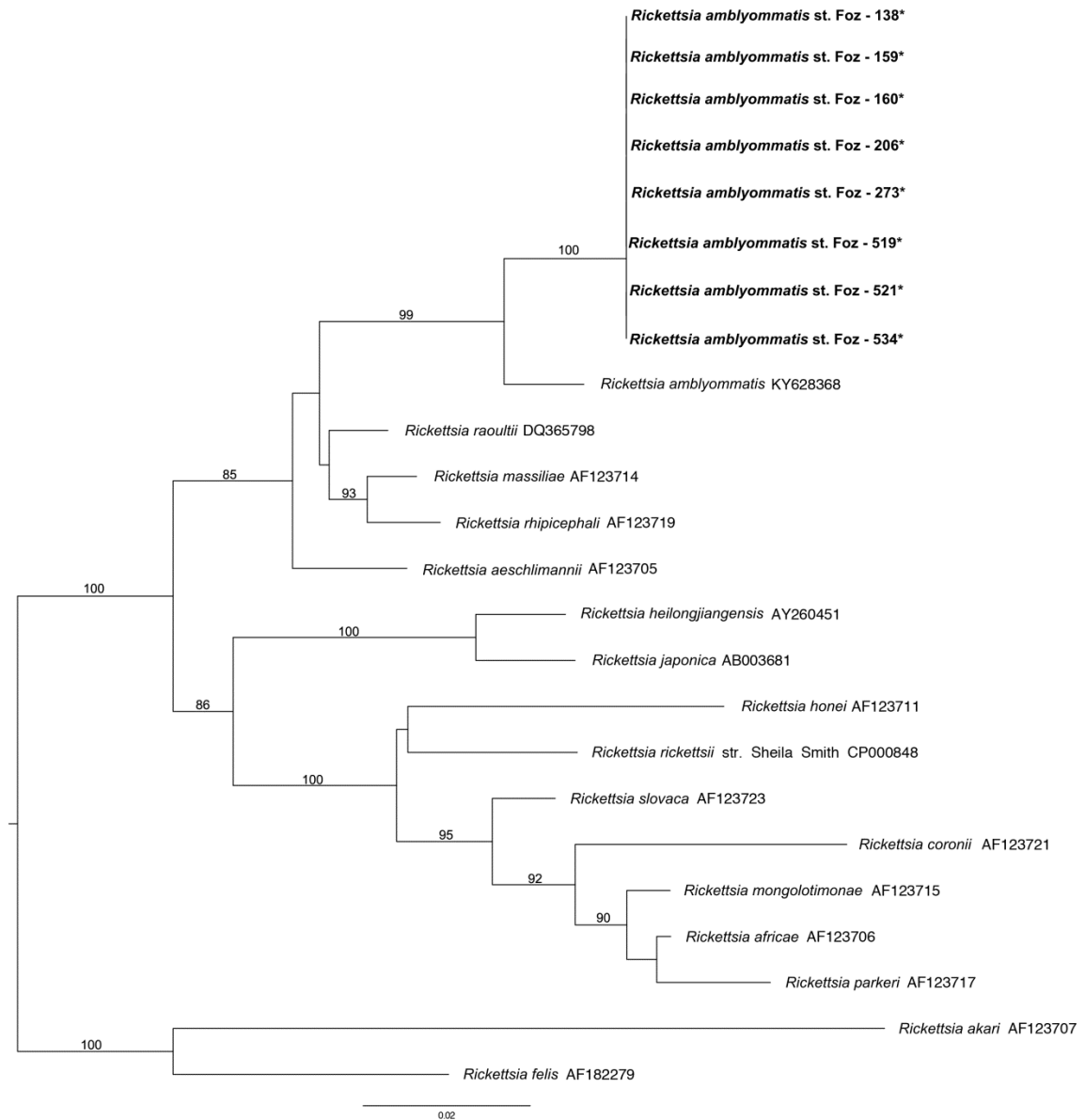


Figura 14. Análise filogenética de *Rickettsia amblyommatis* e outras espécies de *Rickettsia* baseada em sequências do gene *ompB* utilizando o método de máxima verossimilhança. Modelo evolutivo General Time Reversible + Gamma. *Bootstrap*: 1000. *: presente estudo.

As duas amostras positivas de *A. brasiliense* apresentaram bandas inespecíficas na amplificação dos fragmentos dos quatro genes avaliados, o que dificultou a análise do sequenciamento, bem como chegar a uma conclusão mais precisa.

Em relação às amostras de quati, a única amostra de pele positiva na triagem (Fig. 15) foi também positiva para o gene *ompA*. A análise das sequências de *htrA* e *gltA* obtidas demonstrou 100% de homologia para ambos os genes com *Rickettsia rhipicephali* (Tab. 6). Dois espécimes de *A. coelebs* que infestavam esse mesmo animal não foram positivos pela PCR para *Rickettsia* spp. O animal em questão era uma fêmea adulta com temperatura corporal, frequências cardíaca e respiratória dentro da normalidade para a espécie, não apresentando alterações sugestivas de doença.

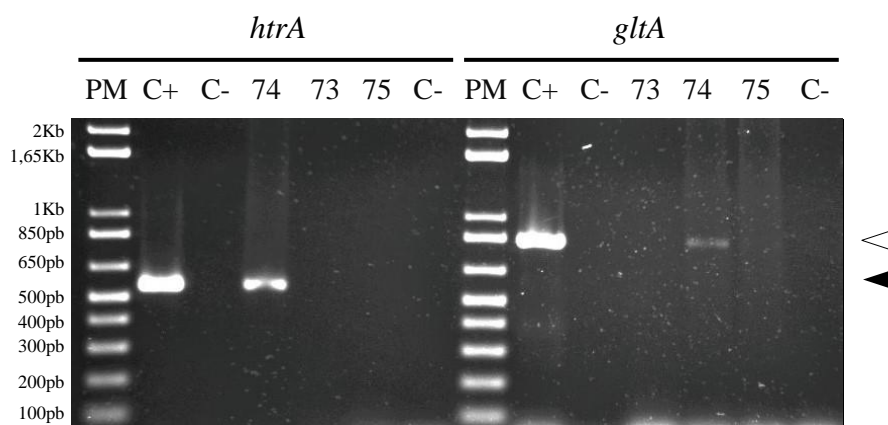


Figura 15. Fotografia de gel de agarose demonstrando os produtos de PCR para os genes *htrA* (549 pares de base, seta preta) e *gltA* (834 pares de base, seta branca) em amostras de pele de quatis: padrão molecular (PM), controles positivos de *Rickettsia parkeri* (C+), controle negativo (C-: águas distribuídas dentro e fora do fluxo laminar) e amostras teste (73, 74, 75). Fonte: Arquivo pessoal.

Tabela 6. Sequências homólogas aos fragmentos do gene *htrA* e *gltA* de *Rickettsia rhipicephali* detectados em amostra de pele de quati do Parque Nacional do Iguaçu, Paraná, Brasil

| Hospedeiro e gene alvo | Espécie/cepa homóloga | Número de acesso | Homologia | QC*; E valor | Gaps |
|--------------------------------|--|------------------|----------------|--------------|------|
| <i>N. nasua</i> <i>htrA</i> | <i>R. rhipicephali</i> cepa RrMG | KX018048 | 100% (477/477) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. rhipicephali</i> cepa HJ#5 | CP013133 | 100% (477/477) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. rhipicephali</i> cepa HJ5 | DQ865207 | 100% (477/477) | 100%; 0.0 | 0 |
| <i>N. nasua</i> <i>gltA</i> | <i>R. rhipicephali</i> cepa RrMG | KX018048 | 100% (616/616) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. rhipicephali</i> cepa HJ#5 | CP013133 | 100% (616/616) | 100%; 0.0 | 0 |
| | <i>R. rhipicephali</i> cepa 3-7-female6-CWPP | CP003342 | 100% (616/616) | 100%; 0.0 | 0 |

*Query cover.

4 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que se propõe a avaliar de forma específica a importância de quatis e seus carrapatos como hospedeiros de *Rickettsia* spp. O DNA desse agente foi detectado nos carrapatos *A. coelebs*, *A. brasiliense* e *A. ovale*. O presente trabalho também relata, pela primeira vez, a detecção de DNA de *Rickettsia* spp. em fragmento de tecido de um quati e em *A. brasiliense*.

Nesta pesquisa, DNA de *R. bellii* foi detectado em carrapatos da espécie *A. ovale* recuperados de quatis, sendo possível a diferenciação de duas cepas. Esses achados corroboram com as informações disponíveis na literatura, uma vez que a infecção por *R. bellii* é comumente observada na natureza em diferentes espécies de carrapatos ixodídeos, inclusive *A. ovale* (LABRUNA et al., 2011). Em um estudo conduzido com carrapatos de vida livre de áreas florestais do estado de Rondônia, Labruna et al. (2004a) detectaram uma prevalência que variou de 25,6% a 32,6% de *R. bellii* em *A. ovale*, índices superiores ao observado no presente estudo.

Rickettsia bellii é uma bactéria de patogenicidade desconhecida, por nunca ter sido detectada em humanos ou outros animais até o presente momento. Por ser considerada a espécie mais primitiva do gênero, além de ter alta prevalência em populações de *Amblyomma* spp., considera-se que um possível processo de co-evolução simbiótica tenha ocorrido entre o carrapato hospedeiro e a bactéria (LABRUNA et al., 2004a; MCINTOSH et al., 2015). Mesmo sendo um agente de patogenicidade desconhecida, a detecção de *R. bellii* nas populações de *A. ovale* de quatis do PNI é um achado importante, uma vez que a presença de um agente riquetsial no carrapato pode inibir a transmissão transovariana de outras riquetsias (BURGDORFER et al., 1981; MACALUSO et al., 2002; LABRUNA et al., 2004a), como, por exemplo, *R. rickettsii*, que apresenta alta patogenicidade.

Dentre as seis sequências de *R. bellii* avaliadas no presente estudo foram observadas basicamente dois genótipos diferentes no fragmento de *gltA*, o que indica que *A. ovale* de quatis do PNI apresentam pelo menos duas cepas de *R. bellii*. Duas das sequências é idêntica a outras cepas relatadas na literatura, como *R. bellii* cepa RB-CL detectada em *Ixodes loricatus* no Rio Grande do Sul, também no sul do Brasil (KRAWCZAK et al., 2016). Uma terceira sequência (amostra 22) apresenta um nucleotídeo de diferença das cepas relatadas na literatura, destacando-se inclusive na árvore filogenética. Em relação ao outro genótipo, três sequências de *R. bellii* apresentavam quatro nucleotídeos de diferença das outras amostras e dos isolados depositados no Genbank, pertencendo a uma nova cepa descrita aqui como *R. bellii* cepa AoNa.

Amblyomma ovale é um dos principais vetores de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, espécie pertencente ao Grupo da Febre Maculosa (GFM) e agente etiológico de uma riquetsiose branda para humanos (denominada como Febre Maculosa da Mata Atlântica), caracterizada inicialmente no Brasil por Spolidorio et al. (2010) e Szabó et al. (2013b). No presente estudo não foi detectado DNA desta cepa nos *A. ovale* avaliados, o que pode ter ocorrido pelo processo de inibição citado anteriormente ou, simplesmente, porque o agente não ocorre em *A. ovale* do PNI.

As análises das sequências de DNA nas amostras de *A. coelebs* apresentaram identidade com cepas de *R. amblyommatis* em todos os genes avaliados. O diagnóstico de *R. amblyommatis* é um achado comum em carrapatos do gênero *Amblyomma* no Brasil, como observa-se com *Amblyomma auriculatum* (SARAIVA et al., 2013), *Amblyomma calcaratum* (LUZ et al., 2017), *Amblyomma longirostre* (MCINTOSH et al., 2015; KRAWCZAK et al., 2016; LUZ et al., 2017) e *Amblyomma pacaie* (LOPES et al., 2016), por exemplo. Labruna et al. (2004a) detectaram esse agente pela primeira vez no país em *A. cajennense sensu latum* e *A. coelebs*, inclusive sugerindo que *Rickettsia* sp. cepa ARANHA, anteriormente descrita por eles em *A.*

longirostre (LABRUNA et al., 2004b), seja na verdade uma cepa de *R. amblyommatis*, uma vez que ela é altamente relacionada a esta espécie.

Os registros presentes na literatura demonstram que a prevalência de *R. amblyommatis* em *A. coelebs* está em torno de 10-15%. Ao pesquisarem agentes riquetsiais em carrapatos do gênero *Amblyomma* no estado de Rondônia, Amazônia brasileira, Labruna et al. (2004a) detectaram a prevalência de 10% (1/10) de infecção em *A. coelebs* avaliados, além de observarem também a presença do agente em 26,8% (11/41) de *Amblyomma cajennense*. Parola et al. (2007) detectou o agente em 15,4% (2/13) dos *A. coelebs* avaliados na Guiana Francesa. Os resultados obtidos neste estudo demonstraram uma prevalência de 2,14% (9/420) de *R. amblyommatis* em *A. coelebs*, valor inferior ao observado nos outros estudos. Isso demonstra que a prevalência de *R. amblyommatis* parece ser menor em *A. coelebs* da Mata Atlântica do sul do Brasil que na região Amazônica. Além disso, é importante destacar que o número amostral de carrapatos pode influenciar na prevalência observada, uma vez que pequenas amostras tendem a não demonstrar com fidedignidade a prevalência real que ocorre na população.

No presente trabalho, DNA de *Rickettsia* sp. foi detectado através da PCR em ninfas de *A. brasiliense*. Outros autores já realizaram pesquisa de *Rickettsia* sp. em carrapatos dessa espécie através de métodos moleculares, não detectando, contudo, a presença de organismos riquetsiais (SABATINI et al., 2010; LUZ et al., 2017; MARTINS et al., 2017). As amostras positivas de *A. brasiliense* foram submetidas a diferentes condições de amplificação na tentativa de remover as reações inespecíficas que foram detectadas nos três genes avaliados, contudo não se obteve sucesso. Confirma-se que esta é a primeira detecção molecular de *Rickettsia* sp. em *A. brasiliense*, embora não tenha sido possível confirmar qual espécie de *Rickettsia* ocorre nesse carrapato.

Não há registros na literatura sobre a infecção de quatis por *Rickettsia* spp. Sabe-se que o guaxinim (*Procyon lotor*), uma espécie de procionídeo norte-americano, já se apresentou soropositivo para *R. parkeri*, porém sem evidências moleculares de infecção (CASTELLAW et al., 2011). No Brasil, Soares et al. (2015) pesquisaram DNA de *Rickettsia* em carrapatos e mamíferos selvagens da região amazônica, dentre eles o quati. Os autores coletaram amostras de pulmão e fígado de quati, porém não detectaram DNA de *Rickettsia* através da PCR.

No presente trabalho, optou-se por coletar amostra de pele da orelha de cada animal, uma vez que seria um método não invasivo de obtenção de tecidos. Além disso, a coleta de pele também baseou-se no fato de que *Rickettsia* spp. causa quadros de baixa riquetsemia mesmo na fase aguda da infecção, fazendo com que a amostra de sangue, por exemplo, não seja tão confiável para refletir a prevalência real no hospedeiro vertebrado. Dessa forma, amostras de pele demonstram apresentar maior sensibilidade de detecção quando comparadas com amostras de sangue (DEMMA et al., 2005). Um dos quatis do PNI foi positivo na PCR para *Rickettsia* sp., amplificando fragmentos dos genes *htrA* e *gltA*. A análise das sequências desses genes demonstraram que a espécie detectada no quati é *Rickettsia rhipicephali*.

Rickettsia rhipicephali ocorre na Ásia, Europa e no Novo Mundo, onde distribui-se desde a América do Norte até a América do Sul. Na América do Norte e Central, infecta *Rhipicephalus sanguineus*, *Dermacentor occidentalis*, *Dermacentor variabilis* e *Dermacentor andersoni* (PAROLA et al., 2013). No Brasil, o agente já foi detectado em *H. juxtakochi* (LABRUNA et al., 2007a) e, mais recentemente, em *Amblyomma* sp. (ZERINGOTÁ et al., 2017). *Rickettsia rhipicephali* é considerada uma bactéria de patogenicidade desconhecida, pois embora não exista relato de casos em humanos, a inoculação intradérmica em porquinhos-da-índia induziu a formação de escaras de inoculação, sugerindo que o agente possa ser patogênico também para humanos (LA SCOLA et al., 2009; PAROLA et al., 2013).

Este é o primeiro estudo que detecta a infecção natural por *R. rhipicephali* em quati. Em contrapartida, o agente não foi detectado nos carrapatos que infestavam os quatis, inclusive em

H. juxtakochi. É importante ressaltar, contudo, que foi obtida uma pequena população de *H. juxtakochi* (n=5) nos quatis analisados, o que pode ter influenciado nesse resultado. Isso não descarta a possibilidade de que *H. juxtakochi*, bem como outras espécies do gênero *Amblyomma*, possam estar funcionando como vetores de *R. rhipicephali* para quatis e também outras espécies silvestres e domésticas.

Alguns estudos epidemiológicos têm demonstrado a soropositividade de cães domésticos para agentes riquetsiais no Brasil, inclusive para *R. rhipicephali*, o que pode demonstrar um papel desses animais como hospedeiros da bactéria (LABRUNA et al., 2007b; SAITO et al., 2008). Coelho et al. (2016) demonstraram recentemente soropositividade de pequenos mamíferos selvagens para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii* e *R. rhipicephali*, demonstrando que este agente também circula em populações silvestres. Partindo dessas informações e dos resultados obtidos nesta pesquisa, torna-se fundamental a realização de estudos sorológicos em quatis para se ter uma noção real da dinâmica de *R. rhipicephali* nessas populações animais.

A grande população de quatis de hábitos selvagens e sinantrópicos presentes no PNI (CÁCERES, 2011), a sua capacidade de dispersão no ambiente (ALLEVATO, 2013), de hospedar carrapatos vetores (MAGALHÃES-MATOS et al., 2017), bem como o contato com outras espécies silvestres e domésticas (cães do entorno no parque) (CÁCERES, 2011; MORAES et al., 2017) pode fazer do quati um eficaz dispersor de carrapatos e dos agentes transmitidos por eles. A presença de turistas no interior do parque nas mesmas áreas onde os animais circulam é também um fator importante que aumenta a probabilidade de transmissão desses agentes para os seres humanos.

5 CONCLUSÃO

Os quatis do Parque Nacional do Iguaçu apresentam importância ecológica para manutenção de carrapatos infectados por *Rickettsia* sp., *Rickettsia amblyommatis* e *Rickettsia bellii*. Além disso, os próprios quatis são infectados por *Rickettsia rhipicephali*, demonstrando que participam direta e indiretamente da epidemiologia de *Rickettsia* spp. no Parque Nacional do Iguaçu, Foz do Iguaçu, estado do Paraná, Brasil.

6 REFERÊNCIAS

- ALLEVATO, H.L. **Padrões espaciais e uso do habitat pelo quati *Nasua nasua*, (Carnivora; Procyonidae), em um fragmento de floresta atlântica urbana sob influência de recursos antropogênicos.** Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2013.
- BURGDORFER W., HAYES, S. F., MAVROS, A. J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer W., Anacker, R. L. (eds.). **Rickettsiae and rickettsial diseases.** Academic, New York, p. 585-594, 1981.
- CÁCERES, N.C. Mamíferos. In: FERNANDES, C.R., GARCIA, H. (eds.) **Parque Nacional do Iguaçu: Patrimônio natural da humanidade.** São Paulo, Ipsis Gráfica e Editora, pp. 198–215, 2011.
- CASTELLAW, A. H.; CHENNEY, E. F.; VARELA-STOKES, A. S. Tick-Borne Disease Agents in Various Wildlife from Mississippi. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 4, p. 439-442, 2011.
- COELHO, M.G., RAMOS, V. N., LIMONGI, J.E., LEMOS, E.R.S., GUTERRES, A., COSTA-NETO, S.F., ROZENTAL, T., BONVICINO, C.R., D'ANDREA, P.S., MORAES-FILHO, J., LABRUNA, M.B., SZABÓ, M.P.J. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brazil. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, p. 275-282, 2016.
- CUTLER, S.J., BONILLA, E.M., SINGH, R.J. Population Structure of East African Relapsing Fever *Borrelia* spp. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 1076-1080, 2010.
- DEMMA, L.J., TRAEGER, M.S., NICHOLSON, W.L., PADDOCK, C.D., BLAU, D.M., EREMEEVA, M.E., DASCH, G.A., LEVIN, M.L., SINGLETON, J., ZAKI, S.R., CHEEK, J.E., SWERDLOW, D.L., MCQUISTON, J.H. Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.
- EDGAR, R.C. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. **BMC Bioinformatics**, v. 5, p. 113, 2004.
- ESTEVAM, L.G.T.M. **Avaliação de hemoparasitos e ectoparasitos em quatis (Procyonidae: *Nasua nasua*) no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais.** 2017. 68f. Dissertação (mestrado em Parasitologia), Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- FERNANDES, C.R., GARCIA, H. (eds.) **Parque Nacional do Iguaçu: Patrimônio natural da humanidade.** São Paulo, Ipsis Gráfica e Editora, p. 256.
- FOURNIER, P.E., RAOULT, D. Current Knowledge on Phylogeny and Taxonomy of *Rickettsia* spp. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 1–11, 2009.

GOUY, M., GUINDON, S., GASCUEL, O. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, p. 221–224, 2010.

GUINDON, S., GASCUEL, O. A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. **Systematic Biology**, v. 52, p. 696–704, 2003.

HERRERA, H. M., DÁVILA, A. M. R., NOREK, A., ABREU, U. G., SOUSA, S. S., ANDREA, P. S. D., JANSEN, A. M.. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263-275, 2004.

HERRERA, H. M., LISBOA, C. V., PINHO, A. P., OLIFIERS, N., BIANCHI, R. C., ROCHA, F. L., MOURÃO, G. M., JANSEN, A. M. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 1133-9, 2008.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (2016). **Dados de visitação (2007–2015), Ranking de visitantes 2012–2015**. Disponível em http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/Dados_de_visita%C3%A7%C3%A3o_DCO_M.pdf (acesso em 16 de outubro de 2016).

KRAWCZAK, F.S., BINDER, L.C., OLIVEIRA, C.S., COSTA, F.B., MORAES-FILHO, J., MARTINS, T.F., SPONCHIADO, J., MELO, G.L., GREGORI, F, POLO, G., OLIVEIRA, S.V., LABRUNA, M.B. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 70, p. 219–229, 2016.

KUMAR, S., STECHER, G., TAMURA, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. **Molecular Biology and Evolution**, v. 33, p. 1870–1874, 2016.

LA SCOLA, B., BECHAH, Y., LEPIDI, H., RAOULT, D. Prediction of rickettsial skin eschars in humans using an experimental guinea pig model. **Microbial Pathogenesis**, v. 47, p. 128–133, 2009.

LABRUNA, M.B., WHITWORTH, T., BOUYER, D.H., MCBRIDE, J., CAMARGO, L.M.A., CAMARGO, E.P., POPOV, V., WALKER, D.H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 1073-1081, 2004a.

LABRUNA, M.B., MCBRIDE, J.W., BOUYER, D.H., CAMARGO, L.M.A, CAMARGO, E. P., WALKER, D.H. Molecular Evidence for a Spotted Fever Group *Rickettsia* Species in the Tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 533-537, 2004b.

LABRUNA, M.B., PACHECO, R.C., RICHTZENHAIN, L.J., SZABO, M.P.J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 869–873, 2007a.

LABRUNA, M.B., HORTA, M.C., AGUIAR, D.M., CAVALCANTE, G.T., PINTER, A., GENNARI, S.M., CAMARGO, L.M.A. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-Borne And Zoonotic Diseases**, v. 7, p. 249-255, 2007b.

LABRUNA M.B., MATTAR S., NAVA S., BERMUDEZ, S., VENZAL, J.M., DOLZ, G., ABARCA, K., ROMERO, L., SOUSA, R., OTEO, J., ZAVALA-CASTRO, J. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Córdoba**, v. 16, p. 2435-2457, 2011.

LOPES, M.G., MAY-JUNIOR, J., FOSTER, R.J., HARMSSEN, B.J., SANCHEZ, E., MARTINS, T. F., QUIGLEY, H., MARCILI, A., LABRUNA, M.B. Ticks and rickettsiae from wildlife in Belize, Central America. **Parasites & Vectors**, v. 9, p. 1-7, 2016.

LUZ, H.R., FACCINI, J.L.H., MCINTOSH, D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 657–665, 2017.

MACALUSO, K. R., D. E., SONENSHINE, S. M. C., AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second rickettsia. **Journal of Medical Entomology**, v. 39, n. 808-813, 2002.

MAGALHÃES-MATOS, P.C., CUNHA-SANTOS, R., SOUSA, P.G.S., SAMPAIO-JÚNIOR, F.D., BARROS, F.N.L.B., MOURÃO, F.R.P.M., OLIVEIRA, W.B.L., GABRIEL, A. M. G., MONTEIRO, S.G.M., GÓES-CAVALCANTE, G., SCOFIELD, A. Molecular detection of *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in procyonids (Carnivora: Procyonidae) in Eastern Amazon, Brazil. **Ciência Rural**, v.46, p.663-668, 2016.

MAGALHÃES-MATOS, P.C., MORAES, M.F.D., VALIM, J.R.A., CASTRO, G.N.S., SANTOS, P.N., MANIER, B.S.M.L., FONSECA, A.H. Ticks (Acari: Ixodidae) and lice (Phthiraptera: Trichodectidae) infesting free-living coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with sylvatic and synanthropic habits in the Atlantic rainforest of Southern Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v. 22, p. 779–784, 2017.

MARTINS, T.F., MILANELO, L., KRAWCZAK, F.S., FURUYA, H.R., FITORRA, L.S., DORES, F.T., PEDRO, V.S., HIPOLITO, A.G., LABRUNA, M.B. Diversity of ticks in the wildlife screening center of São Paulo city, Brazil. **Ciência Rural**, v.47, p. 1-6, 2017.

MCINTOSH, D., BEZERRA, R.A., LUZ, H. R., FACCINI, J.L.H., GAIOTTO, F.A., GINÉ, G.A.F., ALBUQUERQUE, G.R. Detection of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma longirostre* (Acari: Ixodidae) from Bahia state, Northeast Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, p. 879-883, 2015.

OLIFIERS, N., BIANCHI, R. C., D'ANDREA, P.S., MOURÃO, G., GOMPPER, M. E. Estimating age of carnivores from the Pantanal region of Brazil. **Wildlife Biology**, v. 16, p. 389-399, 2010.

PAROLA, P., MATSUMOTO, K., SOCOLOVSCHI, C., PARZY, D., RAOULT, D. A tick-borne rickettsia of the spotted-fever group, similar to *Rickettsia amblyommii*, in French Guyana. **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 101, p. 185-188, 2007.

PAROLA, P., ROVERY, C., ROLAIN, J.M., BROUQUI, P., DAVOUST, B., RAOULT, D. *Rickettsia slovaca* and *R. raoultii* in tick-borne rickettsioses. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, p. 1105–1108, 2009.

PAROLA, P., PADDOCK, C.D., SOCOLOVSCHI, C., LABRUNA, M.B., MEDIANNIKOV, O., KERNIF, T., ABDAD, M.Y., STENOS, J., BITAM, I., FOURNIER, P.E., RAOULT, D.

Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 657–702, 2013.

PORTA, F.S., NIETO, E.A., CREUS, B.F., ESPIN, T.M., CASANOVA, F.J., SALA, I.S., GARCIA, S.L., AGUILAR, J.L., VILASECA, M.Q. Tick-borne lymphadenopathy: a new infectious disease in children. **Pediatric Infectious Diseases Journal**, v. 27, p. 618–622, 2008.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, v. 173, p. 1576-1589, 1991.

RODRIGUES, A.F.S.F., DAEMON, E., MASSARD, C.L. Ectoparasites of *Nasua nasua* (Carnivora, Procyonidae) from an urban Forest in Southeastern Brazil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p.969-971, 2006.

ROUX, V., D. RAOULT. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer membrane protein *rOmpB* (*ompB*). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1449-1455, 2000.

SABATINI, G.S., PINTER, A., NIERI-BASTOS, F.A., MARCILI, A., LABRUNA, M.B. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their *Rickettsia* in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, p. 913-916, 2010.

SAITO, T.B., CUNHA-FILHO, N.A., PACHECO, R.C., FERREIRA, F., PAPPEN, F.G., FARIAS, N.A.R., LARSSON, C. E., LABRUNA, M.B. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, p. 102–108, 2008.

SANTOLIN, I.D.A.C. **Estudo de carrapatos associados com aves no entorno do Tinguá, Nova Iguaçu, Rio de Janeiro, Brasil; detecção de Rickettsia spp., e o desenvolvimento de métodos moleculares para análise de interações carrapato-microrganismo**. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2014.

SARAIVA, D.G., NIERI-BASTOS, F.A., HORTA, M.C., SOARES, H.S., NICOLA, P.A., PEREIRA, L.C.M., LABRUNA, M.B. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, northeastern Brazil: isolation, transovarial transmission, and transtadial perpetuation. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 13, p. 615-8, 2013.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1111–1113, 2007.

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

SPOLIDORIO, M. G., LABRUNA, M. B., MANTOVANI, E., BRANDÃO, P., RICHTZENHAIN, L. J. AND YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsioses, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 521–523, 2010.

SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde). Febre Maculosa Brasileira. *In: Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso*. 8ª edição. Brasília: Editora MS, p. 184-187, 2010.

SZABÓ, M. P. J., PINTER, A., LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-9, 2013a.

SZABÓ, M.P.J., NIERI-BASTOS, F.A., SPOLIDORIO, M.G., MARTINS, T.F., BARBIERI, A.M. & LABRUNA, M.B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, p. 719–728, 2013b.

ZERINGÓTA, V., MATURANO, R., LUZ, H.R., SENRA, T.O.S., DAEMON, E., FACCINI, J.L.H., MCINTOSH, D. Molecular detection of *Rickettsia rhipicephali* and other spotted fever group *Rickettsia* species in *Amblyomma* ticks infesting wild birds in the state of Minas Gerais, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, p. 81–89, 2017.

3 CONCLUSÕES GERAIS

Quatis de hábitos selvagens e sinantrópicos nas áreas turísticas do PNI são altamente infestados por ectoparasitos, principalmente por carrapatos *A. coelebs*, agindo também como hospedeiros e dispersores de carrapatos vetores de patógenos, como *A. ovale* e *H. juxtakochi*. Esses animais também são hospedeiros de piolhos *Neotrichodectes pallidus*.

Os quatis do PNI apresentam importância ecológica para manutenção de carrapatos infectados por *Rickettsia* sp., *Rickettsia bellii* e *Rickettsia amblyommatis*.

Quatis são infectados por *Rickettsia rhipicephali*, demonstrando que também participam diretamente da epidemiologia desse agente no PNI.

4 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGERAMI, R. N. et al. Brazilian Spotted Fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 252-4, 2006.
- BARBIERI, A.R.M., FILHO, J.M., NIERI-BASTOSA, F.A., SOUZA JR., J.C., SZABÓ, M.P.J., LABRUNA, M.B. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 848–853, 2014.
- BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M. & BECHARA, B.H.. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 223 p., 2006.
- CARMICHAEL, J. R.; FUERST, P. A. Molecular Detection of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montanensis*, and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* Tick from Nature. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 2, p. 111-5, 2010.
- CUTLER, S.J., BONILLA, E.M., SINGH, R.J. Population Structure of East African Relapsing Fever *Borrelia* spp. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 1076-1080, 2010.
- CASTELLAW, A. H.; CHENNEY, E. F.; VARELA-STOKES, A. S. Tick-Borne Disease Agents in Various Wildlife from Mississippi. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 4, p. 439-442, 2011.
- CHEIDA, C. C., SANTOS, L. B. Ordem Carnivora. In: REIS, N. R. et al. (eds). **Mamíferos do Brasil – guia de identificação**. 1 ed. Rio de Janeiro: Technical Books Editora, 528p., 2010.
- EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the Neotropics. The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolívia, Brazil**. 1 ed., v. 3, Chicago: The University of Chicago Press, 624p., 1999.
- ESTEVAM, L.G.T.M. **Avaliação de hemoparasitos e ectoparasitos em quatis (Procyonidae: *Nasua nasua*) no Parque das Mangabeiras, Belo Horizonte, Minas Gerais**. 2017. 68f. Dissertação (mestrado em Parasitologia), Programa de Pós-graduação em Parasitologia, Universidade Federal de Minas Gerais, MG.
- FERNANDES, C.R., GARCIA, H. (eds.) **Parque Nacional do Iguaçu: Patrimônio natural da humanidade**. São Paulo, Ipsis Gráfica e Editora, p. 256. 2011.
- GARCIA, M.V., SILVA, D.C., ALMEIDA, R.F.C., CUNHA, R.C., MATIAS, J., BARROS, J.C., ANDREOTTI, R., SZABÓ, M.J.P. Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, p. 124-128, 2013.
- HERRERA, H. M., DÁVILA, A. M. R., NOREK, A., ABREU, U. G., SOUSA, S. S., ANDREA, P. S. D., JANSEN, A. M.. Enzootiology of *Trypanosoma evansi* in Pantanal, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 125, p. 263-275, 2004.

HERRERA, H. M., LISBOA, C. V., PINHO, A. P., OLIFIERS, N., BIANCHI, R. C., ROCHA, F. L., MOURÃO, G. M., JANSEN, A. M. The coati (*Nasua nasua*, Carnivora, Procyonidae) as a reservoir host for the main lineages of *Trypanosoma cruzi* in the Pantanal region, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, p. 1133-9, 2008.

ICMBio (Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade) (2016). **Dados de visitação (2007–2015), Ranking de visitantes 2012–2015**. Disponível em http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/Dados_de_visita%C3%A7%C3%A3o_DCO_M.pdf (acesso em 16 de outubro de 2016).

INOUE K, KABEYA H, FUJITA H, MAKINO T, ASANO M, INOUE S, INOKUMA, H., NOGAMI, S., MARUYAMA, S. Serological survey of five zoonoses, scrub typhus, Japanese spotted fever, tularemia, Lyme disease, and Q fever, in feral raccoons (*Procyon lotor*) in Japan. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 11, p. 15-19, 2011.

JORGE, R. S. P., ROCHA, F. L., MAY-JUNIOR, J. A., MORATO, R. G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. **Oecology Australis**, v. 14, p. 686-710, 2010.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R. et al. *Leishmania (Viannia) shawi* sp.n., a parasite of monkeys, sloths and procyonids in Amazonian Brazil. **Annals of parasitology human and compared**, v. 64, n. 3, p. 200-7, 1989.

LEMOS, E.R.S. et al. Epidemiological Aspects of the Brazilian Spotted Fever: Serological Survey of Dogs and Horses in an Endemic Area in the State of São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo v.38, n. 6, p.427-430, 1996.

LINARDI, P.M., GUIMARÃES, L.R. Sifonápteros do Brasil. São Paulo, Museu de Zoologia USP/FAPESP, 291 p., 2000.

MAGALHÃES-MATOS, P.C., CUNHA-SANTOS, R., SOUSA, P.G.S., SAMPAIO-JÚNIOR, F.D., BARROS, F.N.L.B., MOURÃO, F.R.P., OLIVEIRA, W.B.L., GABRIEL, A. M. G., MONTEIRO, S.G.M., GÓES-CAVALCANTE, G., SCOFIELD, A. Molecular detection of *Trypanosoma evansi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in procyonids (Carnivora: Procyonidae) in Eastern Amazon, Brazil. **Ciência Rural**, v.46, p.663-668, 2016.

MERHEJ, V., RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biological Reviews**, v. 86, p. 379–405, 2010.

MORAES, M.F.D., SILVA, M.X.S., MAGALHÃES-MATOS, P.C., ALBUQUERQUE, A.C.A., TEBALDI, J.H., MATHIAS, L.A., HOPPE, E.G.L. Filial nematodes with zoonotic potential in ring-tailed coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766, Carnivora: Procyonidae) and domestic dogs from Iguazu National Park, Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 8, p. 1–9, 2017.

MMA (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE). **Mata Atlântica**. 2018. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>>. Acesso em 02 de janeiro de 2018.

MYERS, N., MITTERMEIER, R. A., MITTERMEIER, C. G., FONSECA, G. A. B., KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853-858, 2000.

PAROLA, P., PADDOCK, C.D., SOCOLOVSKI, C., LABRUNA, M.B., MEDIANNIKOV, O., KERNIF, T., ABDAD, M.Y., STENOS, J., BITAM, I., FOURNIER, P.E., RAOULT, D. Update on Tick-Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 657–702, 2013.

PIRANDA, E. M. et al. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 103, n. 7, p. 696-701, 2008.

RODRIGUES, A.F.S.F., DAEMON, E. & MASSARD, C. L. Morphological and morphometrical characterization of gametocytes of *Hepatozoon procyonis* Richards, 1961 (Protista, Apicomplexa) from a Brazilian wild procyonid *Nasua nasua* and *Procyon cancrivorus* (Carnivora, Procyonidae). **Parasitology Research**, v. 100, p. 347-350, 2007.

SANGIONI, L. A. Rickettsias. In: MONTEIRO, S. G. **Parasitologia na Medicina Veterinária**, 1ª edição. São Paulo: Roca., 2010, p. 169-179.

SOUZA, C.E., MORAES-FILHO, J., OGRZEWALSKA, M., UCHOA, F.C., HORTA, M.C., SOUZA, S.S., BORBA, R.C., LABRUNA, M.B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 116–121, 2009.

SPOLIDORIO, M. G., LABRUNA, M. B., MANTOVANI, E., BRANDÃO, P., RICHTZENHAIN, L. J. AND YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsioses, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 521–523, 2010.

SVS/MS (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde). Febre Maculosa Brasileira. In: **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso**. 8ª edição. Brasília: Editora MS, p. 184-187, 2010.

SZABÓ, M. P. J., PINTER, A., LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 1-9, 2013a.

SZABÓ, M.P.J., NIERI-BASTOS, F.A., SPOLIDORIO, M.G., MARTINS, T.F., BARBIERI, A.M. & LABRUNA, M.B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, p. 719–728, 2013b.

TUFF, D.W. A key to lice of man and domestic animals. **Texas Journal of Science**, 28, 145–159, 1977.

VICENTE, J.J. et al. Nematóides do Brasil. Parte V: Nematóides de mamíferos. Revista Brasileira de Zoologia, v. 14, p. 170, 185, 1997.

ANEXOS

Anexo I – Artigo publicado referente ao capítulo I.

Anexo II – Declaração de aprovação – CEUA – IV.

Anexo III – Autorização para atividades com finalidade científica - ICMBio.

Anexo IV – Modelo da ficha de coleta de amostras biológicas a campo.

Anexo V – Protocolo de extração de DNA (Fenol/Fenol-clorofórmio) segundo Santolin (2014).

Anexo VI – Contigs das amostras sequenciadas de *Rickettsia* spp.

Article

Ticks (Acari: Ixodidae) and lice (Phthiraptera: Trichodectidae) infesting free-living coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with sylvatic and synanthropic habits in the Atlantic rainforest of Southern Brazil

PAULO C. MAGALHÃES-MATOS¹, MARCELA F. D. MORAES², JAQUELINE R. A. VALIM¹, GUSTAVO N. S. CASTRO¹, PRISCILLA N. SANTOS¹, BRUNA S. M. L. MANIER¹ & ADIVALDO H. FONSECA¹

¹ Parasitic Diseases Laboratory, Department of Epidemiology and Public Health, Federal Rural University of Rio de Janeiro – UFRRJ, Rodovia BR-465, Km 7, Zipcode 23891-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil.

² Postgraduate Program in Preventive Veterinary Medicine, College of Agricultural and Veterinary Sciences, Estadual Paulista University – UNESP, Access way Prof. Paulo Donato Castellane, s/n, Zipcode 14887-900, Jaboticabal, São Paulo, Brazil.

E-mail: adivaldofonseca@yahoo.com

Abstract

This research describes the infestation by ticks and lice in free-living coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) with sylvatic and synanthropic habits living at the Iguazu National Park (INP), state of Paraná, southern Brazil. During the months of September 2014 and from March to April 2015, ticks and lice were collected from 86 free-living coatis from INP. Among the animals analyzed, 99% (85/86) were infested with ectoparasites, *Amblyomma* spp. larvae (n=23), nymphs of *Amblyomma brasiliense* (n=77), *Amblyomma coelebs* (n=427) and *Haemaphysalis juxtakochi* (n=6) being observed, as well as *Amblyomma ovale* adults (n=46). Lice were found in lower prevalence (13%, 11/86), nymphs (n=31) and adults (n=9) of *Neotrichodectes pallidus*. Summary results show feral coatis with sylvatic and synanthropic habits as competent hosts for ixodid ticks and lice, arthropods responsible for the transmission of pathogens for carnivores, others wildlife and humans. This paper presents the first record of *H. juxtakochi* infesting coatis in Brazil.

Key words: Procyonidae, Ticks, lice, Atlantic forest, Iguazu National Park, Brazil

Introduction

Ticks, lice, and fleas are considered the main arthropods infesting animals. These ectoparasites are important not only because they suck blood and/or cause epithelial lesions in hosts, but also because of the ability some species have to transmit pathogens to animals, including humans (Tuff 1977, Linardi & Guimarães 2000, Barros-Battesti *et al.* 2006). Wild animals present a substantial diversity of species of ectoparasites (Barros-Battesti *et al.* 2006), although not much is known about the epidemiology of such infestations in different regions of Brazil.

The Iguazu National Park (INP) is one of the largest conservation areas of the Atlantic forest, comprising 457,794 acres. It comprises the Iguazu Falls (Cáceres 2011), receiving annually around 1.5 million visitors from many regions of the world (ICMBio 2016). INP has a very diverse fauna, deserving highlight mammals such as the jaguar, tapir, coati, deer, agouti, and the collared peccary, among other species. The coatis (*Nasua nasua* Linnaeus, 1766) are carnivores from the Procyonidae family, widely distributed all over South America, and it is one of the species presenting the largest synanthropy in the areas of visitation at the INP, especially near the viewpoint of the Iguazu falls (Cáceres 2011).

Anexo II – Declaração de aprovação – CEUA – IV.



Seropédica 14 de julho de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 058/2014 intitulado “**Pesquisa molecular e sorológica de *Borrelia* spp. e *Rickettsia* spp. em *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) de hábitos antrópicos em diferentes regiões brasileiras.**” encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Adivaldo Henrique da Fonseca. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 14 de julho de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott

Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva

Vice-Coodenador CEUA-IV

Anexo III – Autorização para atividades com finalidade científica - ICMBio.



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

| | | |
|--|-----------------------------------|------------------------------------|
| Número: 43614-3 | Data da Emissão: 24/08/2016 10:00 | Data para Revalidação*: 23/09/2017 |
| * De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão. | | |

Dados do titular

| | |
|--|--------------------------|
| Nome: Paulo Cesar Magalhães Matos | CPF: 956.208.182-68 |
| Título do Projeto: Pesquisa molecular e sorológica de hemoparasitos em <i>Nasua nasua</i> (Carnívora: Procyonidae) do Brasil | |
| Nome da Instituição: UFRRJ - UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO | CNPJ: 29.427.465/0001-05 |

Cronograma de atividades

| # | Descrição da atividade | Início (mês/ano) | Fim (mês/ano) |
|---|---|------------------|---------------|
| 1 | Captura dos animais e coleta de amostras biológicas | 06/2014 | 10/2017 |
| 2 | Processamento das amostras em laboratório | 07/2014 | 01/2018 |

Observações e ressalvas

| | |
|---|---|
| 1 | As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia. |
| 2 | Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso. |
| 3 | Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior. |
| 4 | A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). |
| 5 | O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> . |
| 6 | O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor. |
| 7 | Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospeção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen . |
| 8 | Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade. |

Outras ressalvas

| | |
|---|--|
| 1 | 1) Os trabalhos de campo devem ser agendados com as chefias das UC's com antecedência mínima de 15 dias para que sejam informadas as ressalvas e especificidades de cada uma, sendo acordados os procedimentos e atividades possíveis. 2) Todos os equipamentos e estruturas de apoio, bem como marcações e sinalizações, deverão ser retirados ao término das atividades. 3) No Parna Tijuca, os pesquisadores deverão portar cópia da autorização e estar devidamente identificados, por meio de crachá e/ou uniforme, sempre que comparecerem à UC para realizar as atividades. 4) No Parna Iguaçu, todas as atividades que envolvam captura e contenção química dos animais deverão ser comunicadas, para que técnicos envolvidos com o Projeto Carnívoros do Iguaçu (projeto institucional do parque) acompanhem e possam coletar amostras de sangue /parasitas, conforme objetivo do referido projeto. 5) Na Flona de Tefé o pesquisador deve solicitar autorização para as comunidades ribeirinhas localizadas nas áreas onde serão feitas as viagens de campo. 6) No Parna Itatiaia sugere-se ler o Boleim do Pesquisador nº13 além de uma prévia discussão sobre o manuseio dos quilts. |
|---|--|

Equipe

| # | Nome | Função | CPF | Doc. Identidade | Nacionalidade |
|---|-------------------------|-------------|----------------|------------------------|---------------|
| 1 | Marcio Barizon Cepeda | Colaborador | 095.636.037-88 | 124937509 IFF-RJ | Brasileira |
| 2 | Briuna de Azevedo Baêta | Colaborador | 101.354.697-08 | 201804135 DETRAN-RJ-RJ | Brasileira |
| 3 | Carolina Mirota Ribeiro | Colaborador | 095.775.117-67 | 020292850-3 DETRAN-RJ | Brasileira |

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 56133453



Página 1/4

Anexo IV – Modelo da ficha de coleta de amostras biológicas a campo.



Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Instituto de Veterinária - Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública
Laboratório de Doenças Parasitárias

Projeto: “Pesquisa de carrapatos e *Rickettsia* spp. em *Nasua nasua* (Carnivora: Procyonidae) de hábitos selvagens e sinantrópicos”

Coleta N° _____

Local: _____

Data: _____ **Equipe:** _____

Responsável pelo local da coleta: _____

Identificação: _____

Sexo: _____ Idade: _____

Histórico (origem): _____

Contenção e inspeção

Anestesia: _____

Temperatura: _____ FC: _____ FR: _____

Sinais clínicos: _____

Biometria

Dentição: _____ Canino superior: _____ Canino inferior: _____

Peso: _____ Cabeça: _____ Corpo: _____ Cauda: _____

Membro anterior: _____ Circ. torácica: _____ Circ. pescoço: _____

Ambiente

() Vida Livre. Bioma: _____

() Cativeiro. Características: _____

Contato com outros animais: () Não. () Sim: _____

Proximidade com humanos: _____

Material coletado

() Sangue total () Soro () Esfregaço sanguíneo () Ectoparasitos

() Fezes () Pele () Órgãos () Outros

Informações adicionais: _____

Anexo V – Protocolo de extração de DNA (Fenol/Fenol-clorofórmio) segundo Santolin (2014).

- 1 - Colocar os carrapatos em um tubo com tampa de rosca autoclavado. Lavá-los 1x com hipoclorito de sódio 1%, 1x em álcool 70% e 3x em PBS (ou HBSS).
- 2 – Acrescentar 50µg de beads autoclavados (para larva e ninfa) OU 7 esferas de zircônio [2,0 a 2,5 mm] autoclavadas (para adultos).
 - Opção para adultos: Cortar o carrapato, macerar com pistilo e adicionar os minibeads, mantendo os tubos sobre um bloco frio.
- 3 – Acrescentar 200 microlitros de HBSS. Triturar por 60 segundos no Minibeadbeater.
- 4 – Dar um spin. Adicionar 200 microlitros de Digest buffer 2X concentrado + 20 microlitros de Proteinase K (e 50 microlitros de CaCl₂ [50 mM], caso o Digest utilizado não tenha).
- 5 – Deixar a temperatura de 56 graus Celsius por no mínimo 3 horas.
 - Opção para adultos: Overnight
- 6 – Centrifugar na velocidade de 16000xg por um minuto (ou dar um spin).
- 7 – Retirar 400 microlitros do tubo e adicionar em um novo tubo com 200 microlitros de HBSS.
- 8– Adicionar 600 microlitros de Fenol em capela de exaustão, inverter o tubo 5x (agitar vigorosamente).
- 9 – Centrifugar por 5 minutos a 16000 xg.
- 10 – Aliquotar 550 microlitros do sobrenadante para outro tubo.
- 11 – Colocar 550 microlitros de Fenol-clorofórmio em capela de exaustão, inverter o tubo 5x.
- 12 – Centrifugar por 5 minutos a 16000 x g.
- 13 – Aliquotar 500 microlitros do sobrenadante para outro tubo.
 - Opção para larvas e ninfas: Adicionar 10 microlitros de tRNA (diluído em PBS na proporção 1:10)
- 14 – Colocar 500 microlitros de Isopropanol.
- 15- Aguardar 20 minutos a temperatura ambiente.
- 16 – Centrifugar por 20 minutos 16000 xg.
- 17 – Observe a formação do “pellet”. Jogue fora o sobrenadante.
- 18 – Adicione 500 microlitros de etanol 70% gelado, inverter 5x.
- 19 – Centrifugar por 5 min a 16000 xg.
- 20 – Despreze o sobrenadante.
- 21 – Adicione 500 microlitros de etanol 70% gelado, inverter 5x.
- 22 – Centrifugar por 5 min a 16000x g.
- 23 – Despreze novamente o sobrenadante.
- 24 – Secar em papel toalha e colocar a 70 graus Celsius por 5 minutos para secar o álcool.
- 25 – Adicionar 50 microlitros de TE 1X.
- 26 – Deixar o DNA em geladeira (2-8 graus Celsius) em “over night” e no dia seguinte colocar a 56°C por 15 minutos, homogeneizar e armazenar em freezer até o processamento.
 - Opção: 65°C por uma hora e armazenar em freezer até o processamento.

Anexo VI – *Contigs* das amostras sequenciadas de *Rickettsia* spp.

GENE *htrA*

- **Hospedeiro:** *Nasua nasua*

Amostra: Quati 74

Sequência:

5'GTTGGCGGCATGCATTACCGTATGCTTTTTGTTGTTTTCCGCCTATTACAACCTGTTTGAG
TGTACTIONACGGCAATATTGACCGGTGCTATTTCTATAAGTTTTATTAGGTGTTATGTAACC
GTAATTGCCGTTATCCGGATTACGCCATTCTACGTTACTACCGCTAGGAGCTGTTTCTAAA
GCTCTCTGTGAGGTAAGTTCTGCAAGTCTTCTATCCTGCTCATCCATACCTGCACCGATTT
GTCCACCAAGAACTGCTCCAAGTAATGCACCTACACCTACTCCAACAAGCTGTCTTTGC
CCTTACCGAATTGAGAACCAAGTAATGCACCTCCAGCACCGCCAAGAAGTGTTCTGTAC
CTTGTTTATTCATACCGCCCGGACTGTTACAGGCTTGTAACATAGAAGCTGCAAGAGCTA
TAATCATAATTTTAGATAATAGTTTTCATATAATTCTCTCTAAATTAATATATAA3'

GENE *gltA*

- **Hospedeiro:** *Nasua nasua*

Amostra: Quati 74

Sequência:

5'GAACATTTGCGACGGTATACCCATAGCTTTATAGATAATACCCGAATAAAAATCAACAT
TTGGATATAATTTTCTCTCAATAAAAATATTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGTTCTAT
TGCTATTTGTAAGAGCGGATTGTTGTCTAGCTGCCCGAGTTCCTTTAATACTTCTTTGCAC
GTTTCTTTAAGTACTGCGGCACGCGGGTCATAGTTTTTATATATACGATGACCAAACCCA
TTAACCTAAATGGATCATTTTTTATCCTTAGCTTTAGCTATATATTTAGGAATATACTCTGA
ACTACCGATTTCTTTAAGCATATTTATTACCACTTCATTAGCCCCGCCGTGAGCAGGTCCC
CAAAGTGAGGCAATACCTGTGCTAATACAAGCAAAGGGTTAGCTCCGGATGAGCCGGC
AATTCGGACTIONTTGAAGTAGAAGCATTCTGCTCATGATCGGCATGTAGGATAAATATCTT
ATTAAGAGCATTTTTTATTATTGGATTTACTTTATATTTTCGTACAAGGCGTTGCAAACATC
ATATGCAGAAAATTTTCGGTAAAATCTAACGAATTATCAGGATAAATAAACGGTTGTCCT
ATAGAATATTTA3'

- **Hospedeiro:** *Amblyomma ovale*

Amostra: 5

Sequência:

5'GCGGGGGGTATACCCATCGCTTTATAAATAATACCCGAATAAAAATCAACGTTTGGATA
TAATTTTCTCTCAATAAAAATACTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGCTCTATCGCTATT
TGTAAGTAATGGGTTGTTATCTAGCTGCCCTAATTCTTTTAAACACCTCCTTGCAGGTCTCTTT
AAGCACTIONCGCACGCGGATCATAGTTTTTATATACACGATGACCAAAGCCCATTAGCCT
AAAATTATCATTTTTTATCTTTAGCTTTTCGCTATATATTTAGGTATATTCTCTACACTGCCTA
TTCTTTTCAGCATATTTATCACTGCTTCATTAGCCCCGCCATGAGCAGGACCCCAAAGCGA
TGCAATACCAGTACTGACGCAAGCAAAGGGTTAGCTCCTGAAGAGCCGGCAATTCTGA

CTGTTGAAGTAGAAGCATTGCTCATGATCAGCATGTAAAATAAATATCTTGTTAAGG
CATTGTTTACTGATTACTTTATATTTTTCACAAGGTGTGGCAAACATCATATGCAA
GAAATTTTCAGTAAAATCTAAAGAATTATCGGGATAAACAAAAGGCTGACCTATAGAAT
ATTTATAAGACATTGCAGCAATAGTTGGTATTTTAGCTATCATTCTAATAGCTGTAAGTTC
ATAATCC3'

Amostra: 8

Sequência:

5'TGTGAACATCTGCGGGGTATACCCATCGCTTTATAAATAATACCCGAATAAAAAATCAA
CGTTTGGATATAATTTTCTCTCAATAAAAATACTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGCTC
TATCGCCATTTTAGTAATGGGTTGTTATCTAGCTGCCCTAATTCTTTTAACACCTCCTTGC
AGGCTCTTTAAGCACTGCCGCACGCGGATCATAGTTTTATATACACGATGACCAAAGC
CCATTAGCCTAAAATTATCATTGTTATCTTTAGCTGTCGCTATATATTTAGGTATATTCTCT
ACACTGCCTATTTCTTTCAGCATATTTATCACTGCTTCATTAGCCCCGCCATGAGCAGGAC
CCCAAAGCGATGCAATACCAGTACTGACGCAAGCAAAAAGGGTTAGCTCCTGAAGAGCCG
GCAATTCTGACTGTTGAAGTAGAAGCATTGCTCATGATCAGCATGTAAAATAAATATC
TTGTTAAGGCATTTTACTGATTACTTTATATTTTTCACAAGGTGTGGCAAACAT
CATATGCAAGAAATTTTCAGTAAAATCTAAAGAATTATCGGGATAAACAAAAGGCTCACC
TATAGAATATTTATAAGACATTGCAGCAATAGTTGGTATTTTAGCTATCATTCTAATAGCT
GTAAGTTCATAATCCGCTTCTTTAAAAAAT3'

Amostra: 16

Sequência:

5'GGGGTATACCCATCGCTTTATAAATAATACCCGAATAAAAAATCAACGTTTGGATATAAT
TTTCTCTCAATAAAAATACTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGCTCTATCGCTATTTGTA
GTAATGGGTTGTTATCTAGCTGCCCTAATTCTTTTAACACCTCCTTGCAGGTCTCTTTAAG
CACTGCCGCACGCGGATCATAGTTTTATATACACGATGACCAAAGCCATTAGCCTAAA
ATTATCATTGTTATCTTTAGCTTTTCGCTATATATTTAGGTATATTCTCTACACTGCCTATTT
CTTTCAGCATATTTATCACTGCTTCATTAGCCCCGCCATGAGCAGGACCCCAAAGCGATG
CAATACCAGTACTGACGCAAGCAAAAAGGGTTAGCTCCTGAAGAGCCGGCAATTCTGACT
GTTGAAGTAGAAGCATTGCTCATGATCAGCATGTAAAATAAATATCTTGTTAAGGCA
TTTTTACTGATTACTTTATATTTTTCACAAGGTGTGGCAAACATCATATGCAAGA
AATTTTCAGTAAAATCTAAAGAATTATCGGGATAAACAAAAGGCTGACCTATAGAATATT
TATAAGACATTGCAGCAATAGTTGGTATTTTAGCTATCATTCTAATAGCTGTAAGTTCATA
ATCC3'

Amostra: 17

Sequência:

5'TATAAATAATACCCGAATAAAAAATCAACGTTTGGATATAATTTTCTCTCAATAAAAATAC
TCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGCTCTATCGCCATTTTAGTAATGGGTTGTTATCTA
GCTGCCCTAATTCTTTTAACACCTCCTTGCAGGTCTCTTTAAGCACTGCCGCACGCGGATC
ATAGTTTTATATACACGATGACCAAAGCCATTAGCCTAAAATTATCATTGTTTATCTTTA
GCTGTCGCTATATATTTAGGTATATTCTCTACACTGCCTATTTCTTTCAGCATATTTATCAC
TGCTTCATTAGCCCCGCCATGAGCAGGACCCCAAAGCGATGCAATACCAGTACTGACGCA
AGCAAAAAGGGTTAGCTCCTGAAGAGCCGGCAATTCTGACTGTTGAAGTAGAAGCATTG
CTCATGATCAGCATGTAAAATAAATATCTTGTTAAGGCATTTTACTGATTACT
TTATATTTTTCACAAGGTGTGGCAAACATCATATGCAAGAAATTTTCAGTAAAATCTAAA

GAATTATCGGGATAAACAAAAGGCTCACCTATAGAATATTTATAAGACATTGCAGCAATA
GTTGGTATTTTAGCTATCATTCTAATAGCTGTAAGTTCATAATCCGCT3'

Amostra: 22

Sequência:

5'CGGGGGTATACCCATCGCTTTATAAATAATACCCGAATAAAAATCAACGTTTGGATATA
ATTTTCTCTCAATAAAATACTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGCTCTATCGCTATTTG
TAGTAATGGGTTGTTATCTAGCTGCCCTAATTCTTTTAACACCTCCTTGCAGGTCTCTTTAA
GCACTGCCGCACGCGGATCATAGTTTTTATATACACGATGACCAAAGCCCATTAGCCTAA
AATTATCATTTTTATCTTTAGCTTTTCGCTATATATTTAGGTATATTCTCTACACTGCCTATT
TCTTTCAGCATATTTATCACTGCTTCATTAGCCCCGCCATGAGCAGGACCCCAAAGCGATG
CAATACCAGTACTGACGCAAGCAAAGGGTTAGCTCCTGAAGAGCCGGCAATTCTGACT
GTTGAAGTAGAAGCATTGCTCATGATCAGCATGTAATAAATAATATCTTGTTAAGGCA
TTTTTTATTACTGGATTTACTTTATATTTTTTACAAGGTGTGGCAAACATCATATGCAAGA
AATTTTCAGTAAAATATAAAGAATTATCGGGATAAACAAAAGGCTGACCTATAGAATATT
TATAAGACATTGCAGCAATAGTTGGTATTTTAGCTATCATTCTAATAGCTGTAAGTTCATA
ATCCGCTTCTTTAA3'

Amostra: 39

Sequência:

5'GGGGGTATACCCATCGCTTTATAAATAATACCCGAATAAAAATCAACGTTTGGATATAA
TTTTCTCTCAATAAAATACTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGCTCTATCGCCATTTTT
AGTAATGGGTTGTTATCTAGCTGCCCTAATTCTTTTAACACCTCCTTGCAGGTCTCTTTAA
GCACTGCCGCACGCGGATCATAGTTTTTATATACACGATGACCAAAGCCCATTAGCCTAA
AATTATCATTTTTATCTTTAGCTGTCGCTATATATTTAGGTATATTCTCTACACTGCCTATT
TCTTTCAGCATATTTATCACTGCTTCATTAGCCCCGCCATGAGCAGGACCCCAAAGCGATG
CAATACCAGTACTGACGCAAGCAAAGGGTTAGCTCCTGAAGAGCCGGCAATTCTGACT
GTTGAAGTAGAAGCATTGCTCATGATCAGCATGTAATAAATAATATCTTGTTAAGGCA
TTTTTTATTACTGGATTTACTTTATATTTTTTACAAGGTGTGGCAAACATCATATGCAAGA
AATTTTCAGTAAAATCTAAAGAATTATCGGGATAAACAAAAGGCTCACCTATAGAATATT
TATAAGACATTGCAGCAATAGTTGGTATTTTAGCTATCATTCTAATAGCTGTAAGTTCATA
ATCCGCTTCTTTAAAAAATTCAGCA3'

- **Hospedeiro:** *Amblyomma coelebs*

Amostra: 138

Sequência:

5'TCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGTTCTATTGCTATTTGTAAGAGC
GGATTGTTGTCTAGCTGCCCGAGTTTCTTTAATACTTCTTTGCACGTTTCTTTAAGTACTGC
GGCAGCGGGTCATAGTTTTTATATACACGATGACCAAACCCATTAACCTAAATGGATC
ATTTTTATCCTTAGCTTTAGCTATATATTTAGGAATATACTCAGAACTACCGATTTCTTTAA
GCATATTTATTACCGCTTCATTAGCCCCGCCGTGAGCAGGTCCCCAAAGTGAGGCAATAC
CCGTGCTAATAACAAGCAAAGGGTTAGCTCCGGATGAGCCGGCAATTCGGACTGTTGAA
GTAGAAGCATTCTGCTCATGATCGGCATGTAGGATAAATAATCTTATTAAGAGCATTTTTTA
TTATTGGATTTACTTTATATTTTCGTACAAGGCGTTGCAAACATCATATGCAGAAAATTTTC

GGTAAAATCTAACGAATTATCAGGATAAATAAACGGTTGTCCTATAGAATATTTATAAGA
CATTGCGGCAATGGTAGGTATCTTAGCAATCATTCTAATAGCGGTAAGTTCGTAATC3'

Amostra: 159

Sequência:

5'GTGAACATTTGCGACGGTATACCCATAGCTTTATAGATAATACCCGAATAAAAATCAAC
ATTTGGATATAATTTTCTCTCAATAAAAATATTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGTTCT
ATTGCTATTTGTAAGAGCGGATTGTTGTCTAGCTGCCCGAGTTCCTTTAATACTTCTTTGC
ACGTTTCTTTAAGTACTGCGGCACGCGGGTCATAGTTTTTATATACACGATGACCAAAC
CCATTAACCTAAATGGATCATTTTTATCCTTAGCTTTAGCTATATATTTAGGAATATACTC
AGA ACTACCGATTTCTTTAAGCATATTTATTACCGCTTCATTAGCCCCGCCGTGAGCAGGT
CCCCAAAGTGAGGCAATACCCGTGCTAATAACAAGCAAAGGGTTAGCTCCGGATGAGCC
GGCAATTCGACTGTTGAAGTAGAAGCATTCTGCTCATGATCGGCATGTAGGATAAATAT
CTTATTAAGAGCATTTTTTATTATTGGATTTACTTTATATTTTCGTACAAGGCGTTGCAAAC
ATCATATGCAGAAAATTTTCGGTAAAATCTAACGAATTATCAGGATAAATAAACGGTTGT
CCTATAGAATATTTATAAGACATTGCGGCAATGGTAGGTATCTTAGCAATCATTCTAATA
GCGGTAAGTTCGTAATCTGCTTCCTTAAAATTCAATAAA3'

Amostra: 160

Sequência:

5'ACATTTGCGACGGTATACCCATAGCTTTATAGATAATACCCGAATAAAAATCAACATTT
GGATATAATTTTCTCTCAATAAAAATATTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGTTCTATTG
CTATTTGTAAGAGCGGATTGTTGTCTAGCTGCCCGAGTTCCTTTAATACTTCTTTGCACGT
TTCTTTAAGTACTGCGGCACGCGGGTCATAGTTTTTATATACACGATGACCAAACCCATT
AACCTAAATGGATCATTTTTATCCTTAGCTTTAGCTATATATTTAGGAATATACTCAGAAC
TACCGATTTCTTTAAGCATATTTATTACCGCTTCATTAGCCCCGCCGTGAGCAGGTCCCCA
AAGTGAGGCAATACCCGTGCTAATAACAAGCAAAGGGTTAGCTCCGGATGAGCCGGCAA
TTCGACTGTTGAAGTAGAAGCATTCTGCTCATGATCGGCATGTAGGATAAATATCTTATT
AAGAGCATTTTTTATTATTGGATTTACTTTATATTTTCGTACAAGGCGTTGCAAACATCATA
TGCAGAAAATTTTCGGTAAAATCTAACGAATTATCAGGATAAATAAACGGTTGTCCTATA
GAATATTTATAAGACATTGCGGCAATGGTAGGTATCTTAGCAATCATTCTAATAGCGGTA
AGTTCGTAATCTGCTTCCTTAAAATTCAATA3'

Amostra: 206

Sequência:

5'GTGAACATTTGCGACGGTATACCCATAGCTTTATAGATAATACCCGAATAAAAATCAAC
ATTTGGATATAATTTTCTCTCAATAAAAATATTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGTTCT
ATTGCTATTTGTAAGAGCGGATTGTTGTCTAGCTGCCCGAGTTCCTTTAATACTTCTTTGC
ACGTTTCTTTAAGTACTGCGGCACGCGGGTCATAGTTTTTATATACACGATGACCAAAC
CCATTAACCTAAATGGATCATTTTTATCCTTAGCTTTAGCTATATATTTAGGAATATACTC
AGA ACTACCGATTTCTTTAAGCATATTTATTACCGCTTCATTAGCCCCGCCGTGAGCAGGT
CCCCAAAGTGAGGCAATACCCGTGCTAATAACAAGCAAAGGGTTAGCTCCGGATGAGCC
GGCAATTCGACTGTTGAAGTAGAAGCATTCTGCTCATGATCGGCATGTAGGATAAATAT
CTTATTAAGAGCATTTTTTATTATTGGATTTACTTTATATTTTCGTACAAGGCGTTGCAAAC
ATCATATGCAGAAAATTTTCGGTAAAATCTAACGAATTATCAGGATAAATAAACGGTTGT
CCTATAGAATATTTATAAGACATTGCGGCAATGGTAGGTATCTTAGCAATCATTCTAATA
GCGGTAAGTTCGTAATCTGCTTCCTTAAAATTCAATAAA3'

Amostra: 273

Sequência:

5'CCGTGAACATTTGCGACGGTATACCCATAGCTTTATAGATAAATACCCGAATAAAAAATCA
ACATTTGGATATAATTTTCTCTCAATAAAATATTCATCTTTAAGAGCGATAGCTTCAAGTT
CTATTGCTATTTGTAAGAGCGGATTGTTGTCTAGCTGCCCCGAGTTCCTTTAATACTTCTTTG
CACGTTTCTTTAAGTACTGCGGCACGCGGGTCATAGTTTTTATATACACGATGACCAAAA
CCCATTAACCTAAATGGATCATTTTTATCCTTAGCTTTAGCTATATATTTAGGAATATACT
CAGAACTACCGATTTCTTTAAGCATATTTATTACCGCTTCATTAGCCCCGCCGTGAGCAGG
TCCCCAAAGTGAGGCAATACCCGTGCTAATACAAGCAAAAGGGTTAGCTCCGGATGAGC
CGGCAATTCGGACTGTTGAAGTAGAAGCATTCTGCTCATGATCGGCATGTAGGATAAATA
TCTTATTAAGAGCATTTTTTATTATTGGATTTACTTTTATATTTTCGTACAAGGCGTTGCAAAC
ATCATATGCAGAAAATTTTCGGTAAAATCTAACGAATTATCAGGATAAATAAACGGTTGT
CCTATAGAATATTTATAAGACATTGCGGCAATGGTAGGTATCTTAGCAATCATTCTAATA
GCGGTAAGTTCGTAATCTGCTTCTTAAAATTCAATAAATCAGGATAAAAATGCCGA3'

GENE *ompA*

- **Hospedeiro:** *Amblyomma coelebs*

Amostra: 138

Sequência:

5'ATCGGCAGGAGCATCAAAACCATGATTTGCAGCAACAGCATTAGTACCGTTTAAAGTTA
AGCTTTTGCCGGCAGTAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCTCCCGTCACAATCGAACCAA
CGACGGTATTTGAGTAATATTTAGACCTACGGGAGTAGTACCCGCAACATTTATAGCCG
TAATAATACGACCGGCTTCATTTGCAGTGATAGTATGATCACCACCGTAAGTAAATGCC
TATTGTCTTGAGGACCGTTAGCAGGAGTACCATTAGCTACCCCTTCAGCCGTTATCTCATT
CCAATTATTGACAGCAGCAAGATCATTAAATGCTGCATTATTAGTAGAAATAACACCTGC
AGCAACACCGAGTGCCCCGCTACTACTCAGCATTATCGCTGCAGTTGAGGTGGTGAATAA
AGCGGCTTTAAGAC3'

Amostra: 159

Sequência:

5'TCGGCAGGAGCATCAAAACCATGATTTGCAGCAACAGCATTAGTACCGTTTAAAGTTAA
GCTTTTGCCGGCAGTAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCTCCCGTCACAATCGAACCAAC
GACGGTATTTGAGTAATATTTAGACCTACGGGAGTAGTACCCGCAACATTTATAGCCGT
AATAATACGACCGGCTTCATTTGCAGTGATAGTATGATCACCACCGTAAGTAAATGCCCT
ATTGTCTTGAGGACCGTTAGCAGGAGTACCATTAGCTACCCCTTCAGCCGTTATCTCATT
CAATTATTGACAGCAGCAAGATCATTAAATGCTGCATTATTAGTAGAAATAACACCTGCA
GCAACACCGAGTGCCCCGCTACTACTCAGCATTATCGCTGCAGTTGAGGTGGTGAATAA

Amostra: 160

Sequência:

5'TCGGCAGGAGCATCAAAACCATGATTTGCAGCAACAGCATTAGTACCGTTTAAAGTTAA
GCTTTTGCCGGCAGTAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCTCCCGTCACAATCGAACCAAC

GACGGTATTTTGAGTAATATTTAGACCTACGGGAGTAGTACCCGCAACATTTATAGCCGT
AATAATACGACCGGCTTCATTTGCAGTGATAGTATGATCACCACCGTAAGTAAATGCCCT
ATTGTCTTGAGGACCGTTAGCAGGAGTACCATTAGCTACCCCTTCAGCCGTTATCTCATT
CAATTATTGACAGCAGCAAGATCATTAAATGCTGCATTATTAGTAGAAATAACACCTGCA
GCAACACCGAGTGCCCCGCTACTACTCAGCATTATCGCTGCAGTTGAGGTGGTGAATAAA
GCGGCTTTAAGAC3'

Amostra: 206

Sequência:

5' AACCTGTATAATTATCGGCAGGAGCATCAAACCATGATTTGCAGCAACAGCATTAGTA
CCGTTTAAAGTTAAGCTTTTGCCGGCAGTAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCTCCCGTC
ACAATCGAACCAACGACGGTATTTTGAGTAATATTTAGACCTACGGGAGTAGTACCCGCA
ACATTTATAGCCGTAATAATACGACCGGCTTCATTTGCAGTGATAGTATGATCACCACCG
TAAGTAAATGCCCTATTGTCTTGAGGACCGTTAGCAGGAGTACCATTAGCTACCCCTTCA
GCCGTTATCTCATTCCAATTATTGACAGCAGCAAGATCATTAAATGCTGCATTATTAGTAG
AAATAACACCTGCAGCAACACCGAGTGCCCCGCTACTACTCAGCATTATCGCTGCAGTTG
AGGTGGTGAATAAAGCGGCTTTAAGACCTTGTGTAT3'

Amostra: 273

Sequência:

5' TGTATAATTATCGGCAGGAGCATCAAACCATGATTTGCAGCAACAGCATTAGTACCGT
TTAAAGTTAAGCTTTTGCCGGCAGTAATAGTAACAGGCAACAAGTTACCTCCCGTCACAA
TCGAACCAACGACGGTATTTTGAGTAATATTTAGACCTACGGGAGTAGTACCCGCAACAT
TTATAGCCGTAATAATACGACCGGCTTCATTTGCAGTGATAGTATGATCACCACCGTAAG
TAAATGCCCTATTGTCTTGAGGACCGTTAGCAGGAGTACCATTAGCTACCCCTTCAGCCGT
TATCTCATTCCAATTATTGACAGCAGCAAGATCATTAAATGCTGCATTATTAGTAGAAAT
AACACCTGCAGCAACACCGAGTGCCCCGCTACTACTCAGCATTATCGCTGCAGTTGAGGT
GGTGAATAAAGCGGCTTTAAGACCT3'

Amostra: 519

Sequência:

5' TATTTCTAAACCTGTATAATTATCGGCAGGAGCATCAAACCATGATTTGCAGCAACA
GCATTAGTACCGTTTAAAGTTAAGCTTTTGCCGGCAGTAATAGTAACAGGCAACAAGTTA
CCTCCCGTCACAATCGAACCAACGACGGTATTTTGAGTAATATTTAGACCTACGGGAGTA
GTACCCGCAACATTTATAGCCGTAATAATACGACCGGCTTCATTTGCAGTGATAGTATGA
TCACCACCGTAAGTAAATGCCCTATTGTCTTGAGGACCGTTAGCAGGAGTACCATTAGCT
ACCCCTTCAGCCGTTATCTCATTCCAATTATTGACAGCAGCAAGATCATTAAATGCTGCAT
TATTAGTAGAAATAACACCTGCAGCAACACCGAGTGCCCCGCTACTACTCAGCATTATCG
CTGCAGTTGAGGTGGTGAATAAAGCGGCTTTA3'

Amostra: 521

Sequência:

5' TTATATTTCTAAACCTGTATAATTATCGGCAGGAGCATCAAACCATGATTTGCAGCA
ACAGCATTAGTACCGTTTAAAGTTAAGCTTTTGCCGGCAGTAATAGTAACAGGCAACAAG

TTACCTCCCGTCACAATCGAACCAACGACGGTATTTTGAGTAATATTTAGACCTACGGGA
GTAGTACCCGCAACATTTATAGCCGTAATAATACGACCGGCTTCATTTGCAGTGATAGTA
TGATCACCACCGTAAGTAAATGCCCTATTGTCTTGAGGACCGTTAGCAGGAGTACCATTA
GCTACCCCTTCAGCCGTTATCTCATTCCAATTATTGACAGCAGCAAGATCATTAAATGCTG
CATTATTAGTAGAAATAACACCTGCAGCAACACCGAGTGCCCCGCTACTACTCAGCATT
TCGCTGCAGTTGAGGTGGTGAATAAAGCGGCTTTAAGACCTTGTGT3'

Amostra: 524

Sequência:

5'TATTCCTAAACCTGTATAATTATCGGCAGGAGCATCAAACCATGATTTGCAGCAACA
GCATTAGTACCGTTTAAAGTTAAGCTTTTGCCGGCAGTAATAGTAACAGGCAACAAGTTA
CCTCCCGTCACAATCGAACCAACGACGGTATTTTGAGTAATATTTAGACCTACGGGAGTA
GTACCCGCAACATTTATAGCCGTAATAATACGACCGGCTTCATTTGCAGTGATAGTATGA
TCACCACCGTAAGTAAATGCCCTATTGTCTTGAGGACCGTTAGCAGGAGTACCATTAGCT
ACCCCTTCAGCCGTTATCTCATTCCAATTATTGACAGCAGCAAGATCATTAAATGCTGCAT
TATTAGTAGAAATAACACCTGCAGCAACACCGAGTGCCCCGCTACTACTCAGCATTATCG
CTGCAGTTGAGGTGGTGAATAAAGCGGCTTTAAGAC3'

GENE *ompB*

- **Hospedeiro:** *Amblyomma coelebs*

Amostra: 138

Sequência:

5'CATTCTTACTTAATAATACTAATCTACCCGTACCTTCTGTTCCATTAATAATAGTAG
CACCACCTGCTTGTAATTTAAAGCATTACCGACAGTAGCATTAGTATTGAAAATGAAAC
CTTGACCGTCACCGATATTAATTGCCTTAACAGTAGCAAACTTTTATCTGAACTTGAAT
AAATCCATTAGTAACATTTAATGTACCGTTAGCACCATTAACTATTAAGCATTCTTTCCA
AGTGTAAGAGGAGCCTTTTGAGTTGTAGGATTTGCTAAATTAATACTAATGTAGAAGCC
GCAGCACCCAAGTCTATTGTTCCCTACACCGCTAAGATCATTATTATCAATAGCAACACCA
CCATTAATTTGTGCAACAACATTTTGAGCATTTTTTGTAAACAGCAGCTTGTGCATTAGTAA
TACCTTGACCTGTTATAGTAAGAGTTTTACCGGCATCAAGAGTAAAGTTAAAGGAGTTAG
CGTTATTAACAGCATTAGTGATGAACCCTAAGGTGGTATCTTCATTCACTGTCAGTCTAA
ATTGTTTGCAGTATTTAAAAACAACCGTTAAACTACCGGCTGGAGTATTTAAATTAAT
ACCATTATTAGCATTAGCAGTAATAACTGCATTTAGAGCAACCGCAACATTTGCAGCAGC
GGCAGCTTGGTCAAATCCTACACCA3'

Amostra: 159

Sequência:

5'GTAGCAGCACCATTCTTACTTAATAATACTAATCTACCCGTACCTTCTGTTCCATTAATA
TTAATAGTAGCACCACCTGCTTGTAATTTAAAGCATTACCGACAGTAGCATTAGTATTG
AAAATGAAACCTTGACCGTCACCGATATTAATTGCCTTAACAGTAGCAAACTTTTATCT
GAACTTGAATAAATCCATTAGTAACATTTAATGTACCGTTAGCACCATTAACTATTA
GCATTCTTTCCAAGTGTAAGAGGAGCCTTTTGAGTTGTAGGATTTGCTAAATTAATACTA
ATGTAGAAGCCGCAGCACCCAAGTCTATTGTTCCCTACACCGCTAAGATCATTATTATCAA

TAGCAACACCACCATTAAATTGTGCAACAACATTTTGAGCATTTTTTGTAACAGCAGCTTG
TGCATTAGTAATACCTTGACCTGTTATAGTAAGAGTTTTACCGGCATCAAGAGTAAAGTT
AAAGGAGTTAGCGTTATTAACAGCATTAGTGATGAACCCTAAGGTGGTATCTTCATTCAC
TGTCACTGCTAAATTGTTTGCAGTATTTAAAAACAAACCGTTAAAACCTACCGGCTGGAGT
ATTTAAATTAATACCATTATTAGCATTAGCAGTAATAACTGCATTTAGAGCAACCGCAAC
ATTTGCAGCAGCGGCAGCTTGGTCAAATCCTACACCATCAACAGTTGTTCGCAACTCCGTT
TGTTGTTCTATTCTGCTGTGTAGCAGCACCCATAGCTGAACCTGC3'

Amostra: 160

Sequência:

5'GTCGGTAGCAGCACCATTCTTACTTAATAATACTAATCTACCCGTACCTTCTGTTCCATT
AAAATTAATAGTAGCACCACCTGCTTGTAATTTAAAGCATTACCGACAGTAGCATTAGT
ATTGAAAATGAAACCTTGACCGTCACCGATATTAATTGCCTTAACAGTAGCAAAACTTTT
ATCTGAAACTTGAATAAATCCATTAGTAACATTTAATGTACCGTTAGCACCATTAACTATT
AAAGCATTCTTTCCAAGTGTAAGAGGAGCCTTTTGAGTTGTAGGATTTGCTAAATTAAT
ACTAATGTAGAAGCCGCAGCACCCAAGTCTATTGTTCCCTACACCGCTAAGATCATTATTA
TCAATAGCAACACCACCATTAAATTGTGCAACAACATTTTGAGCATTTTTTGTAACAGCA
GCTTGTGCATTAGTAATACCTTGACCTGTTATAGTAAGAGTTTTACCGGCATCAAGAGTA
AAGTTAAAGGAGTTAGCGTTATTAACAGCATTAGTGATGAACCCTAAGGTGGTATCTTCA
TTCCTGTCACTGCTAAATTGTTTGCAGTATTTAAAAACAAACCGTTAAAACCTACCGGCTG
GAGTATTTAAATTAATACCATTATTAGCATTAGCAGTAATAACTGCATTTAGAGCAACCG
CAACATTTGCAGCAGCGGCAGCTTGGTCAAATCCTACACCATCA3'

Amostra: 206

Sequência:

5'TCGGTAGCAGCACCATTCTTACTTAATAATACTAATCTACCCGTACCTTCTGTTCCATTA
AAATTAATAGTAGCACCACCTGCTTGTAATTTAAAGCATTACCGACAGTAGCATTAGTA
TTGAAAATGAAACCTTGACCGTCACCGATATTAATTGCCTTAACAGTAGCAAAACTTTTA
TCTGAAACTTGAATAAATCCATTAGTAACATTTAATGTACCGTTAGCACCATTAACTATTA
AAGCATTCTTTCCAAGTGTAAGAGGAGCCTTTTGAGTTGTAGGATTTGCTAAATTAATA
CTAATGTAGAAGCCGCAGCACCCAAGTCTATTGTTCCCTACACCGCTAAGATCATTATTATC
AATAGCAACACCACCATTAAATTGTGCAACAACATTTTGAGCATTTTTTGTAACAGCAGC
TTGTGCATTAGTAATACCTTGACCTGTTATAGTAAGAGTTTTACCGGCATCAAGAGTAAA
GTTAAAGGAGTTAGCGTTATTAACAGCATTAGTGATGAACCCTAAGGTGGTATCTTCATT
CACTGTCACTGCTAAATTGTTTGCAGTATTTAAAAACAAACCGTTAAAACCTACCGGCTGG
AGTATTTAAATTAATACCATTATTAGCATTAGCAGTAATAACTGCATTTAGAGCAACCGC
AACATTTGCAGCAGCGGCAGCTTGGTCAAATCCTACACCATC3'

Amostra: 273

Sequência:

5'TCGGTAGCAGCACCATTCTTACTTAATAATACTAATCTACCCGTACCTTCTGTTCCATTA
AAATTAATAGTAGCACCACCTGCTTGTAATTTAAAGCATTACCGACAGTAGCATTAGTA
TTGAAAATGAAACCTTGACCGTCACCGATATTAATTGCCTTAACAGTAGCAAAACTTTTA
TCTGAAACTTGAATAAATCCATTAGTAACATTTAATGTACCGTTAGCACCATTAACTATTA
AAGCATTCTTTCCAAGTGTAAGAGGAGCCTTTTGAGTTGTAGGATTTGCTAAATTAATA
CTAATGTAGAAGCCGCAGCACCCAAGTCTATTGTTCCCTACACCGCTAAGATCATTATTATC
AATAGCAACACCACCATTAAATTGTGCAACAACATTTTGAGCATTTTTTGTAACAGCAGC

TTGTGCATTAGTAATACCTTGACCTGTTATAGTAAGAGTTTTACCGGCATCAAGAGTAAA
GTTAAAGGAGTTAGCGTTATTAACAGCATTAGTGATGAACCCTAAGGTGGTATCTTCATT
CACTGTCACTGCTAAATTGTTTGCAGTATTTAAAAACAAACCGTTAAAACCTACCGGCTGG
AGTATTTAAATTAATACCATTATTAGCATTAGCAGTAATAACTGCATTTAGAGCAACCGC
AACATTTGCAGCAGCGGCAGCTTGGTCAAATCCTACACCATCA3'

Amostra: 519

Sequência:

5'GGTAGCAGCACCATTCTTACTTAATAATACTAATCTACCCGTACCTTCTGTTCCATTAAA
ATTAATAGTAGCACCACCTGCTTGTAATTTAAAGCATTACCGACAGTAGCATTAGTATT
GAAAATGAAACCTTGACCGTCACCGATATTAATTGCCTTAACAGTAGCAAAACTTTTATC
TGAAACTTGAATAAATCCATTAGTAACATTTAATGTACCGTTAGCACCATTAACTATTAA
AGCATTCTTTCCAAGTGTAAGAGGAGCCTTTTGAGTTGTAGGATTTGCTAAATTAATACT
AATGTAGAAGCCGCAGCACCCAAGTCTATTGTTCCCTACACCGCTAAGATCATTATTATCA
ATAGCAACACCACCATTAATTTGTGCAACAACATTTTGTGACATTTTTTGTAAACAGCAGCTT
GTGCATTAGTAATACCTTGACCTGTTATAGTAAGAGTTTTACCGGCATCAAGAGTAAAGT
TAAAGGAGTTAGCGTTATTAACAGCATTAGTGATGAACCCTAAGGTGGTATCTTCATTCA
CTGTCACTGCTAAATTGTTTGCAGTATTTAAAAACAAACCGTTAAAACCTACCGGCTGGAG
TATTTAAATTAATACCATTATTAGCATTAGCAGTAATAACTGCATTTAGAGCAACCGCAA
CATTTGCAGCAGCGGCAGCTTGGTCAAATCCTACACCATCAACAGTTGTCGCAACTCCGT
TTGTTGTTCTATTCTGCTGTGTAGCAGCACCCATAGCTGAACCTGCAAAA3'

Amostra: 521

Sequência:

5'AGTCGGTAGCAGCACCATTCTTACTTAATAATACTAATCTACCCGTACCTTCTGTTCCAT
TAAAATTAATAGTAGCACCACCTGCTTGTAATTTAAAGCATTACCGACAGTAGCATTAG
TATTGAAAATGAAACCTTGACCGTCACCGATATTAATTGCCTTAACAGTAGCAAAACTTT
TATCTGAAACTTGAATAAATCCATTAGTAACATTTAATGTACCGTTAGCACCATTAACTAT
TAAAGCATTCTTTCCAAGTGTAAGAGGAGCCTTTTGAGTTGTAGGATTTGCTAAATTAAT
ACTAATGTAGAAGCCGCAGCACCCAAGTCTATTGTTCCCTACACCGCTAAGATCATTATTA
TCAATAGCAACACCACCATTAATTTGTGCAACAACATTTTGTGACATTTTTTGTAAACAGCA
GCTTGTGCATTAGTAATACCTTGACCTGTTATAGTAAGAGTTTTACCGGCATCAAGAGTA
AAGTTAAAGGAGTTAGCGTTATTAACAGCATTAGTGATGAACCCTAAGGTGGTATCTTCA
TTCCTGTCACTGCTAAATTGTTTGCAGTATTTAAAAACAAACCGTTAAAACCTACCGGCTG
GAGTATTTAAATTAATACCATTATTAGCATTAGCAGTAATAACTGCATTTAGAGCAACCG
CAACATTTGCAGCAGCGGCAGCTTGGTCAAATCCTACACCATCAACA3'

Amostra: 524

Sequência:

5'ACCATTCTTACTTAATAATACTAATCTACCCGTACCTTCTGTTCCATTAAAATTAATAGT
AGCACCACCTGCTTGTAATTTAAAGCATTACCGACAGTAGCATTAGTATTGAAAATGAA
ACCTTGACCGTCACCGATATTAATTGCCTTAACAGTAGCAAAACTTTTATCTGAAACTTGA
ATAAATCCATTAGTAACATTTAATGTACCGTTAGCACCATTAACTATTAAGCATTCTTTC
CAAGTGTAAGAGGAGCCTTTTGAGTTGTAGGATTTGCTAAATTAATACTAATGTAGAAG
CCGCAGCACCCAAGTCTATTGTTCCCTACACCGCTAAGATCATTATTATCAATAGCAACAC
CACCATTAATTTGTGCAACAACATTTTGTGACATTTTTTGTAAACAGCAGCTTGTGCATTAGT
AATACCTTGACCTGTTATAGTAAGAGTTTTACCGGCATCAAGAGTAAAGTTAAAGGAGTT

AGCGTTATTAACAGCATTAGTGATGAACCCTAAGGTGGTATCTTCATTCACTGTCACTGCT
AAATTGTTTGCAGTATTTAAAAACAAACCGTTAAACTACCGGCTGGAGTATTTAAATTA
ATACCATTATTAGCATTAGCAGTAATAACTGCATTTAGAGCAACCGCAACATTTGCAGCA
GCGGCAGCTTGGTCAAATCCTACACCATCAACA3'