

**UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
PROGRAMA DE MESTRADO EM MEDICINA E BEM ESTAR ANIMAL**

Tânia Regina Vieira de Carvalho

**“Pesquisa sorológica em cães e pesquisa molecular em carrapatos para
Febre Maculosa Brasileira no município de Itu - SP”**

São Paulo
2017

Tânia Regina Vieira de Carvalho

“Pesquisa sorológica em cães e Pesquisa molecular em carrapatos para Febre Maculosa Brasileira no município de Itu - SP”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade de Santo Amaro – UNISA como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof. Dr. Jonas Moraes Filho

São Paulo

2017

Tânia Regina Vieira de Carvalho

“Pesquisa sorológica em cães e Pesquisa molecular em carrapatos para Febre Maculosa Brasileira no município de Itu - SP”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal.

São Paulo, de de 20.....

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Conceito Final

Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais



PARECER N.º 28.1/2016

Projeto: Pesquisa sorológica para detecção de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e *R. belli* em cães atendidos no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) no município de Itu, SP"

Responsável pela solicitação: Prof. Jonas Moraes Filho/Tania Regina Vieira

Prezado responsável:

Ao se proceder à análise do processo em questão, coube a seguinte deliberação:

O Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais (**CEUA-UNISA**), está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca) que estabelece os procedimentos para o uso científico de animais no país e a Lei Estadual nº 11.977/05 que institui o Código de Proteção aos Animais do Estado de São Paulo, manifestando-se pela **APROVAÇÃO** do projeto acima citado.

* Prezados Pesquisadores e CEUA solicita:

- Relatório da pesquisa ao término do prazo estipulado no cronograma do projeto.
- Ser informado sobre qualquer alteração na metodologia informada no Projeto de Pesquisa.

São Paulo, 16 de novembro de 2016.

PROFA. DRA. VALÉRIA CASTILHO ONOFRIO
Coordenadora do Comitê de Ética no Uso de Animais - CEUA
UNISA - Universidade de Santo Amaro

Autorizo a publicação parcial ou total deste trabalho desde que citada a fonte.

CARVALHO, Tânia Regina Vieira.

Pesquisa Sorológica em cães e pesquisa molecular em carrapatos para Febre Maculosa Brasileira no município de Itu- SP / Tânia Regina Vieira. CARVALHO. -- São Paulo, 2017
48 f.

Tese (Programa de mestrado em medicina e Bem-Estar Animal) -
Universidade de Santo Amaro, 2018

Orientador(a): Jonas MORAES-FILHO

1.cães. 2.Carrapatos. 3.Imunofluorência Indireta. 4.Biologia Molecular Rickettsia rickettsii. I.MORAES-FILHO, Jonas, orient.
II.Universidade de Santo Amaro III.Titulo

**Ficha catalográfica gerada automaticamente pelo
Sistema de Bibliotecas da Universidade de Santo Amaro – UNISA**

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais que me deram meu bem maior que é a vida e me ensinaram a ser honesta, humilde e persistente.

Ao meu orientador Prof. Dr. Jonas Moraes Filho pela dedicação, pela paciência em me lapidar e principalmente por acreditar em meu potencial e me ajudar a realizar esse sonho.

Ao Departamento de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP, chefiado por Dr. Marcelo Bahia Labruna, pelo uso das instalações para que a parte experimental fosse realizada e por todo o apoio.

Ao Dr. Ariovaldo Nunes, pela amizade e por fornecer material essencial para a realização desse trabalho.

Ao Dr. André Ariza pela parceria neste trabalho, agradeço imensamente pelo profissionalismo e consideração.

A todos os professores da UNISA, em especial ao Prof. Dr. Arlei Marcili por me presentear com seus conhecimentos e toda a colaboração nesse trabalho.

Ao Dr. Adriano Pinter pela ajuda inestimável e por me ensinar a ver com outros olhos essa dissertação.

A Dr.(a) Natalie de Barros Pereira por toda a contribuição e dedicação.

Ao grupo AGROPET de Itu, pela parceria e amizade.

Ao Dr. Giovanni Cortijo Ceratti pela ajuda inestimável.

Ao grupo de iniciação científica da UNISA, orientados pelo Prof. Dr. Jonas Moraes Filho.

A Dr.(a) Amanda de Souza por todo apoio e disposição em ajudar em todo o trabalho.

Ao Dr. Thiago Fernandes, muito obrigada.

Ao grupo da Clínica Veterinária Niva pela contribuição.

E agradeço também a todos aqueles que porventura não estejam nesta lista, porque foi graças a essas parcerias que conseguimos realizar este trabalho.

MUITO OBRIGADA.

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho a minha esposa e companheira
Débora Carvalho porque sem ela, nada disso seria possível.
“Que se apaixonar é inevitável, e que as
melhores provas de amor são as mais simples.”
(Mário Quintana)**

RESUMO

A febre maculosa é uma doença grave e letal para o ser humano causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*. Na região metropolitana de São Paulo, onde a população estimada é de 20.000.000 de habitantes, o agente etiológico é transmitido pelo carrapato *Amblyomma aureolatum*, mas no interior deste Estado, o vetor da doença é o *Amblyomma sculptum*. O ciclo epidemiológico de transmissão tem sido intensamente estudado e muitos dados foram gerados na última década, no entanto elos importantes como o papel dos cães, hospedeiros destes carrapatos, ainda necessitam ser elucidados. Este projeto objetivou: a) avaliar a frequência sorológica nos cães atendidos no centro de controle de zoonoses (CCZ) do município de Itu, SP, quanto à presença de anticorpos anti- *Rickettsia rickettsii*; *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia bellii* b) pesquisas moleculares quanto a presença da bactéria do gênero *Rickettsia* em carrapatos coletados em cães. Foram colhidos sangue de 289 cães, sendo 252 da zona urbana e 37 da zona rural; 875 carrapatos, sendo 198 coletados de cães residentes da zona rural e 679 de cães residentes da zona urbana. As espécies encontradas foram *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* e *Amblyomma sculptum*. Foram testados 198 carrapatos da zona rural: a) 20,2% (40/198) dos carrapatos para *Rickettsia* sp. na PCR Real Time; b) 6,06% (12/198) para o gene glta; c) 2,52% (5/198) para o gene ompA na PCR convencional. Na zona urbana foram testados 206 carrapatos: a) 2,9% (6/206) positivos na PCR Real Time para *Rickettsia* sp.; b) 1,94% (4/206) positivaram na PCR convencional para o gene glta; c) 1,45% (3/206) para o gene ompA na PCR convencional. Dentre das 289 amostras que reagiram sorologicamente, 12,8% (37/289) soroconverteram para *Rickettsia* sp.; 8,3% (24/289) para *Rickettsia rickettsii*; 0,4% para *Rickettsia parkeri*; 0,4% para *Rickettsia bellii*. Concluímos com este trabalho que a *Rickettsia rickettsii* é o provável agente dos casos de FMB na cidade de Itu, estado de São Paulo, pois foram encontrados carrapatos infectados para *Rickettsia* sp., e foram encontrados animais sorologicamente positivos para a bactéria do gênero *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*.

Palavras-chaves: Cães, Carrapatos, Imunofluorescência indireta, biologia molecular *Rickettsia rickettsii*

ABSTRACT

The Brazilian spotted fever is a severe and lethal disease for human beings caused by the bacteria *Rickettsia rickettsii*. In the metropolitan area of São Paulo, which its estimated population is of 20.000.000 inhabitants, the etiological agent is transmitted through the tick *Amblyomma aureolatum*, but in the countryside area of this State, the disease vector is the *Amblyomma sculptum*. The epidemiological cycle of transmission has been intensely studied and many data were generated in the last decade, however important links as the role of the dogs, the hosts of these ticks, still needs to be elucidated. The aims of this project are: a) evaluate the frequency of serological tests in dogs treated at the center for zoonosis control in the municipality of Itu, SP, regarding the presence of the antibodies anti- *Rickettsia rickettsii*; *Rickettsia parkeri* and *Rickettsia bellii* b) molecular researches regarding the presence of the bacteria of genus *Rickettsia* in the ticks collected in dogs. It were drawn blood from 289 dogs, which 252 were from urban area and 37 from rural area, 875 ticks, which 198 were collected from the dogs living in the rural area and 679 from the dogs living in the urban area. The species found were *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* and *Amblyomma sculptum*. From the rural area 198 ticks were tested: a) 20,2% (40/198) of the ticks for *Rickettsia* sp in the Real Time PCR; b) 6,06% (12/198) for gene glta; c) 2,52% (5/198) for the gene ompA in the conventional PCR. In the urban area 206 ticks were tested: a) 2,9% (6/206) positives in the Real Time PCR for *Rickettsia* sp.; b) 1,94% (4/206) positive in the conventional PCR for gene glta; c) 1,45% (3/206) for the gene ompA in the conventional PCR. Among the 289 samples that reacted serologically, 12,8% (37/289) seroconverted to *Rickettsia* sp.; 8,3% (24/289) to *Rickettsia rickettsii*; 0,4% to *Rickettsia parkeri*; 0,4% to *Rickettsia bellii*. In this paper, we concluded that the *Rickettsia rickettsii* is the probable agent of the cases of the Brazilian spotted fever in the municipality of Itu, State of São Paulo, because ticks infected with *Rickettsia* sp. were found, and it was found animals that were serologically positives for the bacteria of genus *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*.

Keywords: Dogs. Ticks. Indirect immunofluorescence. Molecular Biology. *Rickettsia rickettsii*.

Lista de Figuras

Figura 1- Status imunitário para Rickettsiose em cães do município de Itu, SP.....	41
Figura 2- Status imunitário para Rickettsiose em cães do município de Itu, SP, distribuído por espécies de riquetsias.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1 - BRASIL - Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 2010-2016.....	30
Tabela 2 - BRASIL - Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas 2010-2016.....	30
Tabela 3 - Espécies de carrapatos encontrados e testados de cães residentes em zona rural e zona urbana da cidade de Itu, SP e processados em testes moleculares.....	38
Tabela 4: Carrapatos positivos na PCR em tempo real para <i>Rickettsia</i> sp. e PCR convencional para os genes <i>gltA</i>, <i>OmpA</i> e <i>OmpB</i>, provenientes de cães da zona rural e urbana do município de Itu, SP.....	39

Lista de Abreviaturas

CCZ	Centro de Controle de Zoonoses
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
FMB	Febre Maculosa Brasileira
GFM	Grupo da Febre Maculosa
TG	Grupo Tifo
TRG	Grupo de Transição
AG	Grupo ancestral
Sin.	Sinonímia
Bepa	Boletim epidemiológico Paulista
°C	Graus Celsius
s.l.	<i>Sensu lato</i>
s.s.	<i>Sensu stricto</i>
SDTF	Floresta Tropical sazonalmente seca
HR	Relative Humidity
Mg	Miligramas
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
<i>GltA</i>	Citrato sintase – ecoding gene
SP	São Paulo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
MG	Minas Gerais
<i>ompA</i>	Outer membrane protein A
<i>ompB</i>	Outer membrane protein B
OSH	Ovariosalpingohisterectomia
Mm	Milímetros
MI	Militros
Km	Quilômetros
FMVZ-USP	Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Cão doméstico	13
1.2 Vetores	14
1.2.1 Carrapatos	14
1.2.2 Complexo <i>Amblyomma cajennense</i>	15
1.2.3 <i>Amblyomma sculptum</i>	17
1.2.4 <i>Amblyomma aureolatum</i>	19
1.2.5 <i>Amblyomma ovale</i>	20
1.2.6 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	22
1.3 <i>Rickettsia</i> spp	23
1.3.1 <i>Rickettsia rickettsii</i>	24
1.3.2 <i>Rickettsia parkeri</i>	27
1.3.3 <i>Rickettsia bellii</i>	28
2 EPIDEMIOLOGIA	29
3 JUSTIFICATIVA	31
4 OBJETIVOS	32
5 MATERIAIS E MÉTODOS	33
5.1 Fitofisionomia do bioma	33
5.2 Zona urbana e rural de Itu	33
5.3 População alvo	34
5.4 Colheita de materiais	34
5.5 Carrapatos	35
5.6 Extração de DNA	35
5.7 Imunofluorescência Indireta para <i>R.rickettsii</i> , <i>R.parkeri</i> e <i>R.bellii</i>	35
5.8 PCR em tempo Real para <i>Rickettsia</i> spp	35
5.9 PCR Convencional	36
5.10 Cálculo Estatístico	36
6 RESULTADOS	38
6.1 Cães	38
6.2 Carrapatos	38
6.3 Testes Moleculares	39
6.4 Reação de Imunofluorescência Indireta	40
7 DISCUSSÃO	43
8 CONCLUSÃO	47
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48

1. INTRODUÇÃO

1.1 Cão doméstico

A história do cão, *Canis lupus familiaris* pertence a família Canidae e vive com o homem a pelo menos 14 milhões de anos. (WAINE et al.,1997; OSTRANDER; WAINE, 2005; ZRZAVY; RICANKOVÁ, 2004; FOURNIER, 2017). O achado de fósseis dos primeiros cães em sítios arqueológicos por todo o mundo, indicam que, no final do Pleistoceno (Idade do Gelo), os cães já caçavam com os humanos (MOREY, 1994; FOURNIER, 2017).

Durante a Revolução Industrial o sistema social sofreu mudanças rápidas, e nesse processo também houveram modificações nos hábitos alimentares e na forma de trabalhar. E nesse contexto, o cão passou a viver em casas particulares, onde receberam o status de animais de estimação, e isso começou a apenas 150 anos atrás, quando o cão doméstico começou a ser visto como o amigo do homem (UDELL, WYNNE, 2008; UWCT, 2017; FOURNIER, 2017).

No Mundo Moderno os cães seriam um hobby das classes sociais média a alta (RANGE; VIRANYL, 2014) e a serem moldados e novas raças começaram a aparecer constantemente (DRISCOLL; MACDONALD, 2010).

A diversidade cultural e a discrepância entre as classes sociais fizeram com que os cães desenvolvessem diferentes habilidades e papéis que estão intimamente relacionados aos seus proprietários (BUTLER; BINGHAM, 2000; ACOSTA-JAMETT et al., 2010).

Assim como na Europa, o êxodo rural, as mudanças nas relações econômicas e sociais estabelecidas nas áreas urbanas brasileiras contribuíram para as mudanças do cão de zona rural para cão urbano (MARTINEZ et al., 2013).

No Brasil, a proximidade entre áreas urbanas e florestadas significa que seres humanos, animais domésticos e selvagens podem viver na mesma área e competem pelos mesmos recursos oferecidos pelas florestas de diferentes maneiras (OGRZEWALSKA et al., 2009; TORRES; PRADO, 2010; FRIGERI; CASSANO; PARDINI, 2014; LESSA et al., 2016; FOURNIER, 2017).

Os animais domésticos, especialmente o cão, que habitam áreas florestais aumentam o risco de transmissão de doenças e zoonoses (PINTER et al. 2008;

OGRZEWALSKA et al., 2012; MARTINEZ et al., 2013; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; SCINACHI et al., 2017). Esses efeitos são ainda mais agravados pela ausência de monitoramento e cuidados com saúde, alimentação e higiene desses cães por parte dos proprietários (MARTINEZ et al., 2013).

Hoje, cães em áreas florestais e rurais são vistos como um risco potencial para a saúde pública e conservação da biodiversidade (UDELL; WYNNE, 2008; OGRZEWALSKA et al., 2011; BARBIERI et al., 2015; SCINACHI et al., 2017; FOURNIER, 2017). Os cães são animais com grande proximidade com os humanos e podem desempenhar importante papel na cadeia epidemiológica da Febre Maculosa. As características ambientais e a variedade de hospedeiros encontrados em diferentes ecossistemas no Brasil são cruciais para a diversidade de espécies de carrapatos em cães (LABRUNA et al., 2001).

No presente trabalho os cães foram escolhidos por serem importantes sentinelas para a vigilância da FMB em função da sororreatividade por longos períodos, indicando a circulação da bactéria no local nos últimos 6 a 12 meses (PIRANDA et al., 2008).

Os cães comumente são assintomáticos para a Febre maculosa Brasileira, e quando manifestam sintomas esses são febre, anorexia e prostração de 5 a 11 dias após a picada do carrapato.

A riquetsemia varia de 2 a 6 dias e nesse momento os carrapatos que estiverem parasitando esse animal poderão ser infectados. Após o período de riquetsemia os cães soroconvertem e tornam-se imunes (BEP, 2016).

1.2 Vetores

1.2.1 Carrapatos

No Brasil, atualmente a fauna de carrapatos é composta de 69 espécies, divididas em duas famílias, *Ixodidae* (46 espécies) e *Argasidae* (23 espécies) (BARROS-BATTESTI et al., 2015; KRAWCZAK et al., 2015; WOLF et al., 2016). Dessas 69 espécies, 21 são descritas parasitando o humano, sendo estas: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma coelebs*, *Amblyomma dissimile*, *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma*

fuscum, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma japonense*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma parvum*, *Amblyomma romitii*, *Amblyomma scalpturatum*, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma tigrinum*, *Dermatocentor nitens*, *Haemaphysalis juxtakochi*, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (GUGLIELMONE et al., 2006, KRAWCZAK, 2016).

Apesar de 69 metastigmatas comporem a ixodofauna brasileira, apenas 3 espécies comprovadamente são capazes de veicular riquetsias para humanos no Brasil: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma ovale* (PINTER; LABRUNA, 2006; BARBIERI et al., 2014; KRAWCZAK et al., 2014, 2016, SARAIVA et al., 2014; KRAWCZAK, 2016), espécies que compõem o presente trabalho.

Considerando a longevidade excepcional desses artrópodes, poderíamos considerar a possibilidade de estes não serem apenas vetores, mas também reservatórios de agentes infecciosos (LABUDA; NUTTALL, 2004; KRAWCZAK, 2016).

O interesse nesse artrópode tem crescido devido a doenças emergentes e reemergentes transmitidas por eles, incluindo as causadas por *rickettsias*. Nas últimas décadas desde 1988, na região Sudeste do país, houve reemergência das infecções riquettsiais (LABRUNA, 2009), devido a modificações ecológicas como alteração da diversidade e distribuição ecológicas de animais e plantas, medidas de conservação em geral acompanhadas por favoritismo de determinadas espécies em detrimento de outras, incremento do contato de seres humanos com nichos naturais devido ao ecoturismo (OGRZEWALSKA et al., 2011; SILVA et al., 2014; KRAWCZAK, 2016).

1.2.2 Complexo *Amblyomma cajennense*

O táxon *Amblyomma cajennense* vinha sendo considerado uma única espécie distribuída desde o Sul dos Estados Unidos até o Norte da Argentina. Trabalhos recentes e baseados numa avaliação morfológica e genética de diferentes populações de *Amblyomma cajennense* no continente americano, indicaram que *Amblyomma cajennense* é de fato um complexo de pelo menos seis espécies: 1) *Amblyomma cajennense* sensu strito, 2) *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, revalidado, anteriormente conhecido como sinonímia *Amblyomma cajennense*, 3) *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888, revalidado, anteriormente conhecido como sinonímia de

Amblyomma cajennense, 4) *Amblyomma interandinum* n.sp, 5) *Amblyomma patinoi* n.sp.e 6) *Amblyomma tonelliae* n. sp (NAVA et al., 2014, MARTINS et al., 2016).

Segundo Martins et al., (2016), *Amblyomma cajennense* (s.l.) está atualmente representada no Brasil por apenas duas espécies: *Amblyomma cajennense* (s.s.) e *Amblyomma sculpum*.

O *Amblyomma cajennense* (s.s.) é encontrado na borda do bioma Amazônia, na chamada floresta tropical sazonalmente seca (SDTF), não sendo encontrado na parte interna da floresta tropical, pelo fato de não ser bem adaptado as florestas extremamente úmidas. Este carrapato está ausente no bioma do cerrado (Savana brasileira) (MARTINS et al., 2016).

O carrapato *Amblyomma cajennense* parasita muitas espécies entre mamíferos e aves, incluindo o homem (ARAGÃO, 1936; VIEIRA et al., 2004; ONOFRIO et al., 2006; GUGLIELMONE et al., 2014). Se caracteriza por parasitar humanos em maior intensidade que qualquer outra espécie de carrapato no Neotrópico (ARAGÃO, 1936; GUGLIELMONE et al., 2003; GUGLIELMONE et al., 2006; MARTINS, 2014).

Os adultos têm preferência em parasitar grandes mamíferos como equinos, bovinos, antas e capivaras. Outros animais domésticos como búfalo, cão, porco, ovelha, cabra, coelho, assim como mamíferos silvestres de tamanho médio a grande, são também infestados por esta espécie. Existem registros de infestação de aves domésticas como perus e galinhas, além de aves silvestres e alguns répteis, porém o parasitismo nestes hospedeiros não é comum. (GUGLIELMONE et al., 2004; GUGLIELMONE et al., 2014; MARTINS, 2014). Esta espécie comumente ataca o Homem em qualquer fase de seu desenvolvimento (GUIMARÃES; TUCCI; BARROS-BATTESTI; 2001; MARTINS, 2014).

Dada a menor especificidade parasitária das larvas e ninfas, estes são os principais estágios que parasitam os seres humanos. Geralmente, o estágio adulto é mais específico de grandes mamíferos. Quando as populações deste carrapato se apresentam muito numerosas, o estágio adulto é encontrado com mais frequência em outros mamíferos, inclusive humanos.

1.2.3 *Amblyomma sculptum*

A ocorrência de *Amblyomma sculptum* está confirmada nas unidades federativas: Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo; Centro-oeste, Nordeste na Bahia, Sul no Paraná, Santa Catarina e Norte de Rondônia (MARTINS, 2014, 2016) e engloba os biomas de todo o Cerrado e Pantanal; grande parte do bioma da Mata Atlântica (Clima tropical), e em áreas onde a cobertura natural foi degradada (MARTINS et al., 2016).

Nas áreas rurais da região sudeste do Brasil, os equinos são os principais hospedeiros domésticos para todos os estágios do *Amblyomma sculptum* (publicado como *Amblyomma cajennense*), recentemente, as capivaras têm desempenhado o papel de principal hospedeiro silvestre para este carrapato em ambientes antropizados (LABRUNA et al., 2004, VIEIRA et al., 2004; LABRUNA et al., 2013; MARTINS, 2014).

O progresso da degradação da floresta amazônica e da mata atlântica, com substituição da cobertura florestal original pela vegetação do cerrado pode favorecer a expansão do *Amblyomma sculptum* nessas áreas. Um exemplo potencial desta condição é o estado de Rondônia, onde Labruna et al. (2005) não encontrou nenhum *Amblyomma sculptum* durante uma pesquisa de carrapatos por todo o estado entre os anos de 2000 a 2005, mas numa segunda expedição em 2012 havia uma população estabelecida de *Amblyomma sculptum* no município de Pimenta Bueno (MARTINS et al., 2016).

Este cenário de degradação é de extrema importância médica, já que no Brasil o *Amblyomma sculptum* é o vetor mais importante da bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da FMB. A expansão do *Amblyomma sculptum* ao norte do Brasil poderia envolver expansão de outras doenças transmitidas por carrapatos (MARTINS et al., 2016).

Segundo estudo de modelagem ambiental o *Amblyomma cajennense* (s.s.) e o *Amblyomma sculptum* podem sobrepor-se num território devido a algumas semelhanças em variáveis abióticas, chamada aos limites entre o bioma Amazônia e Cerrado, entre o clima Equatorial e Tropical (MARTINS et al., 2016).

O *Amblyomma sculptum* já havia chamado a atenção para o seu polimorfismo genético entre diferentes populações do Sudeste do Brasil, mesmo antes mesmo de ser redescrito (BEATI et al., 2013) e, Gerardi (2016) em seu trabalho comparou o perfil genético e susceptibilidade de populações de carrapatos *Amblyomma sculptum* de áreas endêmicas e não endêmicas para a Febre Maculosa Brasileira frente à infecção por *R. rickettsii*. Ao avaliar a manutenção horizontal da bactéria nos carrapatos de primeira e segunda geração (F1 e F2), foi demonstrado a refratariedade a *R. rickettsii*, visto que a despeito do estágio da exposição à bactéria, as frequências de infecção encontradas nunca foram 100% (GERARDI, 2016), algo que já havia sido evidenciada por Labruna (2008) e SOARES (2012), embora a cepa da bactéria utilizada (cepa Taiacu) não fosse originalmente isolada de espécie de carrapato utilizado no estudo, e sim do *Amblyomma aureolatum*. Labruna (2008) encontrou larvas de *Amblyomma sculptum* de duas populações distintas, uma de área endêmica (Pedreira/SP) e uma área não endêmica (Pirassununga/SP) que se mostraram refratárias à infecção por *R. rickettsii* (cepa Taiacu) destacando-se dos encontrados em larvas de *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus*, cujas frequências de infecção encontradas eram de 90 e 100% (LABRUNA et al., 2008).

Segundo estudos de Soares (2012) e Gerardi (2016) a hipótese levantada foi a de que, a transmissão vertical, por si só não seria capaz de manter uma população de *Amblyomma sculptum* infectada por múltiplas gerações. Além disso o grau de desenvolvimento dos tecidos ovarianos, ou seja, as infecções estabelecidas durante a fase adulta aparentemente não se desenvolvem suficientemente para albergar todas as células germinativas, enquanto as infecções estabelecidas antes, durante a fase larval ou uma geração anterior, resultam em infecção de todas as células germinativas durante a fase adulta (BURGDORFER & BRINTON, 1975; SOARES et al., 2012).

Quando avaliado o efeito deletério nos diferentes estágios de *Amblyomma sculptum*, foi sugerido algum efeito deletério da infecção visto que, na maioria das vezes, houve menor sucesso da ecdise de larvas e ninfas, quando comparados ao grupo controle do trabalho e mesmo não havendo altas taxas de mortalidade dentre os carrapatos infectados, isso impactaria a longo prazo levando a diminuição drástica do número de carrapatos albergando *R. rickettsii*. (GERARDI, 2016).

Especula-se que a infecção por uma cepa de *R. rickettsii* originalmente isolada da espécie de carrapato que se queira estudar, seria mais eficiente, e poderia assim

favorecer a competência vetorial de larvas infectadas verticalmente (GERARDI, 2016).

Os resultados de Gerardi (2016) sugerem susceptibilidade diferenciada entre as populações de *Amblyomma sculptum* estudadas, porém, sem uma relação clara com a endemicidade da área de origem dos carrapatos. Considera-se a possibilidade de algum polimorfismo genético existente também entre cepas de *R. rickettsii* de localidades diferentes poderia influenciar na susceptibilidade à infecção, reforçando a existência de uma melhor adaptação entre cepas das bactérias e do carrapato autóctones. Sendo assim, através dos resultados obtidos por Gerardi (2016), de infecção experimental, a população ITU foi uma das mais susceptíveis à infecção.

1.2.4 *Amblyomma aureolatum*

O *Amblyomma aureolatum* Pallas 1772 é um dos carrapatos mais encontrados parasitando cães domésticos nas áreas rurais do sul e sudeste do Brasil (GUIMARÃES et al., 2001, LABRUNA e PEREIRA, 2001).

Na região metropolitana da cidade de São Paulo, este carrapato é o principal vetor da *Rickettsia rickettsii*, o agente etiológico da Febre Maculosa brasileira (FMB) (GOMES 1933, DIAS e MARTINS, 1939, VALLEJO-FREIRE 1947, PINTER, 2003, PINTER et al., 2004).

A literatura sugere que mamíferos carnívoros especialmente cães (*Canis familiaris*.) e a raposa comedora de caranguejo (*Cerdocyon thous*) são os principais hospedeiros primários para o estágio adulto de *Amblyomma aureolatum* (GUIMARÃES 1945, EVANS et al., 2000; LABRUNA et al., 2001; RODRIGUES et al, 2002; GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004). O estágio adulto deste carrapato parasita os seres humanos, sendo provavelmente este estágio de desenvolvimento que transmite o agente etiológico da FMB (ARAGÃO E FONSECA, 1961; GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004).

A infestação por *Amblyomma aureolatum* em cães no Brasil geralmente caracteriza-se por cargas parasitárias baixas, possivelmente porque fatores naturais controlam a população de carrapatos no meio ambiente (LABRUNA et al., 2000, 2001; LABRUNA e PEREIRA, 2001; PINTER et al., 2004) e, pela baixa densidade do hospedeiro, para o estágio adulto do carrapato (cães e outros carnívoros) e para os

estágios imaturos (animais selvagens) (PINTER et al.,2004). As temperaturas que variam de 23 a 27°C não são um fator limitante para os estágios de desenvolvimento livre do carrapato, desde que a HR (umidade relativa) seja de 95% (PINTER et al., 2004).

A distribuição geográfica de *Amblyomma aureolatum* é restrita a América do Sul (GUGLIELMONE et al., 2003), sendo a grande maioria encontrada em áreas dentro da Floresta Atlântica (PINTER et al. 2004).

Os resultados do estudo de Pinter et al. 2004 fornecem evidências biológicas para discriminar como hospedeiros de estágios imaturos de *Amblyomma aureolatum* as aves, sugerindo que estes animais e cães podem ser os hospedeiros primários para o carrapato em condições naturais. O mesmo estudo sugere um papel potencial de cobaias selvagens (*Cavia aperea*) também como hospedeiros para os estágios imaturos. Essas cobaias são roedores selvagens endêmicos prevalentes em muitos países da América do Sul e sudeste do Brasil (CIMARDI, 1996; PINTER et al., 2004).

Labruna et al. (2008) demonstraram que larvas de *Amblyomma aureolatum* e *Rhiphicephalus sanguineus* tiveram frequências de infecção por *Rickettsia rickettsii* (cepa Taiaçu) que variaram de 90 e 100%, diferentemente de duas populações de larvas de *Amblyomma sculptum* de área endêmica (Pedreira/SP) e uma área não endêmica (Pirassununga/ SP) se mostraram refratárias a mesma infecção.

Avaliando a relação *Amblyomma aureolatum*- *Rickettsia rickettsii* Labruna et al. (2011) demonstraram total susceptibilidade desta espécie de carrapato à infecção obtendo valores para a manutenção vertical de 100% por 4 gerações de laboratório.

Embora o *Amblyomma aureolatum* seja mais eficiente quando comparado ao *Amblyomma sculptum* na manutenção da *Rickettsia rickettsii* (SOARES et al, 2012), a transmissão vertical por si só também não é capaz de manter populações de carrapatos infectados, visto que fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma aureolatum* tiveram alta mortalidade e baixo desempenho reprodutivo quando infectadas (efeitos deletérios da infecção) (LABRUNA et al., 2011).

1.2.5 *Amblyomma ovale*

Os carrapatos adultos *Amblyomma ovale* exigem comportamento não-nidícola de emboscada sendo encontrados na vegetação em sua maioria a 30-40 cm acima

do solo, altura compatível com mamíferos com médio a grande porte. As larvas e ninfas procuram hospedeiros em nível de solo, compatível com seu parasitismo natural em pequenos mamíferos e aves que se alimentam no solo (LABRUNA et al., 2009; OGRZEWALSKA et al., 2009; SZABÓ et al., 2009, SZABÓ et al., 2012).

A espécie Cricetidae *Calomys callosus*, foi o hospedeiro mais adequado para larvas de *Amblyomma ovale*, enquanto que outras espécies de Cricetidae *Nectomys squamipes* (rato d'água) foram hospedeiros mais adequados para ninfas de *Amblyomma ovale* (MARTINS et al., 2012a). Estudos de James et al., 1972 e, Guglielmono e Nava 2011, sugeriram que pequenos roedores podem ser os principais hospedeiros de larvas e ninfas de *Amblyomma ovale* em condições naturais, corroborando o estudo de Martins et al., 2012 (MARTINS et al., 2012a).

As aves passeriformes foram encontradas sendo parasitadas por larvas e ninfas de *Amblyomma ovale* no sudeste do Brasil, tendo um papel significativo na dispersão de carrapatos entre diferentes áreas geográficas (MARTINS et al., 2012a).

Os cães domésticos mostraram ser altamente adequados para a fase adulta de *Amblyomma ovale*. Em geral, as fêmeas ingurgitadas recuperadas de cães pesaram cerca de 1000mg e convertidas a mais de 60% do seu peso em ovos, que eram férteis e esses resultados reforçaram que estes animais são atualmente um dos hospedeiros mais importantes de carrapatos adultos *Amblyomma ovale* na América Latina (GUGLIELMONE et al., 2003; MARTINS et al. 2012b).

O *Amblyomma ovale* é o principal vetor de uma rickettsiose da Febre maculosa humana emergente no Brasil, causada pela *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (SPOLIDORIO et al 2010; SILVA et al., 2011; MARTINS et al., 2012b). Segundo Sabatini et al. (2010) e Medeiros et al. (2011), cerca de 10% dos carrapatos *Amblyomma ovale* estavam infectados pela *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em pelo menos dois estados brasileiros onde a doença foi confirmada: Santa Catarina e Litoral de São Paulo.

1.2.6 *Rhipicephalus sanguineus*

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* tem sua origem no Velho Mundo e foi introduzido nas Américas, possivelmente durante a colonização europeia (GUGLIELMONE et al., 2003).

O carrapato *Rhipicephalus sanguineus* está distribuído por todo o Brasil na maioria das áreas urbanas com grandes populações. Trata-se de um carrapato de hábito nidícola típico, monotrófico, conseguindo manter todo seu ciclo parasitário em uma única espécie animal e endofílico (LABRUNA, 2004; DANTAS-TORRES, 2010) que se adaptou para viver em lares humanos e todos os estádios ativos se alimentam principalmente de cães domésticos (PACHECO et al., 2011). Apesar da proximidade do *Rhipicephalus sanguineus* com o homem, o carrapato raramente foi relatado por picar humanos na América do Sul, contudo, este carrapato é reconhecido como vetor da *Rickettsia rickettsii* para humanos no México e, mais recentemente, nos Estados Unidos (PACHECO et al., 2011). Embora esta ocorrência ainda não tenha sido comprovada em nosso território (DEMMA et al., 2005), estudos anteriores realizados no Brasil e nos Estados Unidos mostraram que o *Rhipicephalus sanguineus* é um vetor competente de *Rickettsia rickettsii* em condições laboratoriais (PARKER et al., 1933; REGENDANS e MUNIZ, 1936). Piranda et al. (2006) mostraram que pelo menos 20% das ninfas de carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* foram infectadas por *Rickettsia rickettsii* após serem alimentadas como larvas em cães infectados experimentalmente e foram capazes de transmitir *Rickettsia rickettsii* a cobaias susceptíveis.

Esta antropofilia do *Rhipicephalus sanguineus* ocorreu principalmente devido à proximidade de humanos com cães e a capacidade desses carrapatos de se desenvolverem em ambientes sinantrópicos (ALMEIDA et al., 2013). Assim, os estudos que avaliam as espécies de ixodídeo que se ligam aos cães e a presença de agente zoonóticos nestes carrapatos são importantes para o monitoramento das zoonoses emergentes e reemergentes que afetam os seres humanos (ALMEIDA et al., 2013).

MORAES-FILHO et al. (2009) relataram que o *Rhipicephalus sanguineus* é comum em outras áreas endêmicas da FMB, onde o carrapato *Amblyomma sculptum* (publicado como *Amblyomma cajennense*) tem sido implicado como o vetor (LEMOS

et al., 1997; CARDOZO et al., 2006). Os resultados encontrados neste estudo, sugerem que o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* também poderia desempenhar um papel na epidemiologia da *Rickettsia rickettsii* na área do estudo, com o potencial de atuar como um vetor para os seres humanos, como já relatado no México e nos Estados Unidos (BUSTAMANTE e VARELA, 1947). Além disso, é possível que os cães possam desempenhar um papel significativo na ecologia da *Rickettsia rickettsii*.

1.3 *Rickettsia* spp.

O gênero *Rickettsia* foi recentemente dividido em quatro grupos: Grupo de Febre Maculosa (GFM), Grupo de Tifo (TG), Grupo de Transição (TRG) e Grupo Ancestral (AG) (FRITZ et al., 2009).

Pelo menos sete espécies de *Rickettsias* foram descritas no Brasil: a) grupo GFM: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rhipicephali* e *Rickettsia amblyommatis*, sendo transmitidas por carrapatos; b) grupo TGR: *Rickettsia felis*, sendo transmitida por pulgas; c) grupo TG: *Rickettsia typhi*, sendo também transmitida por pulgas e; *Rickettsia belli* do grupo AG, transmitida através de carrapatos (LABRUNA, 2009).

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma doença infecciosa transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*, tendo como principal agente etiológico a bactéria *Rickettsia rickettsii*. São bactérias gram negativas, pleomórficas, cocobacilares com paredes celulares complexos que contém ácido murâmico e retém fucsina básica, quando coradas pelo Método de Gimenez (1964) (KRAWCZAK, 2016). São intracelulares obrigatórias, membros da ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae (Raoult, Roux, 1997), que se multiplicam por fissão binária em ambos hospedeiros, vertebrados e invertebrados. São bactérias que atacam preferencialmente as células endoteliais, manifestando-se por um quadro febril agudo (MORAES-FILHO, 2017; BEPA, 2016).

Os primeiros registros da doença foram nos Estados Unidos no início do século XX, recebendo o nome de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. Mais tarde, Howard Taylor Ricketts realizou o primeiro isolamento da *Rickettsia rickettsii*, elucidando importantes dados epidemiológicos desta enfermidade, como a participação de carrapatos em sua transmissão (no caso o *Dermatocentor andersoni*)

e a dependência de hospedeiros silvestres para o ciclo de transmissão (MORAES-FILHO, 2017).

O primeiro relato de rickettsiose no Brasil foi em 1900, no Instituto Bacteriológico de São Paulo, pelo Dr. Adolpho Lutz, sendo posteriormente descritos casos de infecção em humanos por José Toledo Piza em 1932, no município de São Paulo, na época denominando a afecção de “Tifo Exantemático”. (UENO et al., 2016; BEPA, 2016).

Diversas espécies das *Rickettsia* foram isoladas em cultivo celular a partir de carrapatos no nosso país. O agente da FMB, a bactéria *Rickettsia rickettsii*, foi isolada dos carrapatos: *Amblyomma aureolatum* (PINTER, LABRUNA, 2006), *Rhipicephalus sanguineus* (PACHECO et al., 2011) e de *Amblyomma sculptum* (KRAWCZAK et al., 2014).

As espécies de maior importância na transmissão da doença no território nacional são: *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma aureolatum* (MORAES-FILHO, 2017).

1.3.1 *Rickettsia rickettsii*

A bactéria *Rickettsia rickettsii* são gram negativas, intracelulares obrigatórias, membros da ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae (RAOULT, ROUX, 1997), que ataca preferencialmente as células endoteliais, manifestando-se por um quadro febril agudo, sendo o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira (MORAES-FILHO, 2017).

Em estudo de Labruna (2004), numa análise filogenética com outros isolados de *Rickettsia rickettsii* do GenBank, os isolados da América Central/ Sul demonstraram baixo polimorfismo e formaram um clado distinto de dois cladogramas norte-americanos com maior polimorfismo no ramo. Este baixo polimorfismo deve ser uma razão significativa para as altas taxas de fatalidade da FMB.

A filogeografia de *Rickettsia rickettsii* é provavelmente determinada por fatores ecológicos e ambientais que existem independentemente da distribuição de um vetor carrapato em particular (PADDOCK et al., 2014).

Vários experimentos demonstraram a competência do vetor *Amblyomma sculptum* para esta bactéria, que sobrevive no carrapato por perpetuação

transestadial e transmissão transovariana (BRUMPT 1933, TRAVASSOS e VALLEJO 1942). No entanto, estudos de campo mostraram que as taxas de infecção por *Rickettsia rickettsii* são muito baixas entre as populações de *Amblyomma sculptum* em áreas endêmicas de Febre Maculosa Brasileira (GUEDES et al., 2005, SANGIONI et al., 2005).

A explicação para baixas taxas, a despeito da transmissão transovariana e transestadial ser eficiente, é que os carrapatos infectados têm menor sobrevivência e desvantagens reprodutivas quando comparados a carrapatos não-infectados (BURGDORFER 1988, NIEBYLSKI et al., 1999). Essa condição causaria a eliminação completa da bactéria na população de carrapatos, durante as gerações subsequentes; por esta razão, os hospedeiros vertebrados são essenciais para a manutenção de *Rickettsia rickettsii* na natureza, atuando como hospedeiros amplificadores para novas linhagens de carrapatos infectados ou não-infectados (HORTA, 2009).

Os carrapatos retirados diretamente de cães comparados aqueles coletados da vegetação, apresentam maior taxa de infecção, diferenças atribuídas a ativação rickettsial, que resulta numa maior carga rickettsial em carrapatos alimentados (SZABÓ et al., 2013).

A transmissão horizontal através de carrapatos em co-alimentação em cão rickettsêmicos, apresenta taxas altas de infecção, sendo uma rota clássica de transmissão de várias espécies de rickettsias (PHILIP, 1959; PIRANDA et al., 2011). A transmissão horizontal pode ocorrer também via cópula em carrapatos (HAYES et al., 1980) e uma rota menos eficiente (LABUDA e NUTTALL, 2004) via carrapatos em co-alimentação em hospedeiro não rickettsêmicos (ZEMTSOVA et al., 2010).

No Brasil, as capivaras e gambás (*Didelphis aurita*) foram confirmados como hospedeiros amplificadores para carrapatos *Amblyomma sculptum* (publicado como *Amblyomma cajennense*) (UENO et al., 2016; LABRUNA, 2009) pois desenvolvem uma rickettsemia longa (UENO et al., 2016, HORTA, 2009).

SOUZA (2009), em seus estudos comprovou que as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) possuem a capacidade de se manterem por um longo intervalo em rickettsemia, infectando em torno de 20 a 35% dos carrapatos *Amblyomma sculptum* que se alimentaram durante este período.

As capivaras são susceptíveis a bactéria, porém estas não demonstram a doença clínica, somente alguns valores hematológicos abaixo do esperado para a

espécie que podem estar relacionados ao stress do ambiente cativo. Estes roedores são hospedeiros primários de todos os estádios parasitários de *Amblyomma sculptum* (VIEIRA et al., 2004), sendo sugerido por pesquisadores que o aumento da população de capivara durante as últimas décadas pode estar relacionado com o ressurgimento da FMB em muitas áreas do estado de São Paulo (SOUZA et al., 2009).

Os cavalos são um dos principais hospedeiros de todos os estágios parasitários do *Amblyomma sculptum*, sendo assintomáticos a doença, porém apresentam altos títulos de IgG detectáveis e persistência de longa duração, qualificando-os como sentinela em áreas endêmicas. Todavia os cavalos não são considerados amplificadores da bactéria devido ao curto período de riquetsemia. (UENO, 2016). Outro fato que reduz o envolvimento de cavalos no ciclo de transmissão de *Rickettsia rickettsii* é a baixa prolificidade desta espécie, que tem longo período de gestação e geralmente produz um potro por gestação (UENO, 2016).

O diagnóstico precoce da FMB é frequentemente difícil, principalmente os primeiros dias da doença, e a falta de especificidade em seus sinais clínicos corroboram para a baixa suspeição. Nem sempre o sinal clássico, exantema, está presente, sendo um desafio realizar um diagnóstico diferencial em relação a outras doenças comuns e mais disseminadas como a leptospirose, dengue e doença meningocócica (OLIVEIRA et al., 2016).

O estudo de Oliveira et al. (2016) em relatório do primeiro registro de morte humana causada por *Rickettsia rickettsii* no estado do Paraná, no Sul do Brasil, os sintomas clínicos apresentados foram: hiporexia, fraqueza, cefaleia frontal, tosse, febre, dor abdominal, mialgia, vômitos, exantema, desidratação, insuficiência respiratória, baixo nível de consciência, alterações neurológicas (inquietação psicomotora, convulsões), insuficiência renal (anúria), manifestações hemorrágicas, alterações hematológicas (trombocitopenia, leucocitose), choque e óbito.

Em estudo retrospectivo de Paddock et al. (2014) de caracterização dos genótipos de *Rickettsia rickettsii* obtidos exclusivamente de pacientes humanos com doença fatal, indicaram que a idade média foi de 20 anos (46% tinham menos de 18 anos e 25 e 24% tinham menos de 6 anos de idade, incluindo 3 bebês) variando de 2 meses a 73 anos. O tempo de sobrevivência foi de 8 dias, com variação de 4 a 18 dias, sendo que 73% vieram a óbito dentro de 6 a 9 dias da doença.

1.3.2 *Rickettsia parkeri*

Um estudo retrospectivo nos Estados Unidos, onde a *Rickettsia parkeri* foi isolada pela primeira vez do carrapato *Amblyomma maculatum* (LABRUNA, 2009), forneceu evidências sorológicas para esta bactéria em diversos casos de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, sugerindo que a rickettsiose causada por *Rickettsia rickettsii* foi provavelmente diagnosticada sorologicamente de maneira errônea como o agente etiológico em alguns relatos naquele país e também na América do Sul, causando uma doença mais leve não letal (LABRUNA, 2009).

O estado de Santa Catarina, no Sul do Brasil, é o estado com o segundo maior número de casos confirmados laboratorialmente de Febre Maculosa no Brasil (KRAWCZAK et al., 2016).

Esta Rickettsiose causada pela *Rickettsia sp* Cepa Mata Atlântica tem como vetor o *Amblyomma ovale* no bioma da Mata Atlântica e é prevalente nos biomas do Cerrado e Amazônia (LABRUNA et al., 2005, SZABÓ et al., 2007) e são apontados por sua importância no estágio adulto, como vetor desta rickettsiose humana.

Spolidorio et al. (2010) e Krawczak et al. (2016) observaram sinais de febre mediana, mialgia, artralgia cefaleia, calafrios, lesão cutânea papular que evolui para erupção macular ao redor da lesão e depois centro necrótico, em um caso clínico ocorrido em humano no estado de São Paulo e Santa Catarina. O agente etiológico isolado apresentou similaridade gênica a *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia africae* e *Rickettsia sibirica* sendo denominado *Rickettsia sp* Cepa Mata Atlântica.

No estudo de Krawczak et al. (2016), houve a confirmação do caso humano através de análise sorológica e análise molecular e identificação da *Rickettsia sp* cepa Mata Atlântica, e a paciente soroconverteu com títulos finais para três agentes do grupo da Febre maculosa: a *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia amblyommii*.

A *Rickettsia sp* cepa Mata Atlântica foi encontrada em carrapatos *Amblyomma ovale* e só foi encontrada em *Amblyomma aureolatum* quando este ocorre junto com o *Amblyomma ovale* na mesma população canina (MEDEIROS et al., 2011; BARBIERI et al., 2014). Enquanto o agente rickettsial é encontrado em carrapatos *Amblyomma ovale* de áreas que não possuem o *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus*, nunca foi relatado a bactéria nestes carrapatos quando o *Amblyomma*

ovale estava ausente na área (SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2012; SZABÓ et al., 2013). Portanto, o *Amblyomma ovale* é o principal vetor da *Rickettsia* sp cepa Mata Atlântica (BARBIERI et al., 2014; LADO et al., 2015).

Os sinais clínicos atribuídos a essa rickettsiose em humanos no estado de São Paulo e Bahia incluem febre, erupção cutânea, mialgia, escara no local da picada do carrapato, e a resolução clínica sem complicações e ausência de hospitalização (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011) e se assemelham muito a apresentação clínica de casos notificados no estado de Santa Catarina (ANGERAMI et al., 2009; BARROS e SILVA et al., 2014). Essa rickettsiose, mesmo na fase aguda apresenta sintomatologia branda, e pode ser subdiagnosticada ou diagnosticada erroneamente devido à similaridade com outras doenças (BARBIERI et al., 2014).

1.3.3 *Rickettsia bellii*

A *Rickettsia bellii* um exemplar do grupo Ancestral, é a *Rickettsia* mais comumente encontrada em carrapatos na América (PHILIP et al., 1983) e no Brasil estando associada a carrapatos do gênero *Amblyomma* (*Amblyomma sculptum* e *Amblyomma dubitatum*) (LABRUNA et al., 2004, PINTER, LABRUNA et al., 2006; AMORIM et al., 2013) infectando espécies de quase todos os gêneros de carrapatos do Novo Mundo (PHILIP et al., 1983, LABRUNA et al., 2011) bem como uma ampla gama de insetos e organismos diversos incluindo a ameba (WEINERT et al., 2009; SPOLIDORIO et al., 2013).

Há evidência sorológica de infecção por *Rickettsia bellii* em capivaras do estado de São Paulo, possivelmente transmitidos por *Amblyomma dubitatum* (PACHECO et al., 2007), além de cães no Paraná (FORTES et al., 2010), Mato Grosso (MELO et al., 2011) e Pará (SPOLIDORIO et al., 2013; AMORIM et al. 2013).

O *Ixodes loricatus* é uma espécie de carrapato comum em marsupiais do Novo Mundo, mas também encontrado em roedores *Sigmodontinae*. Esta espécie de carrapato frequentemente abriga a *Rickettsia bellii*, e ambos, carrapatos e gambás (*Didelphis spp.*) são comuns em áreas endêmicas para FMB (COELHO, et al., 2016).

2. EPIDEMIOLOGIA

O Brasil é um país de dimensões continentais, propiciando uma grande diversidade tanto da fauna quanto da flora, demonstrado por seus ricos biomas terrestres- Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pantanal e Pampas, bem como manchas de transição denotando uma grande variedade de condições ecoepidemiológicas (DANTAS-TORRES et al., 2009; LABRUNA e VENZAL, 2009; DANTAS-TORRES et al., 2012).

A cidade de Itu apresenta uma riqueza de biomas e encontra-se em área de transição entre ambientes naturais e antropizados, com circulação da população humana, em suas atividades de lazer e trabalho, como também trânsito livre de cães e cavalos, permitindo o intercâmbio de ectoparasitos favorecendo a formação e manutenção do ciclo epidêmico.

O presente trabalho se passou numa área com vulnerabilidades tais quais, casos ocorridos em perímetro urbano, área de preservação, ocupação de áreas limítrofes com fragmentos de Mata, possibilitando o intercâmbio de artrópodes vetores com mamíferos hospedeiros, ambientes esses que propiciam o desenvolvimento e manutenção dos ciclos enzoóticos e epidêmicos da FMB.

O interior do estado de São Paulo é a região com maior número de casos confirmados: 524 casos e letalidade de 49,42% (BEPA, 2017). Na cidade de Itu, interior de São Paulo, foram confirmados casos autóctones da FMB, num total de 15 casos, 12 evoluíram para óbito, 3 evoluíram para a cura, perfazendo 80% de letalidade pelo agravo notificado (BEPA, 2017).

Comparando os dados epidemiológicos entre os casos de infecção no interior e na RMSP, notou-se um predomínio do sexo masculino no interior do estado (81,5%), compatível com a transmissão em regiões da Mata, em atividade de pesca ou lazer. Na RMSP nota-se que as crianças (menores de 9 anos) são bastante acometidas e que o predomínio do sexo masculino (55,8%) é quase imperceptível, o que é coerente com a exposição dentro da casa, por meio do animal de estimação que retorna com o carrapato da Mata (BEPA, 2017) e acomete principalmente a população economicamente ativa (20 a 49 anos) (BRASIL, 2018)

Em relação aos sintomas e sinais, nota-se que existe uma semelhança muito grande entre os pacientes no interior e na RMSP (BEPA, 2017).

Tendo a informação de que a transmissão da doença é através do vetor, seria esperado que a maioria relatasse o contato com o carrapato, porém pouco mais da metade dos casos confirmados de FMB relatam tal contato. Conseqüentemente, torna-se essencial o conhecimento dos locais de risco, ou seja, onde exista a circulação da Riquetsia, para considerar a hipótese de FMB frente a um caso, principalmente se levarmos em consideração que o tratamento é mais efetivo quando feito antes do terceiro dia e tal informação de dados epidemiológicos seriam determinantes para o sucesso da terapia (BEPA, 2017).

Quanto a sazonalidade, o período de maior incidência é em outubro, período de maior densidade de ninfas de carrapatos, podendo variar de região para região (BRASIL, 2018).

Tabela 1 - BRASIL - Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2010-2016.

Região Sudeste	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Minas Gerais	1	5	4	6	4	4	5	16
Espírito Santo	0	1	5	2	0	3	3	2
Rio de Janeiro	1	4	2	1	7	2	7	2
São Paulo	24	35	41	31	54	55	37	28
Total	26	45	52	40	65	64	52	48

Tabela adaptada. Fonte: Sinan- atualizado em 01/02/2018.

Tabela 2 - BRASIL - Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2010-2016.

Região Sudeste	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Minas Gerais	11	14	7	15	11	16	21	31
Espírito Santo	4	7	5	4	3	5	7	3
Rio de Janeiro	5	13	6	4	22	14	13	4
São Paulo	58	72	74	57	71	90	63	54
Total	78	106	92	80	107	125	104	92

Tabela adaptada. Fonte: Sinan- atualizado em 01/02/2018.

3. JUSTIFICATIVA

A cidade de Itu, interior do Estado de São Paulo, é uma região endêmica para a FMB, uma doença altamente patogênica para o homem com elevada letalidade somando-se a falta de conhecimento dos profissionais de saúde sobre as características clínicas da doença, os aspectos ecoepidemiológicos associados ao risco de infecção e os fatores de risco para exposição ao vetor.

O presente estudo se passou em área de vulnerabilidade que apresentou casos de FMB em perímetro urbano, área de preservação, ocupação de áreas limítrofes com fragmentos de Mata, possibilitando dessa forma o intercâmbio de artrópodes vetores com mamíferos hospedeiros, ambientes esses que propiciam o desenvolvimento e manutenção dos ciclos enzoóticos e epidêmicos da FMB.

Os cães possam desempenhar um papel significativo na ecologia da *Rickettsia rickettsii* e normalmente são parasitados pelo *Rhipicephalus sanguineus*, que já foi descrito em outros trabalhos quanto a sua importância na epidemiologia da FMB, apresentando o potencial de atuar como vetor para seres humanos. Mesmo não havendo a comprovação da competência vetorial.

Através dos resultados adquiridos neste trabalho científico, poderá fornecer dados epidemiológicos relacionado com possível presença de infecção por *Rickettsia sp*, fazendo com que programas de profilaxia, controle e tratamento da FMB seja instituído o mais precocemente possível e fornecendo subsídios para estudos posteriores.

Além disso torna-se de extrema importância a implementação por parte do governo, de programas de saúde pública alertando e conscientizando a população dos riscos que o contato com o carrapato pode ocasionar e programas sociais junto a moradores de rua e carroceiros para combate a carrapatos nos animais objetivando a diminuição de casos de FMB.

4. OBJETIVOS

Geral

O presente estudo descritivo transversal tem por objetivo estimar a detecção de anticorpos anti - *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia parkeri* em sangue de cães da cidade de Itu e analisar os carrapatos coletados destes, através de provas moleculares, para a presença da bactéria do gênero *Rickettsia*.

Específicos

- ✓ Detectar anticorpos anti-*Rickettsia spp.* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), em soros de cães do CCZ de Itu, SP.
- ✓ Identificar as fases e espécies de carrapatos coletados nos cães.
- ✓ Buscar a detecção molecular de *Rickettsia spp.*, por meio da Reação de Cadeia de Polimerase em Tempo Real, nos carrapatos coletados.
- ✓ Através do PCR Convencional detectar carrapatos infectados por *Rickettsias* do GFM.
- ✓ Fornecer dados sobre a circulação da bactéria na cidade de Itu para serviços de Vigilância e comunidade científica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Fitofisionomia do Bioma

Itu é um município do estado de São Paulo no Brasil, situa-se na Região Metropolitana de Sorocaba, na Mesorregião Macro Metropolitana Paulista e na Microrregião de Sorocaba, considerada estância turística. Está a uma latitude 23°15'51" sul e a uma longitude 47°17'57" oeste, estando a uma altitude de 583 metros. Sua população estimada é de 170.157 habitantes em 2017. O clima é subtropical, com temperatura anual de 20°C com um verão quente e chuvoso e inverno frio e seco (Wikipédia-domínio público).

Nos mares de Morros anteriormente recobertos pela Mata Atlântica ou por Mata latifoliada tropical, a paisagem foi intensamente transformada devido a degradação causada pela cultura do café no século XIX (DA SILVA, 2005).

O uso e a ocupação das terras de Itu acompanharam o perfil dos modelos econômicos do estado de São Paulo. Pela cidade já passaram o café, a cana, o citrus, os reflorestamentos, as cerâmicas, olarias e lavras de extração de granito. Na atualidade, os reflorestamentos, as cerâmicas, olarias e lavras de granito e a especulação imobiliária através de condomínios são os traços mais marcantes da paisagem (DA SILVA, 2005).

O padrão da fitofisionomia da cidade pode ser definido como uma paisagem de enclave, apresentando matas latifoliadas de fundo de Vale, formações de cerrado nos topos aplainados de depressão periférica Paulista e relíquias de cactáceas nos interflúvios, estando sempre associadas aos bolders (DA SILVA, 2005).

Quanto aos cursos d'água, encontram-se sublinhados por Matas de galerias sempre verde e semi-decídua, conferindo a paisagem de Itu um caráter peculiar, biodiverso e dinâmico (DA SILVA, 2005).

5.2 Zona urbana e rural de Itu

Realizamos coleta de sangue e de carrapatos em animais oriundos da zona urbana e zona rural da cidade e estabelecemos como critérios os requisitos legais estabelecidos por Lei nº 5.172, de 25 de outubro de 1966.

Classificamos como zona urbana, onde a observação dos requisitos mínimos da existência de melhoramento em pelo menos dois dos incisos seguintes, construídos e mantidos pelo Poder Público: I- meio-fio ou calçamento, com canalização de águas pluviais, II- abastecimento de água; III- sistema de esgotos sanitários; IV- rede de iluminação pública; V- escola primária ou posto de saúde a uma distância máxima de 3km do local considerado. Por zona rural entendemos que são as regiões não classificadas como zona urbana e são utilizadas para atividades agropecuárias, agroindústrias, extrativismo, silvicultura, turismo rural ou ecoturismo e conservação ambiental (Lei nº 5.172, de 25 de outubro de 1966).

5.3 População Alvo

Foram amostrados todos os cães atendidos na triagem da Clínica veterinária do Centro de Controle de Zoonoses de Itu, SP, para avaliação pré-cirúrgica de ovário-salpingo-histerectomia e orquiectomia no período de março a novembro de 2016, perfazendo 289 cães amostrados, sendo, portanto, uma amostra de conveniência.

Todos os cães eram domiciliados em diversos bairros da zona urbana e da zona rural de Itu.

5.4 Colheita de Materiais

As amostras foram colhidas com o consentimento dos proprietários de cada animal, sendo todos os procedimentos submetidos à autorização por escrito através do Termo de consentimento livre e esclarecido.

Também foram coletadas algumas informações, como: endereço domiciliar do animal e sexo.

As amostras de sangue foram coletadas assepticamente por venopunção da jugular, com agulha 30x7 mm, seringa 5ml. Após a colheita, tais amostras foram mantidas em temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas para a obtenção do soro, sendo aliquoteado e armazenado a -20° C em microtubos até o momento de sua análise.

5.5 Carrapatos

Os carrapatos foram coletados diretamente do animal durante o atendimento e foram armazenados em dois frascos com álcool 70°.

Frasco 1: corresponde a zona urbana.

Frasco 2: corresponde a zona rural (Terras de Santa Maria, Pau d'algo, Apotribu, Sete Vendas, Berro d'água, Varejão) num raio de 15 km ao redor da Estrada Municipal Itu-Mairinque.

Após coleta foram devidamente identificados conforme Barros-Battesti et al., 2006 e separados por espécie, sexo e fase de desenvolvimento.

5.6 Extração de DNA

Os espécimes de carrapatos foram processados individualmente à extração de DNA, utilizando-se o “Kit de extração Dneasey Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções de fabricante.

5.7 Imunofluorescência indireta para a *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e *R. bellii*.

Os soros sanguíneos dos animais foram testados pela técnica de Imunofluorescência Indireta frente aos antígenos de *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia bellii* conforme previamente descrito (HORTA et al., 2004). Quando constatado reação positiva na diluição de triagem (1/64), os soros foram testados para a determinação do título final de reação (HORTA et al., 2004).

5.8 PCR em tempo Real para *Rickettsia* spp.

Para a detecção de *Rickettsia* spp. através de PCR, cada amostra de DNA extraído foi testado individualmente pelo protocolo de Real-Time PCR descrito por Labruna et al. (2004). Este protocolo utiliza um par de primers (CS5 e CS6) que amplificam um fragmento de 147 nucleotídeos do gene citrato sintase de *Rickettsia* spp. Associado a uma sonda interna fluorogênica (5' 6-FAM-BHQ-1 3') de 23

nucleotídeos. Este protocolo de PCR mostrou-se sensível o suficiente para detecção de uma única cópia do gene citrato sintase de *Rickettsia rickettsii*.

5.9 PCR Convencional

Os carrapatos positivos no Real-Time PCR foram testados por PCR convencional utilizando-se os primers que amplificam os genes *gltA*, *ompA* e *ompB*, sendo os dois últimos utilizados para diagnóstico de *Rickettsia* do grupo da Febre Maculosa (REGNERY et al., 1991).

5.10 Cálculo Estatístico

Para estimar o tamanho da amostra de carrapatos que foram analisados na dissertação, utilizou-se o programa “R” (R Core Team, 2018), através da seguinte fórmula:

$$n = \frac{z^2 * p * (1 - p)}{e^2}$$

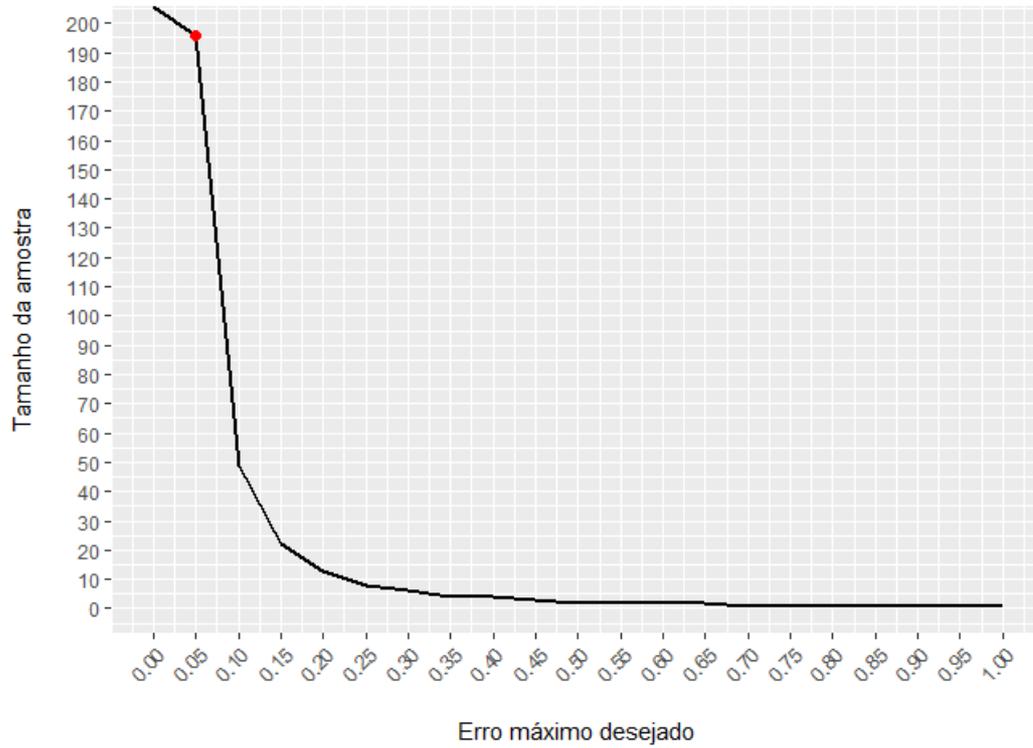
O cenário avaliado foi o de máxima incerteza, ou seja, $p = 0,05$. O erro máximo (e) definido foi de 5%, o nível de confiança adotado foi de 95%, resultando em $z = 1,96$, e o poder do teste foi de pelo menos 80%. A solução da fórmula nos forneceu um tamanho amostral mínimo de 196 observações.

A partir das amostras coletadas com o intuito de verificar diferenças entre as prevalências de rickettsias entre as duas populações estudadas, utilizou-se o teste para duas proporções, resultando em um valor de $p < 0,001$. Para o cálculo do intervalo de confiança das prevalências utilizou-se a fórmula do intervalo para 95%, conforme abaixo:

$$\hat{p} \pm 1,96 * \sqrt{\frac{p(1 - p)}{n}}$$

O gráfico abaixo, desenvolvido no programa ggplot2, determina o tamanho amostral em função do erro máximo desejado na estimativa de uma proporção. O ponto vermelho representa o tamanho amostral do trabalho.

Gráfico 1- Tamanho amostral em função do erro máximo desejado na estimativa de uma proporção.



6. RESULTADOS

6.1 Cães

Foram coletados sangue de 289 cães, sendo 252 provenientes da zona urbana e 37 residentes da zona rural. Todos os animais foram atendidos na clínica veterinária localizada dentro do Centro de Zoonoses do município de Itu, SP.

6.2 Carrapatos

Foram testamos 198 carrapatos da zona rural, sendo 192 carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, 5 *Amblyomma aureolatum* e 1 *Amblyomma ovale*; e na zona urbana, foram coletados 679 carrapatos, sendo 677 *Rhipicephalus sanguineus* e 2 *Amblyomma sculptum*, sendo testados 206 espécimes (Tabela 3).

Tabela 3 - Espécies de carrapatos coletados de cães residentes em zona rural e zona urbana da cidade de Itu, SP e processados em testes moleculares.

Carrapatos da zona rural	nº carrapatos testados	%
<i>Amblyomma aureolatum</i>	5	2,52
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	192	96,96
<i>Amblyomma ovale</i>	1	0,500
Total	198	100,00
Carrapatos da zona urbana		
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	204	99,03
<i>Amblyomma sculptum</i>	2	0,97
Total	206	100,00

6.3 Testes moleculares

Foram testados 198 carrapatos da zona rural, sendo 192 carrapatos *Rhipicephalus sanguineus*, 5 *Amblyomma aureolatum* e 1 *Amblyomma ovale*. Foram positivos: a) 20,2% (40/198) dos carrapatos para *Rickettsia* sp. na PCR Real Time, sendo destes positivos: 40 espécimes de *R. sanguineus*; b) 6,06% (12/198) para o gene *gltA*, sendo destes positivos: 12 espécimes de *R. sanguineus*; c) 2,52% (5/198) para o gene *ompA* na PCR convencional, sendo todos os positivos pertencentes a espécie *R. sanguineus* (Tabela 4).

Na zona urbana foram coletados 679 carrapatos, sendo 677 *Rhipicephalus sanguineus* e 2 *Amblyomma sculptum*. Foram testados 206 carrapatos: a) 2,9% (6/206) positivos na PCR Real Time para *Rickettsia* sp.; b) 1,94% (4/206) positivaram na PCR convencional para o gene *gltA*; c) 1,45% (3/206) para o gene *ompA* na PCR convencional (Tabela 4). Todos os carrapatos positivos nos testes moleculares coletados na zona rural eram da espécie *R. sanguineus*.

Os carrapatos coletados na zona rural positivos na PCR Real time apresentaram valores de Ct (*Cycle threshold*) entre 24 a 33 ciclos, com um valor médio de 28 ciclos. Em contraste, os artrópodes positivos coletados na zona rural apresentaram valores entre 31 a 33 ciclos, com um valor médio de 32 ciclos.

Tabela 4: Carrapatos positivos na PCR em tempo real para *Rickettsia* sp. e PCR convencional para os genes *gltA*, *OmpA* e *OmpB*, provenientes de cães da zona rural e urbana do município de Itu, SP.

Nº carrapatos	Zona	PCR Real Time <i>Rickettsia</i> spp.	PCR Convencional		
			<i>gltA</i>	<i>OmpA</i>	<i>OmpB</i>
198	Rural	40	12	5	0
206	Urbana	6	4	3	0

6.4 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

As amostras de sangue dos animais deste trabalho foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para detecção de anticorpos anti - *Rickettsia rickettsii*, anti - *Rickettsia parkeri* e anti- *Rickettsia bellii*.

Foram coletados sangue de 289 cães, sendo 252 da zona urbana e 37 da zona rural. Os resultados sorológicos obtidos foram: a) 21,79% (63/289) das amostras analisadas, reagiram sorologicamente pelo menos para uma das espécies de *Rickettsia* testadas, com títulos variando de 64 a 2048; b) 8,65% (25/289) das amostras analisadas reagiram sorologicamente apenas para *Rickettsia rickettsii*, com títulos variando de 64 a 2048; c) 1,03% (3/289) das amostras analisadas reagiram sorologicamente apenas para *Rickettsia parkeri*, com títulos variando de 64 a 1024; d) 2,07 (6/289) das amostras analisadas reagiram sorologicamente apenas para *Rickettsia bellii*, com títulos variando de 64 a 512; e) 10,7% (31/289) das amostras analisadas reagiram sorologicamente para *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* simultaneamente; f) os animais da região urbana apresentaram 21,42% de positividade sorológica para pelo menos para umas das *Rickettsia* analisadas, e os da zona rural, 27,3%.

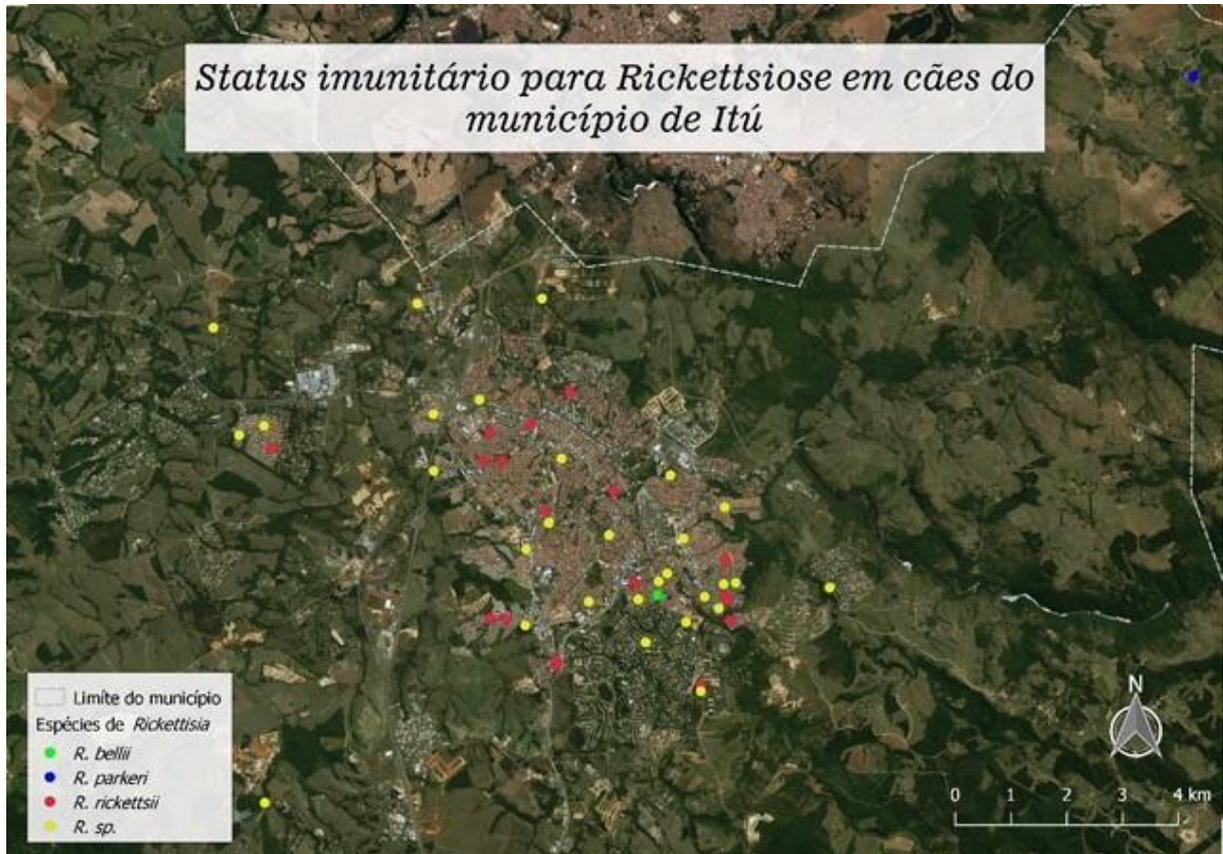
Os resultados encontrados na Imunofluorescência indireta (RIFI) nas amostras coletadas dos cães foram esquematizadas em um mapa geográfico e físico da cidade de Itu, que foi desenvolvido através do programa QGIS 2.18, apresentado na figura 1 e 2.

Na figura 1 é destacado as amostras que foram positivas para pelo menos uma das riquetsias testadas, porém na figura 2 é levado em consideração a provável soroconversão para *Rickettsia* sp., *Rickettsia parkeri*, *R. bellii* e *R. rickettsii* nas amostras pesquisadas.

Figura 1- Status imunitário para Rickettsiose em cães do município de Itú, SP.



Figura 2- Status imunitário para Rickettsiose em cães do município de Itú, SP, distribuído por espécies de riquetsias



7. DISCUSSÃO

Quanto a diversidade de carrapatos coletados

No presente estudo detectamos 4 espécies de carrapatos compondo a ixodofauna ituana (coletados no período de março a novembro de 2016), sendo estes: *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum*.

Essa biodiversidade está em harmonia com a fauna de vertebrados presentes na área levando-se em conta que a presença de parasitas (Ixodídeos), em determinada área está diretamente correlacionada com a presença de seus hospedeiros.

A cidade de Itu possui fragmentos de Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, justificando o achado dos carrapatos *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma sculptum* e *Rhipicephalus sanguineus*. Os carrapatos do gênero *Amblyomma* frequentemente parasitam cães em áreas rurais, próximo a Matas coincidindo com os dados obtidos neste trabalho, indicando que os cães parasitados por *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale* provavelmente adentraram a Mata degradada. As áreas de cerrado explicam a presença do *Amblyomma sculptum*, e o *Rhipicephalus sanguineus* está presente em todos os biomas brasileiros, principalmente na zona urbana.

A identificação do *Amblyomma aureolatum* e do *Amblyomma sculptum* na área de estudo, confirmam a importância epidemiológica destas duas espécies de carrapatos atuando como vetores da FMB, já que são os vetores de *Rickettsia rickettsii* no Brasil, em consonância com os achados sorológicos positivos para *Rickettsia rickettsii* em cães desse trabalho.

A presença do *Amblyomma ovale* em área endêmica para FMB, no caso a cidade de Itu, corrobora com os achados sorológicos positivos para *Rickettsia parkeri* e a localização no mapa coincide com os fragmentos Mata Atlântica.

Optamos por avaliar carrapatos aderidos a cães, pois muitas espécies de carrapatos que não são adaptados ao ambiente antrópico são carregadas pelos cães até o ambiente domiciliar, onde os carrapatos frequentemente se desprendem e se

espalham pela habitação, podendo transmitir doenças ao homem (OGRZEWALSKA et al., 2012b; LAVINA et al., 2014; LUZ et al., 2014; KRAWCZAK, 2016).

Quanto aos resultados sorológicos

Estudos comparando a frequência de anticorpos para *Rickettsias* do GFM entre áreas não endêmicas e endêmicas para *Rickettsia rickettsii* em fragmentos de Mata Atlântica e Cerrado, em cães amostrados no estado de São Paulo, evidenciaram que nas áreas endêmicas a soropositividade encontrada nos cães foi de 20 a 69,2% (HORTA et al., 2004, 2007; SANGIONI et al., 2005; OGRZEWALSKA et al., 2012; KRAWCZAK, 2016), dados que corrobora com o presente estudo cuja positividade encontrada foi 21,79% (63/289) para os antígenos do GFM.

Os resultados sorológicos encontrados neste estudo quando comparados aos encontrados por SCINACHI et al (2017) e SZABÓ et al. (2013) de 0 a 37% e 88,6% positivos para *R. rickettsii*, respectivamente, obtivemos números semelhantes ao encontrado no estudo de SCINACHI et al. (2017), porém bem abaixo do que foi apresentado pelo autor SZABÓ et al. (2013). Todos os experimentos se passaram em área de Mata Atlântica e endêmica para Febre Maculosa Brasileira, portanto esta informação somada aos dados encontrados podemos dizer que Itu é uma área endêmica. O carrapato mais encontrado foi o *R. sanguineus*, explicando os menores valores de positividade nos cães para a bactéria quando comparados a estes trabalhos, onde os artrópodes encontrados foram do gênero *Amblyomma*. Em contrapartida, no trabalho de OTOMURA (2016) foi encontrado 4,2% de sorologia positiva para pelo menos uma das espécies de *Rickettsia* no Estado do Paraná, sendo uma positividade bem menor que 21,79%, porém este pesquisador trabalhou em área não endêmica para a doença.

No Rio de Janeiro, ROSENTAL (2015) encontrou 97,5% de animais sorologicamente positivos para *R. rickettsii*, porém o experimento se passou em abrigo de animais, com grande concentração de cães, infestação massiva por carrapatos e casos de FMB relatados em funcionários do abrigo.

O achado de sorologia para *Rickettsia parkeri* somente em área rural, em região de Mata Atlântica, coincide com a presença de seu vetor *Amblyomma ovale*.

Na zona rural onde era esperada a positividade encontrada em sorologia para *Rickettsia* se justifica pelo achado dos carrapatos *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale*.

Quanto aos resultados moleculares

Pinter e Labruna (2006) após terem coletado 669 exemplares de *Amblyomma aureolatum*, em uma área endêmica para FMB, no município de Taiaçupeba-SP, detectaram a presença de *Rickettsia rickettsii* somente em 6 espécies amostrados, demonstrando uma taxa de infecção de 0,89% (6/669) bem aproximada a taxa que encontramos em Itu de 0,74% (3/403) dos carrapatos positivos para *Rickettsia* do grupo do FMB.

Em um estudo realizado no Brasil em 2006, os pesquisadores obtiveram 1,3% de positividade para *R.rickettsii* em testes moleculares em carrapatos *Amblyomma* spp. (Burgdorfer, 1988; Guedes et al., 2005; Pinter & Labruna, 2006), resultado bastante semelhante em um outro estudo relatado em Minas Gerais, que obteve uma positividade de 1,28% para a mesma bactéria nos testes moleculares em *A. cajennense* (Pacheco et al. 2011), que diferem dos achados do presente trabalho, cujo resultado foi uma positividade de 26,75% para *Rickettsia* sp. na PCR em tempo real e, 1,52% de positivos para *Rickettsia* do grupo da Febre Maculosa, sendo todos carrapatos da espécie *R. sanguineus*.

Quando comparado os dados encontrados nesta pesquisa com o trabalho de SCINACHI et al. (2017), a positividade de carrapatos é bastante inferior, pois estes autores acharam de 20 a 70% de carrapatos *A. aureolatum* positivos nos testes moleculares para *R.rickettsii*. Essa diferença de valor é esperada pois *R. sanguineus* não é vetor para a bactéria *R. rickettsii*, necessitando da presença do *A. sculptum* e/ou *A. aureolatum* para que haja a possibilidade de sua infecção, fazendo com a positividade neste artrópode seja menor quando comparada a outros carrapatos.

O achado dos carrapatos *A. ovale* e *A. aureolatum* do presente trabalho, em pequena quantidade, se deve a entrada eventual dos cães em áreas de fragmentos florestais, durante atividade de lazer, pesca e ecoturismo de seus proprietários ou mesmo em casos cujo animal vive de forma semi-domiciliada tendo acesso a essas mesmas áreas. Os carrapatos *R. sanguineus* provavelmente se infectaram durante o

repasto sanguíneo em cão parasitado concomitantemente por carrapato *Amblyomma* sp. infectado ou em cão em um período de bacteremia para *Rickettsia* sp.

A grande quantidade de carrapatos positivos em área urbana, fato não esperado, pode ser explicado em parte pela presença de carroceiros no centro urbano da cidade, e seus equídeos poderiam estar parasitados por *Amblyomma sculptum*. Outra possibilidade seria a presença destes cães residentes nestas áreas terem acesso a zona rural.

O presente trabalho relatou numa única região a positividade para três espécies de riquetsias: *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* pertencentes ao GFM e *Rickettsia bellii* do grupo Ancestral, e com a presença dos respectivos vetores: *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma aureolatum*.

Estatística dos Testes moleculares das amostras de carrapatos.

A diferença estatística encontrada neste projeto entre carrapatos coletados na zona rural e urbana quanto a positividade na PCR real time para *Rickettsia* sp. corroboram para entendermos dados obtidos neste estudo, pois mesmo o *Rhipicephalus sanguineus* sendo o artrópode mais encontrado nas duas áreas estudadas, os provenientes da zona rural ao conviverem com as espécies *A. sculptum*, *A. aureolatum* e *A. ovale*, vetores dos agentes etiológicos da FMB, faz com que a possibilidade de infecção por parte deste carrapato, quando comparado aos da mesma espécie que se encontram na zona urbana, no qual dificilmente conviverão com artrópodes do gênero *Amblyomma*, terão uma maior probabilidade de infecção por esta bactéria responsável por esta doença.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos podemos inferir:

- ✓ Foram identificados os carrapatos: *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma aureolatum*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma ovale*.
- ✓ A *Rickettsia rickettsii* é o provável agente dos casos de FMB na cidade de Itu, estado de São Paulo.
- ✓ Os cães apresentaram sorologia positiva para FMB, no qual estão ou estiveram expostos a bactérias do gênero *Rickettsia*, sinalizando que estes animais foram parasitados por ectoparasitos infectados por esta bactéria.
- ✓ Com o presente trabalho podemos inferir sobre a circulação do agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira na cidade de Itu, SP, pois foram encontrados carrapatos infectados para *Rickettsia* sp. e, animais sorologicamente positivos para a bactéria do gênero *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-JAMETT et al. Demography of domestic dogs in rural and urban areas of the Coquimbo region of Chile and implicatons for disease transmission. **Preventive Veterinary Medicine**, v.94, n.3-4, p.272-281, 2010.

ALMEIDA, R.F. Ixodid fauna and zoonotic agentes in ticks from dogs: first reporto *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus sanguineus* in the state of Mato Grosso do Sul, mid-western Brazil. **Exp. Appl Acarol**. V.60, p.63-72, May.2013.

AMORIM et al. Detecção de anticorpos anti-Rickettsia spp. em cães e equinos no Estado de Mato Grosso, Brasil. **Semina: Ciências Agrárias**, V.34, p.3755-3765, 2013.

ANGERAMI, R.N. et al. Brazilian Spotted Fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between na old and a new endemic área in Brazil. **Clin.Microbiol.Infect 2 (Suppl)**, p.207-208, 2009.

ARAGÃO, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limítrofes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.31, p.759-843, 1936.

ARAGAO, Henrique; FONSECA, Flávio da. Notas de ixodologia: IX. O complexo ovale do gênero *Amblyomma*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 59, n. 2, p. 131-148, July 1961. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02761961000200002&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02761961000200002>.

BARBIERI, A.R.M. et al. Epidemiology of *Rickettsia* sp. Strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of Southern Brasil. **Ticks and Tick-borne diseases**, v.5, n.6, p.848-853, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/101016/j.ttbdis.2014.07010> Acesso em: 2018-02-13.

BARBIERI et al. Altitudinal Assessment of *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae). Vectors of Spotted Fever Group *Rickettsiosis* in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of medical entomology**, v.52, n.5, p.1170-1174, 1 set. 2015.

BARROS-BATTESTI, D.M. et al. *Ornithodoros faccinii* n.sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. **Parasite Vector** 8:268, 2015 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4489115/> Acesso em: 2018-2-13.

BARROS e SILVA, P.M.R. et al. Febre maculosa: uma análise epidemiológica dos registros do Sistema de vigilância do Brasil. *Scientia Plena*, v.10, p.1-9, 2014.

BEATI; NAVA, S.; BURKMAN, E.J.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; GUGLIELMONE, A.A.; CÁCERES, A.G.; GUZMAN-CORNEJO, C.; LÉON, R.; DURDEN, L.A.; FACCINI, J.L.H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787), the Cayenne tick: phylogeography and allopatric divergence in the New World. **BMC Evolutionary Biology**, v.13, n.267, p.1-20, 2013.

BRASIL. Casos confirmados de Febre Maculosa. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2018. Disponível em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/02/Casos-confirmados-febre-maculosa.pdf> Acesso em: 05/02/2018.

BRASIL. Óbitos de Febre Maculosa. Brasil, Grandes regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2018. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/fevereiro/05/Obitos-de-febre-maculosa.pdf> Acesso em: 05/02/2018.

BEPA 2016- A Febre Maculosa Brasileira na região Metropolitana de São Paulo. Boletim Epidemiológico Paulista, v.13, n.151, jul.2016. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2016/edicao_151_-_julho_2.pdf Acesso em: 2018-02-13.

BEPA 2017- Epidemiological Surveillance of Brazilian Macular Fever in the state of São Paulo. V.14, n.164, Agosto 2017. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/resources/ccd/homepage/bepa/edicao-2017/edicao_164_-_agosto.pdf> Acesso em: 2018-05-10.

BRUMPT, E. Transmission de la fièvre pourprée des Montagnes rocheuses par la tique Américaine *Amblyomma cajennense*. **Comptes Rendues des Seances de la Sieté de Biologic**, V.144, p.416-419, 1933.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of sciences**, v.266, p.61-72, 1975.

BURGDORFER, W.; HAYES, S.F. e BENACH, J.L. Development of *Borrelia burgdorferi* in Ixodid Tick Vectors. Lyme Disease and Related Disorders. **Journal Annals of the New York Academy of Sciences**, v.539, p.172-179, Aug.1988.

BUSTAMANTE, M.E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias en Mexico. **Rev. Inst.Salub.Enf.trops.**, 1947, v.8, p.3-14.

BUTLER, J.R.; BINGHAM, J. Demography and dog-human relationships of the dog population in Zimbabwean communal lands. **The -veterinary record**, v.147, n.16, p.442-6, 14 out.2000.

CARDOSO, L.D. et al. Caracterização de *Rickettsia* spp circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil, **Cad. Saúde pública**, 2006, v.22, p.495-501.

CIMARDI, A. V. Família Didelphidae. **Mamíferos de Santa Catarina**, Florianópolis. Vol.n.1, p.17 – 19. 1996.

COELHO, M.G. et al. Serologic evidence of the exposure of small mammals to spotted-fever *Rickettsia* and *Rickettsia bellii* in Minas Gerais, Brasil. **J Infect Dev Ctries**. V.10(3), p.275-282, 2016.

DA SILVA, Marcia Corrêa Vieira; VIADANA, Adler Guilherme. A paisagem de Enclave de Itu-Salto (SP-Brasil) sob a ótica da Teoria dos Refúgios Florestais, **Anais do X Encontro de Geógrafos da América Latina**. Mar.2005- Disponível em: <http://observatoriogeograficoamericalatina.org.mx/egal10/Teoriaymetodo/Teoricos/13.pdf>. Acesso em: 2018-02-14.

DANTAS-TORRES et al., Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.75-77, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Parasites & Vectors**, v.3, 2010. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2857863&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> Acesso em: 2018-02-14.

DANTAS-TORRES et al. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari:Argasidae) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v.98, n.1, p.36-45, 2012.

DEMMA, L.J. et al. Rocky Mountain Spotted Fever from an unexpected tick vector in Arizona. **N.Engl J Med.**, V.353(6), p.587-594, Aug.2005.

DIAS, E.; MARTINS, A.V. Spotted Fever in Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, V.1, n.2, p.103-108, 1939.

DRISCOLL, C.A.; MACDONALD, D.W. Top dogs: wolf domestication and wealth. **Journal of Biologiy**, v.9, n.2, p.10, 2010.

EVANS, DE; MARTINS, JR; GUGLIELMONE, AA. A review of the ticks (Acari, Ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 4, p. 453-470, Aug. 2000 Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762000000400003&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000400003>.

FORTES, F.S. Infecção por *Rickettsia* spp. em cães no município de São José dos Pinhais e em Capivaras no Município de Foz do Iguaçu, Paraná. **Tese de Mestrado Universidade Federal do Paraná**, 2010, Curitiba.

FOURMIER, Gislene Fátima da Silva Rocha, Epidemiological aspects of semi-domiciled domestic dogs presente in the Brazilian Atlantic Rain forest Area of Caraguatatuba City and the correlation between the genetic variability of dogs'ticks and the wild environment. **Tese para obtenção do Título de Doutorado pela USP**, São Paulo, 2017.

FRIGERI, E.; CASSANO, C.R. e PARDINI, R. Invasão Doméstica de cães em Mosaico Agroflorestal no Sul da Bahia, Brasil, *Ciência Tropical da Conservação*, Sage Journals, v.7 (3), pp. 508-528, 2014, visto em;< <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/194008291400700310>> em 22/06/2018.

FRITZ, C.L. Emerging Tick- borne Diseases. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, V.39, p.265-278, Mar 2009.

GERARDI, M. Perfil genético e susceptibilidade de diferentes populações do carrapato *Amblyomma scuptum* à infecção pelo patógeno *Rickettsia rickettsii*. **Tese para obtenção de título de doutor em Ciências na Faculdade de med. Vet. e zootecnia da Univ. de São Paulo**, 2016.

GOMES, L.S. Thyphoexanthematico de São Paulo. **Brasil-médico**, V.17, p.919-921, 1933.

GUEDES, E. et al. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, V.100, p.841-845, Dec.2005.

GUGLIELMONE, A.A. et al. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) e *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hospedeiros, distribuição e sequências de rDNA 16s. **Parasitologia veterinária**, vol.113, p.273-288, Mai.2003, visto em [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(03\)00083-9](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(03)00083-9).

GUGLIELMONE et al. Carrapatos [Acari: Ixodida] da região zoogeográfica neotropical, Buenos Aires. **Ediciones INTA AR** 2004.

GUGLIELMONE et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Experimental & Applied Acarology*, vol.40, p83-100, oct.2006. visto em <https://doi.org/10.1007/S10.493-006-90270>.

GUGLIELMONE et al. Individual Species Accounts In: The hard ticks of the world. Springer, **Dordrecht**, p.377-526, 2014. Visto em https://doi.org/10.1007/978-94-007-7497-1_7.

GUGLIELMONE, ALBERTO A.; NAVA, SANTIAGO. Rodents of the subfamily Sigmodontinae (Myomorpha: Cricetidae) as hosts for South American hard ticks (Acari: Ixodidae) with hypotheses on life history. **Zootaxa**, v. 2904, p. 45-65, 2011.

GUIMARÃES, J.H.; BATTESTI, D.M.B; TUCCI, E.C. Ectoparasitos de Importância Veterinária, **Plêiade**, 2001.

GUIMARÃES, L.R. Sobre alguns ectoparasitos de aves e mamíferos do litoral paranaense. **Arq. Mus. Parana**, V.4, p.179-190, 1945.

HORTA, M.C. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsia* and another spotted fever group *Rickettsia*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, n.1, p.93-97, jul.2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15238696>> Acesso em: 2018-02-14.

HORTA, M.C. et al. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.7, p.793-801, nov.2007. Disponível em:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18094887> Acesso em: 2018-02-14.

HORTA, M.C. et al. Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, V.9(1), p.109-118, Feb.2009.

JAMES, G. Wilson, David R. Kinzer, John R. Sauer, Jakie A. Hair; Chemo-Attraction in the Lone Star Tick (Acarina: Ixodidae): I. Response of different developmental stages to carbon dioxide administered via traps, **Journal of Medical Entomology**, Volume 9, Issue 3, 20 June 1972, Pages 245–252, <https://doi.org/10.1093/jmedent/9.3.245>

KRAWCZAK, F.S. et al. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v.7, p.7, Jan.2014.

KRAWCZAK, F.S. et al. *Amblyomma yucumense* n.sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.52, n.1, p.28-37, 2015. Disponível em: <<http://jme.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jme/tju007>> Acesso em: 2018-02-12.

KRAWCZAK, F.S. Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da Febre maculosa em cães, pequenos mamíferos e carrapatos em área endêmica e não endêmicas nos biomas Pampa e Mata Atlântica no Estado do Rio Grande do Sul. 2016. **Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses)**- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. University of São Paulo, Paulo, 2016. Disponível em: (<http://www.teses.usp.br/teses/3747/disponiveis/10/10134/tde-18102016-143747/>)> Acesso em 2018-02-13.

KRAWCZAK, F.S. Case Report: Rickettsia sp. Strain Atlantic Rainforest infection In a patient from a Spotted Fever – Endemic Area in Southern Brasil. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, V.95(3), p.551-553, 2016.

LABRUNA, M.B. et al. Carrapatos (Acari: Ixodidae) Associados a cachorros rurais em Uruará, Amazônia Oriental, Brasil. **Journal of medical Entomology**. V.37, edição 5, p.774-776, sep.2000. <<https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.5.774>>.

LABRUNA, M.B. et al. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 53, n. 5, p. 553-556, Oct. 2001. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000500007&lng=en&nrm=iso>. access on 16 Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352001000500007>.

LABRUNA, M.B. et al. Controle Estratégico do carrapato *Amblyomma cajennense* em equinos. **Ciência Rural**, v.34, nº1, p.195-200, jan-fev.2004.

LABRUNA, M.B. et al. Ticks (Acari:Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, V.36, p.149-163, 2005.

LABRUNA, M.B. et al. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsia*. **Journal of Medical Entomology**, v.45, n.6, p.1156-1159, 2008.

LABRUNA et al. Ecology of *Rickettsia* in South America **Annals of the New York Academy of Sciences**. V. 1166, p156-166, May.2009.

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

LABRUNA, M.B. et al. Rickettsioses in Latin American, Caribbean, Spain and Portugal. **Ver. MVZ Cordoba**. V.16, p.2435-2457, May/Aug. 2011.

LABRUNA, MB. Brazilian Spotted Fever: The Role of Capybaras. Capybara. **Springer, Nova York, NY**, p.371-383, 2013.

LABRUNA, M.B. & PEREIRA, M.C. Ticks on dogs in Brazil. **Clinica Veterinária**, V.30, p.24-32, 2001.

LABUDA, M.; NUTTALL, P.A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, v.129, p.S221-S245, 2004. Disponível em: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0031182004005220 Acesso em: 2018-02-14.

LADO, P. Seroepidemiological survey of Rickettsia spp. in dogs from the endemic área of Rickettsia parkeri rickettsiosis in Uruguai. **Acta Tropica**, V.146, p.7-10, Jun.2015.

LAVINA, M.S. et al. Ixodídeos coletados em equinos e caninos no Estado de Santa Catarina. **Revista Brasileira de medicina veterinária**, v. 36, n.1, p.79-84, 2014.

LEI Nº 5.172, DE 25 DE OUTUBRO DE 1966<
<http://www2.camara.leg.br/legin/fed/lei/1960-1969/lei-5172-25-outubro-1966-358971-norma-pl.html>>

LE MOS, E.R.S. et al. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks colleted in na endemic área in São Paulo, Brazil. **Rev. Soc. Bras.Med.Trop.** 1997, v.30, p.181-185.

LESSA, I. et al. Domestic dogs in protected areas: a threat to Brazilian mammals. **Natureza e conservação**, v.14, n.2, p.46-56, 2016.

LUZ, H.R. et al. Carrapatos parasitando cães em uma área insular do estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de medicina veterinária**, v.36, n.4, p.437-442, 2014.

MARTINEZ et al. Domestic dogs in rural area of fragmented Atlantic Forest potential threats to wild animals. **Ciência Rural**, v.43, n.11, p.1998-2002, 2013.

MARTINS, Camila Marinelli et al . Dog parasite incidence and risk factors, from sampling after one-year interval, in Pinhais, Brazil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, Jaboticabal, v. 21, n. 2, p. 101-106, June 2012a . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-29612012000200006&lng=en&nrm=iso>. access on 16 Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612012000200006>.

MARTINS, T.F. Life-Cicle and host preference of Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**. V.56, pp.151-158, 2012b. Visto em < <https://doi.org/10.1007/s10493-011-9506-9>>.

MARTINS, Thiago Fernandes. Estudo do Complexo Amblyomma cajennense no Brasil. 2014. **Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses)** – Faculdade de medicina Veterinária e Zootecnia, University of São Paulo, São Paulo, 2014. Doi:10.11606/T.10.2014.tde-24072014-144543. Acesso em :2017-11-12.

MARTINS, T.F et al. Geographical distribution of Amblyomma cajennense (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of A. cajennense (sensu stricto), **parasites & Vectors**, 9:186, 2016.

MEDEIROS, AP et al.Spotted fever group Rickettsia infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz** (in press), 2011.

MELO, A.L.T. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso. State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, V.2, p.213-218, Dec.2011.

MORAES-FILHO, J. et al. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector-Borne and zoonotic diseases**, V.9, nº1, 2009.

MORAES-FILHO, J. Brazilian Spotted Fever. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, V.15, p.38-45, 2017.

MOREY, D.F. Animal Evolution of the Domestic Dog can also be described as an evolutionary process. **American Scientist**, v.82, n.4, p.336-347, 1994.

NAVA, S. et al. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n.sp., *Amblyomma interandinum* n.sp. and *Amblyomma pattoni* n.sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Tics tick borne Dis.**V.5(3), Apr.2014.

NIEBYLSKI, M.L.; PEACOCK, M.G. e SCHWAN, T.G. Lethal Effect of *Rickettsia rickettsii* on its Tick Vector (*Dermacentor andersoni*). **Appl Environment** -p.v.65, p.773-778, Feb.1999. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91094/>> visto em: 2018-02-22.

OGRZERWALSKA et al. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in an Atlantic rain forest region of Brasil. **Journal of Medical Entomology**, v.46, n.5, p.1225-1229, 2009.

OGRZEWALSKA, M. et al. Effect of forest fragmentation on tick infestations of birds and tick infection rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. **Ecohealth**, v.8, n.3, p.320-331, 2011.

OGRZEWALSKA et al. Epidemiology of Brazilian Spotted fever in the Atlantic Forest, State of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v.139, n.10, p.1283-1300, 2012.

OLIVEIRA, S.V. et al. A fatal case of Brazilian Spotted Fever in a non-endemic area in Brazil: the importance of having health professionals who understand the disease and its areas of transmission. **Rev.Soc. Bras. Med.Trop.**, v.49(5), p.653-655, Sept-Oct, 2016.

ONOFRIO, V.C. et al. Comentários e Chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. Barros-Battesti D., Arzua M., Bechara G. Carrapatos de importância médica veterinária da região neotropical. **Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Butantã**, p.53-113, 2006.

OSTRANDER, E.A.; WAINE, R.K. The canine genome. **Genome Research**, v.15, n.12, p.1706-1716, 2005.

OTOMURA, Flávio Haragushiku et al. Probability of occurrence of the Brazilian spotted fever in northeast of Paraná state, Brazil. **Braz. J.Vet. Parasitol.** Jaboticabal, v.25, n.4, p.394-400, out.-dez. 2016.

PACHECO et al. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brasil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomédica** V.27, nº3, Jul/Sept 2007, Bogotá.

PACHECO, R.C. et al. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, Southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**. V.25, p.148-155, Jun. 2011.

PADDOCK, C.D. et al. Phylogeography of *Rickettsia rickettsia* Genotypes associated with fatal Rocky Mountain Spotted Fever. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V.91(3), p.589-597, 2014.

PARKER, R.R.; PHILIP, C.B.; JELLISON, W.L. Rocky Mountain Spotted Fever: potentialities of tick transmission in relation to geographical occurrence in the United States. **American Journal of Tropical Medicine**, v.13, p.341-378, 1933.

PHILIP, C.B. Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. **Public Health Reports**, v.74, p.595-600, 1959.

PHILIP, R.N. et al. *Rickettsia bellii* sp. nov.: A Tick-Borne *Rickettsia*, widely Distributed in the states, that is distinct from the spotted fever and Typhus Biogroups. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, V.33, p.94-106, Jan.1983.

PINTER, A. Aspectos epidemiológicos da Febre maculosa em uma área endêmica no município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do Ciclo de vida do vetor *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). 2003. **Tese de Doutorado**. University of São Paulo.

PINTER, A. et al. Study of the Seasonal Dynamics, Life cycle, and Host Specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, V.41, p.324-332, May.2004.

PINTER, A. et al. Serosurvey of *Rickettsia* spp. In dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil. **Cad. Saúde Pública [online]** v.24, nº 2, p.247-252. Feb.2008.

PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, V.1078, p. 523-529, Out.2006.

PIRANDA, E.M. et al. Avaliação preliminar do cão doméstico como fonte de infecção por *Rickettsia rickettsia* para carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 (Acari: Ixodidae). **14º Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e 2º Simpósio Latino-Americano de rickettsioses**, 2006.

PIRANDA, E.M. et al. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsia*: clinical and laboratory findings. **Mem.Inst.Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.103, n.7, p.696-701, nov.2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S007402762008000700012&script=sci_arttext&lng=es Acesso em 12 fev 2018.

PIRANDA, E.M. et al. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsia*, using experimentally infected dogs. **Vector-Borne Zoonotic diseases**, v.11, p.29-36, 2011.

RANGE, F.; VIRÁNYL, Z. Tracking the evolutionary origins of dog-human cooperation: The "Canine Cooperation Hypothesis". **Frontiers in Psychology**, v.5, n.OCT, p.1-10, 2014.

RAOULT, D. and ROUX, V., Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infections Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, p. 694-719, vol.10, nº4, Oct. 1997.

REGENDANS, P.; MUNIZ, J. Pesquisas sobre a transmissão do typho exanthematico de São Paulo por ixodídeos, **Brasil Med.** 1936, v.50, p.45-48.

REGNERY, R.L.; SPRUIL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraespecific sequences divergence for portion of two Rickettsial gene. **Journal of Bacteriology**, v.173, n.5, p.1576-1589, 1991.

RODRIGUES, Daniel Sobreira et al. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on some laboratory hosts in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 6, p. 853-856, Sept. 2002. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762002000600018&lng=en&nrm=iso>. access on 15 Dec. 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000600018>.

ROSENTAL, T.A. Cluster of *Rickettsia rickettsia* infection at an animal shelter in urban area of Brazil. **Epidemiol.Infect.**, v.143, p.2446-2450. 2015.

SABATINI, GS et al. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. **J Med Entomol** 47:913–916, 2010.

SANGIONI, L.A. et al. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. **Emerging Infections Diseases**, V.11(2), p.265-270, Feb.2005.

SARAIVA, D.G. et al. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsia* to vertebrate hosts. **Emerging Infectious Diseases**. V.20(9), p.1504-1510, sep.2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4178383/>> visto em: 2018-02-15.

SCINACHI, C.A. et al. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**, v.166, p.225-233, 2017.

SILVA, N. et al. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerg Infect Dis** 17:275–278, 2011.

SILVA, P.M. et al. Febre Maculosa: uma análise epidemiológica dos registros do Sistema de vigilância do Brasil. **Scientia Plena**, v.10, n.4, p.1-9, 2014.

SOARES, J.F. et al. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsia*, the agent of Rocky Mountain Spotted Fever. Medical Spotted Fever. **Medical and Veterinary Entomology**. V.26, n.2, p.139-51, 2012.

SOUZA, C.E. et al. 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, Apr.2009.

SPOLIDORIO, M.G. et al. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brasil. **Emerg.Infect.Dis.** V.16(3), p.521-523, Mar.2010.

SPOLIDORIO, M.G. Pesquisa Sorológica por doenças transmitidas por carrapatos em cães da Amazônia Oriental, Brasil. **Rev.Bras Parasitol. Vet**, V.22, nº1, Apr/Jun 2013.

SZABÓ, M.P.J. et al. Tick Fauna from two locations in the Brazilian savannah. and **Applied Acarology**, V.43, p.73-84, 2007.

SZABÓ, M.P.J. et al. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in South-eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v.103, n.1, p.57-72, 2009.

SZABÓ, MP.J. et al. A surrogate life cycle of *Amblyomma ovale* Kock, 1844. **Ticks and tick-borne disease**, V.3, p.262-264, 2012.

SZABÓ, M.P.J. et al. *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.

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.27, 2013.

TORRES, P.; PRADO, P. Domestic dogs in a fragmented landscape in the Brazilian Atlantic Forest: abundance, habitat use and caring by owners. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, n.4, p.987-994, nov.2010.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, F.A. Comportamento de alguns Cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Mem. Inst Butantan**, V.15, p.73-86, 1942.

UDELL, M.A.; WYNNE, C.D. A review of Domestic Dogs' (*Canis familiaris*) Human-Like Behaviors: Or why Behavior Analysts Should Stop Worrying and Love their Dogs. **Journal of the Experimental Analysis of Behavior**, v.89, n.2, p.247-261, 2008.1, n.3, p.65, 2017.

UENO et al..Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. **Parasites & Vectors**. v9, p.499, Mar.2016.

UWCT. Domestication: The evolution of the dog. Disponível em: <https://ukwct.org.uk/files/domestication.pdf> Acesso em 12 fev.2018.

VALLEJO-FREIRE, A. et al. Transmission of the Agent of Mexican Spotted Fever by *A.striatum*. **Memórias do Instituto Butantan**, V.20, 1947.

VIEIRA, A.M.L. et al. Manual de Vigilância Acarológica, Estado de São Paulo, Secretaria de Estado de Saúde, São Paulo, Brasil, **SUCEN**, p.62, 2004.

WAINE et al. Molecular systematics of the Canidae. **Systematic biology**, v.46, n.4, p.622-53, 1997.

WEINERT, L.A. et al. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**, 7:6, Feb.2009, visto em <https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6> .

WOLF, R.W. et al. Novel Babesia and Hepatozoon agents infecting non-volant small mammals in the Brazilian Pantanal, with the first record of the tick *Ornithodoros guaporensis* in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.7, p.449-456, 2016.

Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877959X1630005X>
Acesso em: 2018-02-13.

ZEMTSOVA, G. et al. Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii israelensis* between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**. V.52, p. 383-392, 2010.

ZRZAVÝ J.; ŘIČÁNKOVÁ, V. Phylogeny of Recent Canidae (Mammalia, Carnivora): relative reliability and utility of morphological and molecular data sets. **Zoologica Scripta**, v.33, n.4, p.311-333, 1 jul.2004.