

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Curso de Medicina Veterinária

Claudia Iorio Budweg

**PESQUISA SOROLÓGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS
ANTI – *RICKETTSIA* SP. EM EQUINOS SADIOS DE CRIAÇÕES
INTENSIVAS LOCALIZADAS NO VALE DO PARAÍBA, SP**

São Paulo

2017

Claudia Iorio Budweg

**PESQUISA SOROLÓGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS
ANTI – *RICKETTSIA* SP. EM EQUINOS SADIOS DE CRIAÇÕES
INTENSIVAS LOCALIZADAS NO VALE DO PARAÍBA, SP**

**Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Medicina
Veterinária da Universidade de Santo
Amaro – UNISA, como requisito
parcial para obtenção do Título
Bacharel em Medicina Veterinária.**

**Orientador: Prof. Dr. Jonas Moraes
Filho**

São Paulo

2017

IORIO BUDWEG, CLAUDIA
PESQUISA SOROLÓGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS
ANTI – RICKETTSIA SP. EM EQUINOS SADIÓS DE CRIAÇÕES
INTENSIVAS LOCALIZADAS NO VALE DO PARAÍBA, SP / CLAUDIA
IORIO BUDWEG. -- São Paulo , 2017
41 f.

TCC Graduação (Medicina Veterinária) - Universidade de Santo
Amaro, 2017

Orientador(a): Jonas Moraes-Filho

1.Febre Maculosa Brasileira. 2.carrapatos. 3.equinos. 4.Vale do
Paraíba , SP. 5.imunofluorescência indireta. I.Moraes-Filho, Jonas,
orient. II.Universidade de Santo Amaro III.Titulo

**PESQUISA SOROLÓGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS
ANTI – *RICKETTSIA* SP. EM EQUINOS SADIOS DE CRIAÇÕES
INTENSIVAS LOCALIZADAS NO VALE DO PARAÍBA, SP**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Medicina Veterinária da Universidade Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para a obtenção do título Bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador (a): Prof. Dr. Jonas Moraes Filho

São Paulo, _____ de _____ de 2017.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Prof. Dr. _____

Conceito Final

AGRADECIMENTOS

Primeiramente ao meu orientador, Prof. Dr. Jonas M. Filho, por todo trabalho e tempo dedicado ao escrever esse trabalho, além do apoio e disponibilidade em me auxiliar em tudo que foi preciso.

A FAPESP pelo auxílio à pesquisa que me foi concedido.

Ao meu grupo de iniciação científica orientado pelo Prof. Dr. Jonas M. Filho, da Universidade de Santo Amaro por toda a ajuda que me deram na realização deste trabalho.

Ao departamento de doenças parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - FMVZ/USP pelo uso de suas instalações para poder ser realizada a parte experimental deste projeto.

Aos proprietários e funcionários das propriedades visitadas, que permitiram a coleta de amostras e me auxiliaram durante o processo.

Ao meu pai por me incentivar a fazer o curso que eu queria, a todo o apoio que me deu durante a ida a cada uma das propriedades para que minhas amostras pudessem ser coletadas.

Aos meus professores que durante esses 5 anos de aprendizado, dividiram seu conhecimento e suas experiências comigo, me tornando uma profissional e uma pessoa melhor.

E a todos que de alguma maneira foram responsáveis pela realização do meu projeto e do meu desenvolvimento acadêmico, o meu muito obrigada.

RESUMO

A febre maculosa é uma doença grave e letal para o ser humano causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*. No Estado de São Paulo, o agente etiológico é transmitido pelo carrapato *Amblyomma sculptum*. O ciclo epidemiológico de transmissão tem sido intensamente estudado e muitos dados foram gerados na última década, no qual os equinos (*Equus caballus*), após inoculações via intravenosa com o agente etiológico, foi demonstrado que esta bactéria foi capaz de infectar estes animais, causando resposta imunológica, funcionando como importantes sentinelas para a doença na região onde vivem. Este projeto tem como objetivo: a) detecção sorológica em equinos provenientes de criações intensivas localizadas no Vale do Paraíba, SP, quanto à presença de anticorpos anti- *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia rhipicephalii* e *Rickettsia bellii*; b) identificação taxonômica dos carrapatos coletados nos animais estudados e, verificar as frequências entre as possíveis infecções de bactérias do grupo da febre maculosa brasileira. Foram visitadas 5 propriedades de produção extensiva de equinos do vale do paraíba , sendo coletados nesses lugares 206 amostras de sangue de animais diferentes. Também foram coletados 256 carrapatos em duas propriedades visitadas, sendo que 3 carrapatos eram da espécie *Amblyomma sculptum* e 253 carrapatos eram da espécie *Dermacentor nitens*. Das amostras de sangue coletadas, 16 amostras responderam sorologicamente para *Rickettsia* spp. sendo, estas 15 amostras da propriedade A e 1 amostra da propriedade C. Dentre estas, 0,97% foi sorologicamente positiva para *Rickettsia bellii* e 0,48% foi sorologicamente positiva para *Rickettsia amblyommi*. Dos 3 carrapatos, que eram da espécie *Amblyomma sculptum*, nenhum foi positivo no PCR de tempo real para *Rickettsia rickettsii*.

Palavras chaves: Febre Maculosa Brasileira, equinos, imunofluorescência indireta, carrapatos, Vale do Paraíba, São Paulo

ABSTRACT

The Brazilian Spotted Fever is a serious and lethal illness for the human being caused by the *Reckettsia rickettsii* bacterium. In the state of São Paulo (Brazil) the etiological agent is transmitted by the *Amblyomma sculptum* tick. The epidemiological transmission cycle has been intensively studied and many facts were discovered in the last decade. In horses (*Equus caballus*) after intravenous inoculation with the etiological agent was demonstrated that this bacterium was capable to infect these animals causing an immune response acting as important sentinels for these disease in the region. This projects has following goal's: a) Sorological analysis to detect, in horses breeding in the "Vale do Paraíba -S.P." region, *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia rhipcephalii* and *Rickettsia belli* antibodies; b) Taxonomic identification of ticks collected in the studied animals and to check the the frequency of possible infections with the Brazilian Spotted Fever bacterium. Five horse breeding (A, B, C, D, E) were visited in the "Vale do Paraíba -S.P." region and a total amount of 206 blood samples, from different animals, and 256 ticks, from two different properties, were collected. 3 of these ticks were from the *Amblyomma sculptum* species and 253 were from *Dermacentor nitens* species. From the collected blood samples, 16 samples had a sorological *Rickettsia spp.* positive response (15 samples from property A and 1 from property C). From these samples 0.97% had a sorological *Rickettsia belli* positive response and 0.48% had a sorological *Rickettsia amblyommii* positive response. No one of the 3 *Amblyomma sculptum* ticks were positive regarding PCR real time for *Reckettsia rickettsii*.

Key words: Brazilian Spotted Fever. Horses, indirect immunofluorescence, ticks, Vale do Paraíba, São Paulo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Localização das propriedades de criação intensiva de equinos no vale do Paraíba, que foram visitadas para a realização do projeto	26
Figura 2 - Quantidade de amostras de sangue coletadas em cada propriedade que foi visitada para a realização desse projeto.....	27
Figura 3 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quantidade, espécie e fase da vida dos carrapatos que foram coletados nas propriedades A e D	27
Tabela 2 - Resultados do Teste de Imunofluorescência indireta para <i>Rickettsia</i> spp, das amostras que foram coletadas em Propriedades do Vale do Paraíba e foram positivas para algum tipo de <i>Rickettsia</i> spp.	28

LISTA DE ABREVIATURAS

A. ovale – *Amblyomma ovale*

A. aureolatum – *Amblyomma aureolatum*

A. sculptum – *Amblyomma sculptum*

BHI – Brain Heart Infusion

FMB – Febre Maculosa Brasileira

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

R. amblyommii – *Rickettsia amblyommii*

R. belli – *Rickettsia belli*

R. parkeri – *Rickettsia parkeri*

R. rhipicephallii – *Rickettsia rhipicephallii*

R. rickettsii - *Rickettsia rickettsii*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Importância do equino no Brasil.....	12
1.2 Febre Maculosa	13
1.3 <i>Rickettsia rickettsii</i>	14
1.4 Vetores.....	15
1.4.1 Carrapatos.....	15
1.4.2 <i>Amblyomma sculptum</i>	15
1.4.3 <i>Amblyomma aureolatum</i>	16
1.4.4 <i>Amblyomma ovale</i>	17
1.5 Hospedeiros	18
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS.....	22
4.MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1 População alvo.....	23
4.2 Colheita dos materiais.....	23
4.3 Carrapatos	24
4.4 Extração de DNA dos carrapatos.....	24
4.5 PCR em tempo real para <i>R. rickettsii</i>	24
4.6 Imunofluorescência indireta para <i>R. rickettsii</i> , <i>R.parkeri</i> , <i>R. rhipicephalii</i> , <i>R. amblyommii</i> e <i>R. bellii</i>	24
5. RESULTADOS	26
6. DISCUSSÃO.....	29
7.CONCLUSÃO:.....	31
8.ÉTICA.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
9. ANEXO A.....	41

1. INTRODUÇÃO

1.1 Importância do equino no Brasil

O cavalo exerceu um importante papel na formação econômica, social e política do Brasil, apesar desta memória ser pouco discutida na literatura¹.

Os equinos foram usados unicamente como meio de transporte e nas atividades agropecuárias durante muitos anos, mas atualmente têm conquistado outras áreas de atuação tais como: utilização militar do cavalo (ações de Garantia da Lei e da Ordem, patrulhamento em Organizações Militares e nos Campos de Instrução), participação em cerimonial militar, produção de imunobiológicos (soro antiofídico) em convênio do Ministério da Saúde com o IBEx – Instituto de Biologia do Exército, prática desportiva, integrando comissões de desportos nacionais, atividades de equoterapia¹.

O uso da força animal permitiu o acesso a solos inapropriados para o cultivo manual, em situações de limitada oferta de mão-de-obra, a tração animal permitiu o cultivo de extensas áreas de terra que até hoje são utilizadas no cultivo da cana-de-açúcar no Nordeste do Brasil¹. Há também a utilização do animal no lazer e nos esportes (provas de funcionalidade, marcha, salto, corrida, tambor, baliza, laço, *team roping*, buldog vaquejada entre outras)^{1,2}.

O Brasil possui o maior rebanho de equinos na América Latina e o terceiro mundial, que no último censo realizado pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) em 2012, a população de equinos no Brasil era de 5.363.185¹.

Somente a produção de cavalos movimentou R\$ 7,3 bilhões e o rebanho envolve mais de 30 segmentos, distribuídos entre insumos, criação e destinação final e compõe a base do chamado Complexo do Agronegócio do Cavalo, responsável pela geração de 3,2 milhões de empregos diretos e indiretos. Ainda mais, o Brasil é o oitavo maior exportador de carne equina, sendo que seus principais importadores são a Bélgica, Holanda, Itália, Japão, França movimentando US\$ 4,4 milhões¹.

1.2 Febre Maculosa

Dentro do filo Artrópoda, os carrapatos são considerados vetores de um número de agentes infecciosos maiores do que qualquer outro grupo, inclusive o dos mosquitos³. Das aproximadamente 825 espécies de carrapatos descritos no mundo, apenas cerca de 10% assumem uma maior importância direta em saúde pública, devido às possibilidades desses carrapatos parasitarem humanos⁴. Obviamente, várias outras espécies que nunca foram descritas parasitando humanos, assumem importante papel indireto na saúde pública, pois contribuem para a manutenção enzoótica de agentes infecciosos na natureza^{5,6}.

No entanto, quando se refere à fauna ixodológica do Brasil, composta por 64 espécies de carrapatos^{7,8}, a literatura é ainda muito escassa. Apenas a febre maculosa é reconhecida atualmente como uma zoonose transmitida de carrapatos para humanos no Brasil⁵.

A febre maculosa, zoonose causada pela espécie *Rickettsia rickettsii* (*R. rickettsii*), foi primeiramente descrita nos Estados Unidos, onde a doença recebeu o nome de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. Neste país, o pesquisador Dr. Howard Taylor Ricketts realizou o primeiro isolamento de *R. rickettsii* no início do século XX, quando também estabeleceu o papel do carrapato *Dermacentor andersoni* na transmissão da doença⁹. Atualmente, *D. andersoni* é o vetor da *R. rickettsii* na costa oeste, enquanto que *Dermacentor variabilis* é o vetor na costa leste dos Estados Unidos. Ambas espécies foram profundamente estudadas quanto a sua biologia, ecologia e competência vetorial^{6,10}. No Brasil, a bactéria é transmitida primariamente por carrapatos do gênero *Amblyomma*⁶.

Riquétsias são cocobacilos, intracelulares obrigatórios, medindo entre 0,3 - 0,5 µm por 0,8-2,0 µm, possuem uma estrutura trilaminar com uma camada de peptidoglicano e uma membrana exterior de dupla camada. O citoplasma destas bactérias contém ribossomos e filamentos de DNA. Dentro das células hospedeiras as riquétsias não são coradas pelo método de Gram, mas pelo método de Gimenez que retêm fuscina básica quando coradas¹¹. Aplicando este método, elas aparecem vermelho brilhante, enquanto o fundo é manchado em azul pálido com a contrastante verde malaquita¹². Estas bactérias pertencem à família Rickettsiaceae e à ordem Rickettsiales¹³.

Recentemente, com o uso de ferramentas moleculares aplicadas, foi possível sugerir através de uma análise multigênica, uma nova filogenia para o gênero *Rickettsia*, como segue: i) grupo do tifo (GT), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; ii) grupo da febre maculosa (GFM), representado por mais de vinte espécies; iii) grupo de transição (GTr), onde estão inseridas *Rickettsia akari*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia australis*; iv) grupo canadensis (GC), formado pela espécie *Rickettsia canadensis* e afins; 5) grupo bellii (GB), representado pela espécie *Rickettsia bellii* (*R. bellii*) e uma gama de outros genótipos encontrados em insetos^{14,15}.

1.3 *Rickettsia rickettsii*

No Brasil, a Febre Maculosa Brasileira foi descrita pela primeira vez pelo médico e pesquisador José Toledo Piza em 1929, em São Paulo¹⁶.

No início da década de 1930, em São Paulo - SP, as pesquisas demonstraram pela primeira vez que o carrapato *Amblyomma sculptum* foi infectado experimentalmente com o agente causador da doença, quando alimentado em cobaia doente, experimentalmente infectada. No mesmo ano, foi demonstrado a transmissão intra-estadial e vertical do agente da FMB pelo carrapato *Amblyomma sculptum* (*A. sculptum*)¹⁷. No ano seguinte, o agente etiológico foi isolado em cobaia a partir de um exemplar de *Amblyomma aureolatum* (*A. aureolatum*)(Sin. *A. ovale striatum*) adulto coletado de um cão¹⁸. Segundo Pinter (2006), este representa o primeiro isolamento da bactéria causadora da FMB realizado a partir de carrapatos no Brasil. Após sete décadas, o isolamento e a manutenção em cultura de células Vero de *R. rickettsii* cepa Taiacu ocorreu a partir de *A. aureolatum*, em São Paulo¹⁹. Até o presente momento, na América Latina, *R. rickettsii* nunca foi isolada diretamente de *A. sculptum* em cultivo celular pela técnica de shell vial, devido a sua baixa taxa de infecção na população de *A. sculptum*. Entretanto, recentemente, obtiveram com sucesso pela primeira vez, um isolado viável de *R. rickettsii* cepa Itu em cultivo celular, a partir de tecidos de cobaia infectada com macerado de *A. sculptum* infectado por *R. rickettsii* em meio de cultura BHI (brain-heart infusion)²⁰.

O *A. sculptum* que tem a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e o cavalo (*Equus caballus*) como hospedeiros primários nas áreas endêmicas para Febre Maculosa Brasileira (FMB). No entanto, uma vez que a população deste carrapato aumente em uma determinada área, outras espécies de hospedeiros acidentais, como

os cães e os seres humanos, tornam-se mais frequentemente infestados por larvas, ninfas e adultos, mas a maioria sem competência biológica para sustentar uma população deste carrapato^{21,22,23}.

Outros países do continente americano reportaram casos de febre maculosa causada por *R. rickettsii*, como México (Febre Manchada), Canadá, Colômbia (Febre de Tobia), Argentina, Costa Rica e Panamá^{24,25,26,27,28,29,30}.

1.4 Vetores

1.4.1 Carrapatos

A maioria das espécies de *Rickettsia* está associada a carrapatos, sendo estes considerados os seus reservatórios e vetores³¹. Todavia, carrapatos do gênero *Amblyomma* são os mais representativos com 30 espécies e muitos destes de importância para a Saúde Pública e animal^{32,33,34,35}.

No Brasil, as 21 espécies de carrapatos descritas com *Rickettsias* são dos gêneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus*: *A. aureolatum*, *A. auricularium*, *A. sculptum*, *A. calcaratum*, *A. coelebs*, *A. dubitatum*, *A. geayi*, *A. incisum*, *A. humerale*, *A. longirostre*, *A. nodosum*, *A. oblongoguttatum*, *A. ovale*, *A. parvum*, *A. rotundatum*, *A. sculpturatum*, *A. tigrinum* e *A. triste*; *H. juxtakochi*; *I. loricatus* e *R. sanguineus*^{17,18,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47}.

O cavalo é um dos hospedeiros primários do *A. sculptum* no Brasil⁴⁸. Este fato reforça a importância do cavalo, quando investigamos a ocorrência de febre maculosa em uma região⁴⁹.

1.4.2 *Amblyomma sculptum*

O *A. sculptum* é amplamente distribuído pelas áreas neotropical, sendo encontrado desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, incluindo as ilhas Caribenhas⁵⁰. O carrapato tem sua importância caracterizada pela sua larga distribuição geográfica e pela sua baixa especificidade com os hospedeiros e pela sua participação na epidemiologia da febre maculosa⁵¹.

De acordo com a literatura, o *A. sculptum* é descrito como provavelmente o vetor mais importante da *R. rickettsii*, o agente causador da febre maculosa⁵².

Apesar das ninfas dos *A. sculptum* possuírem uma forte associação de carrapato-hospedeiro com os canídeos silvestres⁵³, o carrapato já foi encontrado parasitando uma grande variedade de espécies selvagens, fato que torna o seu controle muito difícil⁵⁴.

Acredita-se que a capivara é um dos hospedeiros primários do *A. sculptum* na América do Sul⁴⁸. Depois que os colonizadores europeus trouxeram os cavalos para América Latina, os carrapatos os parasitaram e tornaram-se outro hospedeiro primário do *A. sculptum*, que parasita os cavalos em todas as suas etapas de vida⁵⁵.

O *A. sculptum* é o carrapato que mais parasita humanos nas Américas Central e do Sul⁴⁸.

O *A. sculptum* produz uma geração por ano, sobre condições normais do ambiente, tendo predominância da população de larvas entre abril e julho, predominância de ninfas entre julho e outubro e de adultos entre os meses de outubro e março⁵⁶.

Já foi descoberto que o *A. sculptum* é capaz de sobreviver mais do que um ano em um laboratório, nas condições ideais⁵⁷. Porém, quando vivem na natureza, a vida do carrapato costuma ser mais curta, pois existe competição com outros carrapatos, variação temperatura e a imunidade do hospedeiro⁵⁸.

1.4.3 *Amblyomma aureolatum*

A. aureolatum pode ser encontrada em diversas regiões do Brasil, parasitando em diversos animais, como cão, cabra, boi, gambá, veado, capivara, quati e diversos outros canídeos silvestres⁵⁹.

Classifica-se o *A. aureolatum* como um dos carrapatos que mais parasitam espécies de canídeos silvestres no Brasil⁶⁰.

A. aureolatum é um dos carrapatos do gênero *Amblyomma*, que mais parasita o cão doméstico em áreas rurais do sul e sudeste do Brasil⁸. Em algumas áreas de São Paulo, o *A. aureolatum* é considerado o maior vetor da *R. rickettsii*, a bactéria responsável por causar a febre maculosa⁶¹.

De acordo com a literatura, os carnívoros, como o cão e a raposa, são os hospedeiros primários mais comuns do *A. aureolatum* em sua fase adulta. Há estudos que mostram que fases imaturas do *A. aureolatum*, parasitam pequenos roedores e

pássaros⁶². Esses estudos sugerem que tanto os pássaros como os pequenos roedores são hospedeiros primário do *A. aureolatum* em suas fases imaturas. Em sua fase adulta, o carrapato foi descrito como um parasita de humanos⁸.

Existe uma carência de informações na literatura sobre o ciclo de vida completo do *A. aureolatum*, mas já foi constatado que ele é um carrapato muito sensível de se criar em laboratório, necessitando de umidade e temperatura ideais⁶³.

Normalmente, as infestações causadas por estes carrapatos em cachorros, são causadas por poucos espécimes, isto deve-se provavelmente ao fato de que fatores naturais controlam o número de carrapatos no ambiente⁶⁴.

1.4.4 *Amblyomma ovale*

Amblyomma ovale (*A. ovale*) pode ser encontrada em diversos países da América Latina, distribuído entre México e a Argentina⁵³. As populações dos carrapatos são encontradas em toda a América do Sul, com exceção do Chile e Uruguai⁶².

Esta espécie de carrapato tem como hospedeiros os pardais, quatis, raposas e onças. Além disso, de acordo com a literatura, sugere-se que o puma, a onça e o gato doméstico podem ser outros hospedeiros do *A. ovale* adulto⁵⁴. Apesar disso, a grande maioria dos carrapatos são encontrados parasitando o cão doméstico. É provável que este fato ocorra por existir mais estudos com esta espécie, ao contrário de sua fase adulta, que se sabe muito pouco sobre seus hospedeiros em suas fases imaturas⁶².

Nos estágios imaturos do carrapato, eles parasitam outros hospedeiros, principalmente os roedores⁵³.

A. ovale tem sido considerado um carrapato de importância para os humanos, já que é o que pica humanos com maior frequência na região da Amazônia Brasileira Ocidental⁶⁰. Todas as infestações em humanos são causadas pela fase adulta do carrapato, que foi recentemente descoberta que está naturalmente infectada pela bactéria *Rickettsia parkeri* (*R. parkeri*)⁶⁵.

1.5 Hospedeiros

Os animais domésticos e silvestres estão frequentemente expostos a diferentes espécies de carrapatos, dependendo da distribuição destes no ambiente, podem possuir um papel fundamental na transmissão de bioagentes patogênicos para humanos e animais de forma excepcional⁶⁶.

O equino e outros mamíferos são considerados como susceptíveis a infecção com o agente causador da febre maculosa, desde que foram detectados anticorpos contra *Rickettsia* em estudos sorológicos⁴⁹.

Pelo cavalo ser um animal próximo do homem, ele pode ter um papel importante na cadeia epidemiológica da febre maculosa humana, uma vez que os cavalos são de livre movimentação e podem dispersar os carrapatos infectados que irão se estabelecer em outras regiões e transmitir a doença ⁶⁷.

O cavalo pode ter infecções cruzadas dos gêneros de *Rickettsia*, fato que pode contribuir para a sua importância como animal sentinela⁴⁹.

Embora a possibilidade da participação de animais silvestres no ciclo da FMB já ter sido sugerida por Ricketts em 1909, é importante salientar que nos EUA, várias espécies de pequenos roedores foram apontadas como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii*^{6,68}.

No Brasil, pela primeira vez uma amostra do agente causador da FMB a partir de um animal silvestre foi de Moreira e Magalhães em 1935. Através de um experimento, os autores conseguiram reproduzir a doença em cobaias, após inoculação de sangue colhido de um gambá *Didelphis* sp. Estes pesquisadores, utilizando a técnica de diagnóstico indireto de Weil-Felix, listaram como prováveis reservatórios do agente da FMB, o gambá (*Didelphis aurita*), o cão (*Canis familiaris*), o cachorro do mato (*Dusicyon* sp - Sin. *Canis brasiliensis*), o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis* - Sin. *Sylvilagus minensis*), o preá (*Cavia aperea*), a cutia (*Dasyprocta azarae*), capivara (*Hydrochaerus hydrochaerus*) e as aves, que de acordo com seus trabalhos podem albergar o vírus do tifo exantemático^{69,70,26}.

De modo geral, as espécies de riquetsias associadas a carrapatos são transmitidas entre gerações por transmissão transovariana e perpetuam transestadialmente, fazendo dos carrapatos, importantes reservatórios da riquetsias na natureza^{71,72}. Para muitas espécies de riquetsia (ex. *Rickettsia africae*, *Rickettsia rhipicephali*), este mecanismo de sobrevivência na população de carrapato é tão

eficiente, que possivelmente garanta, por si só, a manutenção da riquetsias na natureza. Para outras espécies de riquetsias, tal como *R. rickettsii*, este mecanismo é menos eficiente, pois a infecção por esta espécie de riquetsia no carrapato pode diminuir a capacidade reprodutiva de fêmeas adultas, podendo ser inclusive letal para o ixodídeo^{68,73}. Portanto, mesmo que os mecanismos de transmissão transovariana e perpetuação transestadial sejam extremamente importantes para a sobrevivência de *R. rickettsii* na natureza, por si só não devem ser suficientes para a manutenção da bactéria⁷¹.

Neste caso, os animais vertebrados, hospedeiros naturais dos carrapatos vetores da *R. rickettsii*, devem assumir um papel fundamental na amplificação da infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos^{74,75}. Diante desta premissa, pesquisadores das Américas do Norte e do Sul vêm buscando, desde o início do século XX, encontrar animais silvestres naturalmente infectados por *R. rickettsii*, a fim de compreender melhor a ecologia da febre maculosa⁷⁴.

Horta et al., 2009⁷¹, avaliou a infecção de gambás (*Didelphis aurita*) por *R. rickettsii* e seu papel como hospedeiros amplificadores para transmissão horizontal para carrapatos *A. sculptum*, onde demonstrou que a bactéria foi capaz de infectar gambás, sem causar doença e desenvolver riquetsemia suficiente para causar infecção em cobaias e carrapatos.

Souza et al, 2009⁷², avaliou capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), após serem inoculadas via intravenosa com material biológico contaminado com *Rickettsia rickettsii*, com relação ao seu papel como hospedeiros amplificadores para transmissão horizontal para carrapatos *A. sculptum*, onde demonstrou que a bactéria foi capaz de infectar estes animais, sem causar doença e desenvolver riquetsemia muito mais eficientes e com maiores intervalos de duração comparados aos resultados de Horta et al. 2009⁷², sendo suficiente para causar infecção em cobaias e carrapatos.

Ueno, 2014⁷⁶, avaliou os equinos (*Equus caballus*), após inoculações via intravenosa de *Rickettsia rickettsii*, demonstrando que está bactéria foi capaz de infectar estes animais, causando resposta imunológica, mas não causou a doença, não apresentando riquetsemia nestes animais e infecção em carrapatos que se alimentaram nos mesmos no período pós inoculação do agente etiológico, e estes carrapatos que foram usados nas infestações destes cavalos, não foram capazes de transmitir a bactéria a outros animais susceptíveis para a doença.

No entanto, por conta do papel do cavalo como um animal sentinela, a presença de sorologia positiva em cavalos e a detecção molecular de riquetsias patogênicas em artrópodes vetores, indicam a necessidade de se manter um sistema de vigilância epidemiológica na região. Somando o fato desses animais serem de livre movimentação, podem disseminar carrapatos infectados em outras áreas, levando ao aparecimento de novos surtos⁶⁷.

2. JUSTIFICATIVA

Estudos sorológicos e moleculares em vetores de doenças são muito importantes para avaliar a real situação de uma determinada região para a existência ou não de doenças zoonóticas. O equino funciona como uma boa sentinela para nos mostrar o quanto uma área pode ser considerada de risco para a transmissão da febre maculosa brasileira para os animais e seres humanos. Com a realização deste trabalho, a região do Vale do Paraíba do Estado de São Paulo, pode ser estudada e avaliada quanto à presença do agente zoonótico, e a partir dos resultados obtidos, estudos de prevenção e controle poderão ser desenvolvidos.

3. OBJETIVOS

Este projeto teve como objetivo:

- a) Detecção sorológica nos equinos provenientes de criações intensiva localizadas no Vale do Paraíba no Estado de São Paulo, quanto à presença de anticorpos anti- *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia amblyommii* (*R. amblyommii*), *Rickettsia rhipicephallii* (*R. rhipicephallii*) e *Rickettsia bellii*.
- b) Identificação taxonômica dos carrapatos coletados nos equinos provenientes de criações intensiva localizadas no Vale do Paraíba no Estado de São Paulo, verificar as frequências entre as possíveis infecções de bactérias do grupo da febre maculosa brasileira.

4.MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 População alvo

A população alvo deste projeto científico foram os equinos provenientes de criações intensivas localizadas no Vale do Paraíba do Estado de São Paulo, SP.

O Vale do Paraíba é um acidente geográfico natural que abrange as Mesorregiões: Região Metropolitana do Vale do Paraíba e Litoral Norte, no estado de São Paulo e Mesorregião do Sul Fluminense, no estado do Rio de Janeiro, que se destaca por concentrar uma parcela considerável do PIB do Brasil.

O nome deve-se ao fato de que a região é parte da bacia hidrográfica do rio Paraíba do Sul, já que esse rio se estende por parte do estado de São Paulo e ao longo de quase todo o comprimento do estado do Rio de Janeiro e parte do estado de Minas Gerais.

Localiza-se nas margens da rodovia Presidente Dutra (BR-116), exatamente entre as cidades do Rio de Janeiro e São Paulo, dentro do complexo metropolitano formado pelas duas capitais e com seu principal eixo urbano seguindo o traçado da Via Dutra. Apesar de altamente urbanizada e industrializada, a região também tem reservas naturais importantes, como a Serra da Mantiqueira, na divisa com Minas Gerais, um dos pontos mais altos do Brasil, e a da Bocaina, reduto de Mata Atlântica que também inclui pequenas cidades e fazendas de interesse histórico e arquitetônico. A agropecuária ainda é de grande importância para vários municípios dessa região.

4.2 Colheita dos 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 (Anexo A)

As amostras de sangue foram obtidas assepticamente por venopunção da jugular, com agulha 30x7 mm, seringa de 5 mL. Após a colheita, tais amostras foram mantidas em temperatura ambiente e posteriormente centrifugadas para a obtenção do soro, que foi alíquotado e armazenado a – 20°C até o momento de sua análise.

4.3 Carrapatos

Os carrapatos foram coletados no momento em que foi coletado sangue dos animais.

Eles foram conservados em frascos com álcool 70^o e identificados conforme Barros-Battesti et al. 2006³².

4.4 Extração de DNA dos carrapatos

As amostras de carrapatos foram processadas individualmente à extração de DNA, utilizando-se o “kit” de extração “Dneasy Tissue Kit” (Qiagen, Chatsworth, CA), conforme instruções do fabricante.

4.5 PCR em tempo real para *R. rickettsii*

Para detecção de *Rickettsia rickettsii* através de PCR, cada amostra de DNA extraído de carrapatos foi testada individualmente pelo protocolo de real-time PCR descrito por Labruna et al. (2004)³⁶. Este protocolo utiliza um par de primers (CS5 e CS6) que amplificam um fragmento de 147 nucleotídeos do gene citrosintase de *Rickettsias pp*, 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 citrosintase de *R. rickettsii*. Ao final do experimento, os carrapatos positivos no real-time PCR foram testados por PCR convencional utilizando-se os primers Rr190.70F e Rr190.602R, que amplificam um fragmento de 532-pb apenas para *Rickettsia* do grupo da febre maculosa (Regnery et al, 1991). Os fragmentos amplificados foram seqüenciados em seqüenciador automático de DNA, conforme previamente descrito⁷⁸.

4.6 Imunofluorescência indireta para *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephalii*, *R. amblyommii* e *R. bellii*

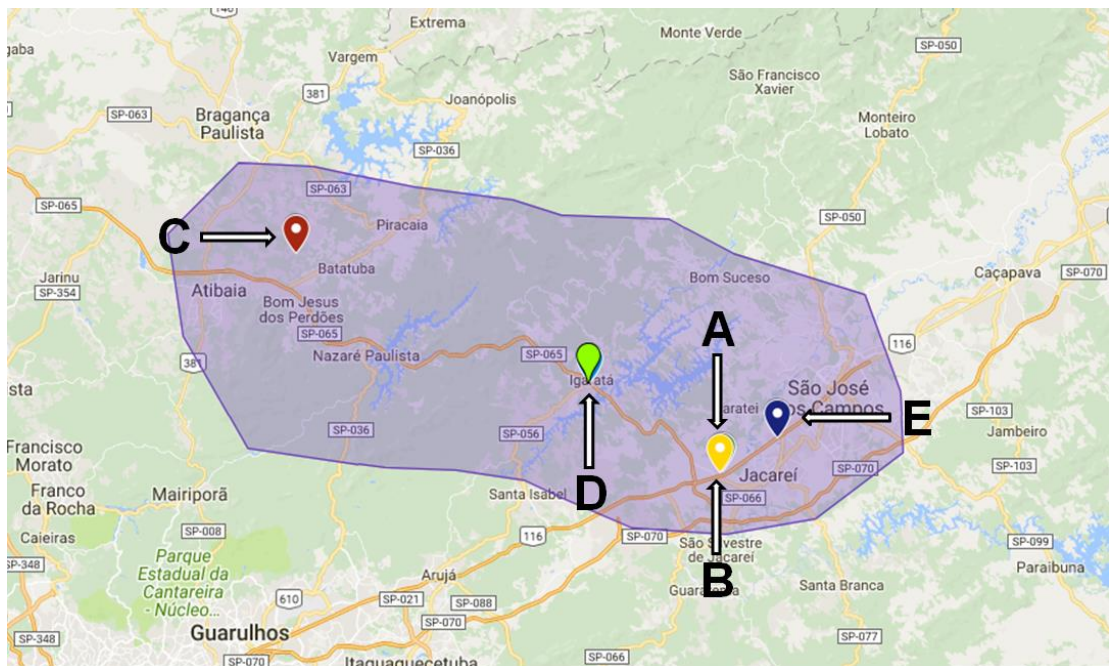
Todos os equinos utilizados no trabalho foram oriundos das criações intensivas descritas anteriormente. Os soros sanguíneos dos animais foram testados pela técnica de imunofluorescência indireta frente aos antígenos, conforme previamente

descrito⁷⁹.As amostras que tiveram reação positiva na diluição de triagem (1/64), tiveram os soros testados para determinação do título final de reação⁷⁹ .

5. RESULTADOS

Para a realização desse trabalho, 5 propriedades de produção extensiva de equinos do vale do paraíba foram visitadas. Elas foram denominadas como propriedades A, B, C, D e E. (Figura 1)

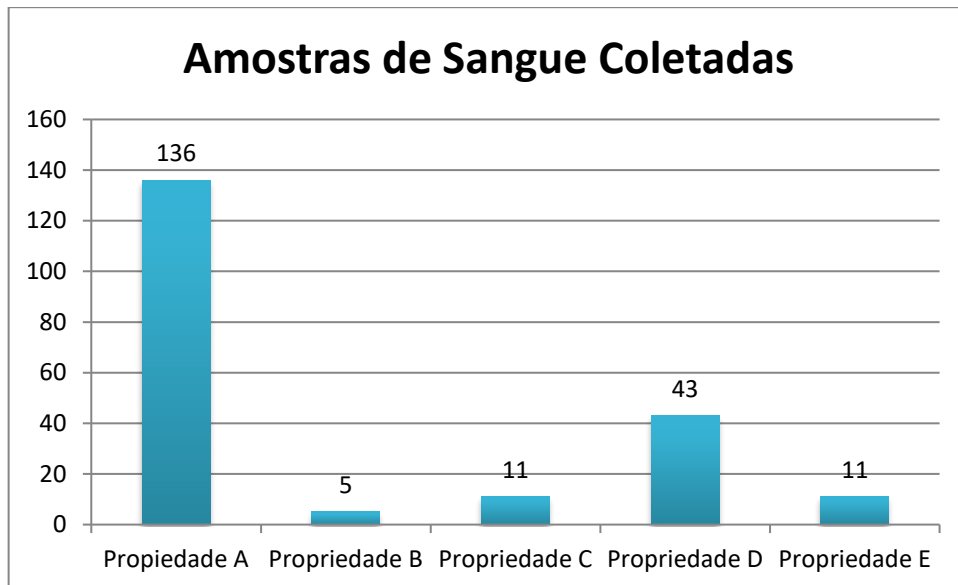
Figura 1 - Localização das propriedades de criação intensiva de equinos no vale do Paraíba, que foram visitadas para a realização do projeto



Fonte: O autor (2017)

Nessas 5 propriedades foram coletadas 206 amostras de sangue de animais diferentes sendo que na propriedade A foram coletadas 136 amostras, na propriedade B foram coletadas 5 amostras, na propriedade C foram coletadas 11 amostras, na propriedade D foram coletadas 43 amostras e na propriedade E foram coletadas 11 amostras (figura 2).

Figura 2 - Quantidade de amostras de sangue coletadas em cada propriedade que foi visitada para a realização desse projeto



Fonte: O autor (2017)

Também foram coletados 256 carrapatos em duas propriedades visitadas, sendo 253 carrapatos coletados na propriedade A e 3 carrapatos da propriedade D. Os 253 carrapatos coletados na propriedade A foram identificados taxonomicamente como *Dermacentor nitens*, sendo 8 ninfas, 2 larvas, 158 fêmeas e 85 machos. Os 3 carrapatos da propriedade D foram identificados como *A. sculptum* e todos eram fêmeas adultas (tabela 1).

Tabela 1 - Quantidade, espécie e fase da vida dos carrapatos que foram coletados nas propriedades A e D

	Propriedade A	Propriedade D
Espécie	<i>Dermacentor nitens</i>	<i>Amblyomma sculptum</i>
Quantidade		
Carrapatos	253	3
Larvas	2	0
Ninfas	8	0
Fêmeas	158	3
Machos	85	0

Fonte : O autor(2017)

Das amostras de sangue coletadas, 16 amostras responderam sorologicamente para *Rickettsia* spp sendo, 15 amostras da propriedade A e 1 amostra da propriedade C. Dentre estas, 0,97% foi sorologicamente positiva para *R. bellii* e 0,48% foi sorologicamente positiva para *R. amblyommi* (tabela 2).

Tabela 2 - Resultados do Teste de Imunofluorescência indireta para *Rickettsia* spp, das amostras que foram coletadas em Propriedades do Vale do Paraíba e foram positivas para algum tipo de *Rickettsia* spp.

Amostra	Propriedade	<i>R.rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. amblyommi</i>	<i>R. rhipicephallii</i>
3	A	2048	1024	64	1024	1024
5	A	128	Negativo	Negativo	128	128
17	A	128	Negativo	Negativo	1024	256
20	A	512	64	Negativo	512	256
34	A	Negativo	Negativo	512	256	128
65	A	128	Negativo	Negativo	64	Negativo
78	A	Negativo	Negativo	Negativo	64	Negativo
81	A	Negativo	Negativo	1024	Negativo	Negativo
83	A	512	64	512	128	64
87	A	Negativo	Negativo	64	Negativo	Negativo
97	A	Negativo	Negativo	Negativo	64	Negativo
98	A	128	256	1024	256	1024
116	A	128	64	256	256	128
119	A	Negativo	Negativo	128	Negativo	Negativo
120	A	64	256	Negativo	64	512
148	C	64	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Fonte: O autor (2017)

Os 3 carrapatos que foram coletados na propriedade D foram negativos na PCR em tempo real para a *Rickettsia* spp.

6. DISCUSSÃO

Apesar de que a propriedade A apresentou o maior índice de amostras que responderam sorologicamente para *Rickettsia* spp, nenhum dos 253 carrapatos eram *A. sculptum*, que pode indicar que os animais não se contaminaram com as bactérias dentro da propriedade.

Já na propriedade D, onde foram encontrados carrapatos do gênero *Amblyomma*, nenhum dos 43 animais que tiveram seu sangue coletado responderam sorologicamente para *Rickettsia* spp e, além disso, os carrapatos lá encontrados foram negativos na PCR em tempo real para a *Rickettsia* spp. Isto indica que a propriedade é livre da bactéria.

Na propriedade C, nenhum carrapato foi encontrado, porém 1 animal reagiu sorologicamente para *Rickettsia* spp, indicando a possibilidade de que o animal tenha sido infectado em uma área fora dos limites da propriedade.

Tanto a propriedade B quanto a propriedade E não tiveram animais que responderam sorologicamente para *Rickettsia* spp e também não foram encontrados carrapatos durante a coleta. Isso provavelmente está relacionado ao fato de que as propriedades serem menores, possuindo um manejo mais fácil e controle mais intenso ao carrapato.

Os animais que responderam sorologicamente para *Rickettsia* spp, provavelmente não se infectaram em suas propriedades, pois não foram encontrados os vetores da doença nestes locais, levantando a suspeita de que a contaminação com este agente etiológico tenha ocorrido nas exposições que os criadores participaram ou em passeios pela região, que possui trilhas e áreas de matas que facilitaria o contato destes animais com os carrapatos.

Assim como no projeto de Medeiros et al 2013⁴⁹ onde 150 amostras de sangue de equinos foram coletadas em duas mesorregiões de Santa Catarina e todas as amostras de soro dos cavalos reagiram para mais de um tipo de *Rickettsia*, apenas 5 das 16 amostras positivas, desse projeto não tiveram reação cruzada com outras espécies de *Rickettsia*.

No projeto de Batista et al 2010⁸⁰ realizado em Almirante Tamandaré, região onde não há casos da doença, foram coletados carrapatos e amostras de sangue de cavalos e cães e testados para a presença de *Rickettsia* spp. Nenhum destes carrapatos foi positivo no PCR para *Rickettsia* spp. Mas 6 cavalos foram soropositivos

pra *Rickettsia* spp. Os resultados encontrados por estes pesquisadores foram semelhantes ao de Toledo et al. 2009⁸¹, onde também foram coletadas amostras de sangue de cães, cavalos e humanos além da coleta de carrapatos no estado do Paraná. Os carrapatos que Toledo et al. 2009⁸¹ encontrou nos cavalos foram da espécie *Dermacentor nitens* e *A. sculptum*, onde todos foram negativos no teste de PCR para *Rickettsia* spp. Os resultados dos dois trabalhos se assemelham ao encontrado no presente estudo, onde também foram encontradas as mesmas espécies de carrapatos e apresentando resultados similares nos testes moleculares (negativos).

No trabalho de Souza et al. de 2016⁸², que estudou a soro prevalência de equinos sadios para a presença de anticorpos contra a bactéria *R.rickettsii* em áreas silenciosas para a doença, relata que os maiores títulos para este agente etiológico foram encontrados nos municípios aonde não há casos notificados da doença em humanos.

Oliveira Freitas et al. de 2010⁸³, coletaram amostras de sangue de 75 cavalos de carroceiros em São José dos Pinhais, encontraram 9,33% de positividade nos animais, com títulos entre 64 e 1024 no teste de Imunofluorescência indireta para *Rickettsia* spp. No presente estudo, foi encontrado uma positividade de 6,25%, mostrando que estudos sorológicos com animais criados de maneira intensiva apresenta positividade para *Rickettsia* menores, pois, neste modo de criação, existe um maior controle parasitários nos animais em relação aos vetores da doença, onde as infestações por carrapatos nestes animais são menores comparando-se com animais que vivem de maneira extensivas.

O presente estudo, obteve-se resultados semelhantes à de outros pesquisadores que realizaram estudos sorológicos para a presença de anticorpos anti - *Rickettsia* spp, onde constatou-se que é comum o equino ter reação cruzada com mais de um tipo de *Rickettsia* spp. e, além do fato de que foram encontrados animais que reagiram ao teste sorológico, quanto a presença de anticorpos anti - *Rickettsia* spp. mesmo sem ser encontrado o vetor etiológico da doença.


7.CONCLUSÃO

Com esse trabalho não podemos concluir que a região do Vale do Paraíba possui circulação de carrapato infectados com o agente etiológico da FMB, mas há animais sorologicamente positivos para bactérias do gênero *Rickettsia* spp. Embora nenhum carrapato e nenhuma amostra de sangue tenham sido positivos para *R. rickettsii* a realização de outros estudos epidemiológicos na região serão muito importantes, para entendermos melhor a situação da região e se é necessária a realização de medidas preventivas contra a doença.


8.ÉTICA

Conforme requerido a todos os trabalhos e pesquisas que envolvem seres vivos, é necessária a aprovação prévia pelo comitê de ética da Universidade de Santo Amaro.

Figura 3: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



UNISA
Universidade
de Santo Amaro



CEUA
UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO
Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais

PARECER N.31 / 2016

Projeto de Pesquisa: "PESQUISA SOROLOGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-RICKETTSIA sp. EM EQUINOS SADIOS DE CRIAÇÃO INTENSIVA LOCALIZADA NO VALE DO PARAIBA, SP".

Pesquisadores Responsáveis: Prof. Jonas Moares Filho
Claudia Iorio Budweg

Curso: Medicina Veterinária

Prezado Pesquisador:


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**), seguindo as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo animais, conforme a Lei federal nº 11.794 (Lei Arouca), as resoluções do CONCEA, que estabelecem 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, deliberando pela **Aprovação** do Projeto **"PESQUISA SOROLOGICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI- RICKETTSIA sp. EM EQUINOS SADIOS DE CRIAÇÃO INTENSIVA LOCALIZADA NO VALE DO PARAIBA".**

Pendências:

- * Prezados Pesquisadores o 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, 14 de dezembro de 2016



PROFA. DRA. VALERIA CASTILHO ONOFRIO
Coordenador do Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA
UNISA - Universidade de Santo Amaro

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lima, R.A.; Shirota, R.; Barros, G.S.C. Estudo do complexo do agronegócio cavalo. 2006 Piracicaba: Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada – CEPEA/ESALQ/USP. 250p.
2. Almeida, F.Q.; Silva, V.P. Progresso científico em equideocultura na década do século XXI. Rev. Bras. Zootec., 2010 v.39, p. 119-129.
3. Hoogstrall, H. Argasid and nnutalliellid ticks as parasites and vectors. Advances in Parasitology, 1985,v.24, n.1, p. 135-238,.
4. Oliver, J. H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodidae). Annual Review of Ecology and Systematics, 1989.
5. Hoogtrall, H. Ticks in relation to human diseases caused by rickettsia species. Annual Review of Entomology, 1967 v. 12, p. 377-420 .
6. Mcdade, J. E.; Newhouse, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. Annual Reviews Microbiology, 1986 v. 40, p. 287-309.
7. Aragão, H.; Fonseca, F. Notas de Ixodologia. VIII Lista e Chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 1961 v. 59: p. 115-129..
8. Guimarães, J. H.; Tucci, E. C.; Barros-Battesti, D. M. Ectoparasitas de importância veterinária. São Paulo. Plêiade/Fapesp, 2001, 218p.
9. Ricketts H. T. Some aspects of Rocky Mountain Spotted, Fever as shown by recent investigations. Medical Record, ,1909 n. 76: p. 843-855.
10. Sonenshine, D. E. Biology of ticks. New York: Oxford University Press, 1993, v. 2, p. 465.
11. Gimenez, D.F. Staining Rickettsiae in yolk-sack cultures. Stain Technol , 1964 39:135–40 .
12. Parola, P; Matsumoto, K; Socolovschi, C; Parzy, D; Raoult, D. A tick-borne Rickettsia of the spotted fever group, similar to *Rickettsia amblyommii*, in French Guyana. Annals of tropical Medicine and Parasitology, 2007 , v.101:, n. 2, p. 185-188.
13. Raoult, D; Roux, D. Rickettsioses as paradigmas of new or emerging infectious disease. Microbiology Clinical Microbiology Reviews, 1997 ; v. 10: p. 694-719.
14. Weinert, L.A.; Werren, J.H.; Aebi, A.; Stone, G.N.; Jiggins, F.M. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. BMC Biology, 2009 v.7: n. 6, p. 1-15

15. Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics Biol Rev Camb Philos Soc. 2011
16. Piza, J. T. O carrapato como transmissor do Typho exanthemático de São Paulo? Boletim da Sociedade e cirúrgica de São Paulo, 1932 ; v. 15: n. 12, p. 350.
17. Lemos-Monteiro, J.; Fonseca, F.; Prado, A. Typho Exantemático de São Paulo. Novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos. Brasil-Médico, 1932, v. 16: n. 48, p. 993-995,
18. Gomes, L. S. Typho exanthematico de São Paulo. Brasil-Médico, 1933, v. 17: n.52, p. 919-921.
19. Pinter, A.; Labruna, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. Ann. New York Acad. Sci. 2006 ; v. 1078: p. 523-529.
20. Krawwczak, F.S.; Nieri-Bastos, F.F.; Nunes, F.P.; Soares, J.F; Moraes-Filho, J.; Labruna M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. Parasites and Vectors. v. 7, n. 7, p.1-7, 2014.
21. Aragão, H.B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1936; v.31: p.759-843..
22. Vieira, A.M.L. et al. Manual de Vigilância Acarológica, Estado de São Paulo, Secretaria de Estado de Saúde, São Paulo, Brasil, SUCEN, 2004 p.62.
23. Guclielmone AA, Beati L, Barros – Battesti D M, Labruna MB, Nava S, Venzal JM, Mangold AJ et al . Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Exp Appl Acarol. 2006;40(2):83-100.
24. Dias, E.; Martins, A.V. Spotted fever in Brazil. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 1939 ; v. 19: p. 103-108.
25. Bustamante, M. E.; Varella, G. Distribucion de las rickettsias en Mexico. Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales, 1947 v.8, p. 13-14.
26. Magalhães, O. Contribuição para o conhecimento das doenças do grupo “tifo exantemático” no Brasil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1957 v. 2,: n. 55, p. 191-208.
27. Rodaniche, E.C. Natural Infection of the tick, *Amblyomma cajennense*, with *Rickettsia rickettsii* in Panama. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Jul.1953: v.2, p.696-699

28. 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*, Jan.1978 ; V.33: p.94-106,.
29. Dumler, J. S.; Walker, D. H. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting and virulence. *The New England Journal of Medicine*, 2005 v. 353: n. 6, p. 551-553.
30. Paddock, C.D.; Fernandez, S.; Echenique, G.A.; Sumner, J.W.; Reeves, W.K.; Zaki, S.R.; Remondégui, C.E. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2008 v.78: n. 4, p. 687-692.
31. Fournier, P.E.; Raoult, D. Bacteriology, Taxonomy and Phylogeny of Rickettsia. In: Raoult, D.; Parola, P. *Rickettsial diseases*. New York: Healthcare. 2009 p. 379.
32. Barros-Battesti, D.M; Arzua, M. e Bechara, G.H. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. 1ªed.Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, ,2006 223p.
33. Dantas-Torres, F.; Onofrio, V. C.; Barros-Battesti, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Systematic and Applied Acarology*, 2009 ;v. 14: p. 30-49.
34. Nava, S.; Mastropaolo, M.; Venzal, J.M.; Mangold, A.J.; Guglielmone, A.A. Mitochondrial DNA analysis of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato (Acari: Ixodidae) in the Southern Cone of South America. *Veterinary Parasitology*, 2012; v. 190: n. 3-4, p. 547-555.
35. Martins, T.F.; Venzal, J.M.; Terassini, F.A.; Costa, F.B.; Marcili, A.; Camargo, L.M.A.; Barros-Battesti, D.M.; Labruna, M.B. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 2014; v. 62: n. 1, p. 121-128.
36. Labruna, M. B.; Pinter, A.; Teixeira, R. H. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. *Exp. Appl. Acarol*, 2004 v. 32: n. 1-2, p. 79-88
37. Labruna, M.B.; Pacheco, R.C.; Nava, S.; Brandão, P.E.; Richtzenhain, L.J.; Guglielmone, A.A. Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neymanni* ticks from Argentina. *Microbial Ecology*, 2007 v. 54: n. 1, p. 126-133.

38. Silveira, I.; Pacheco, R.C.; Szabó, M.P.J.; Ramos, H.G.C.; Labruna, M.B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 2007.v. 13: n. 7, p. 1111-1113.
39. Ogrzewalska, M.; Pacheco, R.C.; Uezu, A.; Richtzenhain, L.J.; Ferreira, F.; Labruna, M.B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting birds in na Atlantic rain forest region of Brazil. *Journal of Medical Entomology*, 2009; v. 46: n. 5, p. 1225-1229.
40. Spolidorio, M.G. et al. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brasil. *Emerg.Infect.Dis.* Mar.2010, V.16(3), p.521-523.
41. Ogrzewalska, M.; Uezu, A.; Labruna, M. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. *Parasitology Research*, 2010 ; v. 106: n. 4, p. 809-816.
42. Silva, N. et al. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerg. Infect Dis.* Feb.2011 ; V.17(2): , p.275-278.
43. Pacheco, R.C. Rickettsial infection of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Medical and Veterinary Entomology*. 2011 ;V.25: p.148-155,
44. Medeiros, A.P. et al. Spotted Fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acaris:Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. Dec. 2011 ; V.106(8): p.926-930.
45. Barbieri, A.R.; Romero, L.; Labruna, M.B. *Rickettsia bellii* infecting *Amblyomma sabanerae* ticks in El Salvador. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 2012 ; v. 106: n. 3, p. 188-189.
46. Ogrzewalska, M.; Martins, T.; Capek, M.; Literak, I.; Labruna, M.B. A *Rickettsia parkeri*-like agente infecting *Amblyomma calcaratum* nymphs from wild birds in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks and Tick Borne Diseases*, 2013 v. 4, n. 2-4, 145-147.
47. Saraiva, D.G.; Nieri-Bastos, F.A.; Horta, M.C.; Soares, H.S.; Nicola, P.A.; Pereira, L.C.M.; Labruna, M.B. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma auricularium* ticks in Pernambuco, Northeastern Brazil: isolation, transovarial transmission and transstadial perpetuation. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 2013; v. 13, n. 9, p. 615-618.
48. Labruna, M. B., C. E. Kerber, F. Ferreira, J.L.H. Faccini, D. T. De Waal, and S. M. Gennari.. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. 2001 *Vet. Parasitol.* 97: 1Ð14

49. Medeiros A.P. ;Moura, A, B; Souza,A ,P; Bellato,V; Sartor A, A; Vieira- Neto,A; et al. Antibodies against rickettsiae from spotted fever groups in horses from two mesoregions in the state of Santa Catarina, Brazil *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2013 ; v.65: n.6, p.1713-1719.
50. Walker, J. B., and A. Olwage.. The tick vectors of *Cowdria ruminantium* (Ixodoidea:Ixodidae, genus *Amblyomma*) and their distribution. 1987 Onderstepoort J. Vet. Res. 54: 353Ð379.
51. Cançado, P. H. D.; Piranda, E. M.; Faccini, J. L. H. & Mourão, G. M. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO(2) tick trap. *Parasitology* 2008.
52. Luz, H, R; Faccini, J, L ,H ; Landulfo, G, A; Neto, S, F, C; Famadas, K, M. New records for *Amblyomma sculptum* (Ixodidae) on non-passerine birds in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.*, Jaboticabal, jan.-mar 2016 ; v. 25: n. 1, p. 124-126.
53. Martins, T, F. Arrais, R, C. Rocha, F, L. Santos J ,P. Júnior,J,A, M. Azevedo, F, C. et al. Carrapatos (Acari: *Ixodidae*) em mamíferos silvestres do Parque Nacional da Serra da Canastra e arredores, Minas Gerais, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, fev, 2015; v.45: n.2, p.288-291.
54. Cançado, P, H, D. Faccini, J, L. Mourão, G, M . Piranda, E, M. Onofrio, V, C. Barros-Battesti D, M. Current status of ticks – host relationship in domestic and Wild animals from pantanal Wetland in the state of Mato Grosso do Sul Brazil. *Iheringia Série Zoologia* 107, 2017.
55. Labruna, M. B., N. Kasai, F. Ferreira, J.L.H. Faccini, and S. M. Gennari. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo Brazil. 2002. *Vet. Parasitol.* 105: 65Ð77
56. Oliveira, P. R., L.M.F. Borges, C.M.L. Lopes, and R. C. Leite. Population dynamics of the free living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Vet. Parasitol.* 2000. 92: 295Ð301.
57. Strey, O.F., Teel, P.D., Longnecker, M.T., Needham, G.R., Survival and water-balance characteristics of unfed adult *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). 1996 *J. Med. Entomol.* 33, 63–73.
58. Gladney, W.J., Drummond, R.O. Mating behavior and reproduction of the lone star tick, *Amblyomma americanum*. 1970 *J. Econ. Entomol.*63, 1036–1039.

59. Flechtmann, C.A.W. *Ácaros de importância médico-veterinária*. 3.ed. São Paulo: Nobel, 1990. 192 p
60. Labruna, M.B. et al. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, 2005; v.36: n.1-2, p.149-163.
61. 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). M.S. thesis, University of São Paulo, São Paulo, Brazil 2003
62. Guglielmone, A. A; Estrada-Penã, A. J. Mangold, D. M. Barros-Batesti, M. B. Labruna, J. R. Martins, J. M. et al. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Kock, 1844: hosts, distribution and 16S rDNA sequences. 2003 *Vet. Parasitol.* 113: 273-288
63. Rodrigues, D. S., H. A. Carvalho, A. A. Fernandes, C.M.V. Freitas, R. C. Leite, and P. R. Oliveira. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) on some laboratory hosts in Brazil, *Mem. 2002 Inst. Oswaldo Cruz.* 97: 853-856.
64. Labruna, M. B, Homem, M. B. Heinemann, J. S. Ferreira Neto. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with rural dogs in Uruara, Eastern Amazon-Brazil. 2000b *J. Med. Entomol.* 37: 774-776.
65. Sabatini GS, Pinter A, Nieri-Bastos FA, Marcili A, Labruna MB Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, 2010 Brazil. *J Med Entomol* 47:913-916
66. Jorge, R.S.P.; Rocha, F.L.; Junior, J.A.M.; Morato, R.G. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e Saúde Pública. *O ecologia Australis*, 2010. ; v. 14: n. 3, p. 686-710.
67. Cardoso, L.D. Caracterização de *Rickettsia* spp. Circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, mar, 2006 ;22(3):495-501,
68. Burgdorfer, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain Spotted fever and scrub typhus. In: Walker, D. H. *Biology of rickettsial diseases*. Boca Raton, F. L.: CRC, 1988, p. 33-50.
69. Moreira, J. A.; Magalhães, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. *Brasil-Médico*, 1937; v. 51, n. 21, p. 20-21.

70. Travassos, J.; Vallejo, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais inoculado com o vírus da febre maculosa. Memórias do Instituto Butantan 1942^a, v. 15: p. 73-86.
71. Horta, Maurício C ; Moraes-filho, Jonas ; Casagrande, Renata A. ; Saito, Tais B. ; Rosa, Simone C. ; Ogrzewalska, Maria 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, 2009 ; v. 9, p. 109-118.
72. Souza, C. ; Moraes-filho, J. ; Ogrzewalska, Maria ; Uchoa, Francisco C. ; Horta, Mauricio C. ; Souza, Savina S.L. ; 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, 2009; v. 161, p. 116-121.
73. Niebylski, M.L.; Peacock, M.G. e Schwan, T.G. Lethal Effect of *Rickettsia rickettsii* on its Tic Vector (*Dermatocentor andersoni*). Appl.Environ.Microbiol., Feb.1999; v.65, p.773-778.
74. Cooksey L,M; Haile D,G ; Mount G,A; Computer simulation of Rocky Mountain spotted fever transmission by the American dog tick (Acari: Ixodidae) J Med Entomol. 1990 Jul;27(4):671-80.
75. Randolph, S. E. Ticks are not insects: consequences of contrasting vector biology for transmission potential. Parasitology Today, 1998; v. 14, n. 5, p. 186-92.
76. Ueno, T. E. H. Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense*. Tese de doutorado. 2014. 84p.
77. Regnery R,L; Spruill C,L; Plikaytis B,D. Genotypic identification of rickettsia and estimation of intraspecies sequence divergence for portion of two rickettsial genes. J Bacteriol. 1991 Mar;173(5):1576-89
78. Guedes E, Leite R,C; Prata M, C; Pacheco R,C , Walker D, H; Labruna M, B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais Mem Inst Oswaldo Cruz. 2005
79. Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MC, Gennari SM, Galvão MA, 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 rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(1):93–7.
80. Batista, F, G; Silval, D, M; Green , K,T ; Tezza, L, B,L; Vasconcelos, S, P; Carvalho, S, G, S; et al. Serological survey of *Rickettsia* sp. in horses and dogs in an non-endemic area in Brazil , *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal*, out.-dez. 2010; v. 19, n. 4, p. 205-209.
81. Toledo R,S; Tamekuni, K; Silva Filho M,F; Haydu V,B; Barbieri A,R,M; Hiltel A,C; Pacheco ,R,C et al. Infection by Spotted Fever *Rickettsiae* in People, Dogs, Horses and Ticks in Londrina, Parana State, Brazil, *Zoonoses and Public Health*, April 02, 2009
82. Souza CE, Camargo LB, Pinter A, Donalisio MR (2016) High Seroprevalence for *Rickettsia rickettsii* in Equines Suggests Risk of Human Infection in Silent Areas for the Brazilian Spotted Fever. *PLoS ONE* April 11, 2016
DOI:10.1371/journal.pone.0153303
83. Oliveira Freitas, M C,D; Grycajuk, M; Molento, M ,B ; Bonacin, J; Labruna,M, B; Pacheco R, C; et al. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil, *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal* abr.-jun. 2010, v. 19, n. 2, p. 130-131.
84. Universidade de Santo Amaro, Comitê de Ética em Pesquisas no Uso de Animais (CEUA)

9. ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Pesquisadores responsáveis: Jonas Moraes Filho e Claudia Iorio Budweg

Telefone de contato: (11) 29851040

Sua colaboração é importante e necessária para o desenvolvimento da pesquisa.

- A pesquisa analisa a ocorrência de doenças infecciosas em equinos de criações intensivas do Vale do Paraíba e será realizada através da colheita de sangue do animal;

- Você poderá solicitar informações ou esclarecimentos sobre o andamento da pesquisa em qualquer momento com o pesquisador responsável, sendo o resultado do exame informado por e-mail ou telefone;

- Sendo um participante voluntário, você não terá nenhum pagamento e/ou despesa referente à sua participação no estudo.

Eu, _____ como voluntária da pesquisa, afirmo que fui devidamente informada respeito dos procedimentos a serem realizados para colheita de material biológico (sangue) com o animal acima identificado, o qual sou responsável e proprietário de seu domicílio, e reconheço ainda a importância deste trabalho para o controle das doenças transmissíveis desta região, bem como para a saúde do animal sob meus cuidados. Meu nome não será divulgado de forma nenhuma e terei a opção de retirar meu consentimento a qualquer momento.

São Paulo, ____ de _____ de 201__

(Assinatura do representante legal (proprietário) do sujeito de pesquisa)

Assinatura do pesquisador