Iara Silveira

Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, equinos, gambás (*Didelphis* spp) e carrapatos do gênero *Amblyomma* spp no município de Paulicéia, Estado de São Paulo

São Paulo

2011

Iara Silveira

Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, equinos, gambás (*Didelphis* spp) e carrapatos do gênero *Amblyomma* spp no município de Paulicéia, Estado de São Paulo

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2011

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

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
6/5/11

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2440
FMVZ

Silveira, Iara

Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, equinos, gambás (*Didelphis* spp) e carrapatos do gênero *Amblyomma* spp no município de Paulicéia, Estado de São Paulo / Iara Silveira. -- 2011.
98 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. Carrapatos. 2. Febre Maculosa. 3. *Rickettsia parkeri*. 4. *Rickettsia amblyommii*. 5. RIFI. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, eqüinos e gambás (*Didelphis spp.*) e carrapatos do gênero *Amblyomma spp.* no Município de Paulicéia, Estado de São Paulo", protocolado sob o nº1371/2008, utilizando 50 (cinquenta) cães, 200 (duzentos) eqüinos e 10 (dez) gambás, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado na reunião do dia 23 de abril de 2008.

We certify that the Research "Rickettsia parkeri infection in humans, dogs, horses and opossums (*Didelphis spp.*) and *Amblyomma spp.* ticks in Paulicéia Municipality, State of São Paulo", utilizing 50 (fifty) dogs, 200 (two hundred) horses and 10 (ten) opossums, protocol number 1371/2008, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/23/08.

São Paulo, 23 de abril de 2008

Prof. Dr. José Luiz Bernardino Marusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone: (55) (11) 3091-7733 telefax: (55) (11) 3091-7438
e-mail: cnp@icb.usp.br

São Paulo, 18 de junho de 2008.

PARECER 840/CEP

Prezada Senhora,

Atendendo sua solicitação, a Comissão de Ética em Pesquisas com Seres Humanos do ICB, em sua 85ª reunião realizada em 17.06.08, analisou o projeto de sua responsabilidade intitulado: "Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, eqüinos, gambás (*Didelphis spp.*) e carrapatos do gênero *Amblyomma spp.* No município de Paulicéia, Estado de São Paulo".

Informo a V.Sa. que, após análise e discussão, o referido projeto foi **aprovado por esta Comissão.**

Lembramos que cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX.2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **17 de junho de 2009.**

Atenciosamente,

Prof. Dr. LUIZ VICENTE RIZZO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Ilma. Sra.

IARA SILVEIRA

Depto. de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP

Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Ciências Biomédicas / USP

Aprovada pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, em 10 de fevereiro de 1998.

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14614-1	Data da Emissão: 15/02/2008 12:07	Data de Validade: 14/02/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2425129	Nome: Iara	CPF: 086.986.118-26
Título do Projeto: Pesquisa da infecção pela bactéria <i>Rickettsia parkeri</i> em muriquis, eqüinos, gambás (<i>Didelphis</i> spp.) e carrapatos do gênero <i>Amblyomma</i> spp. no município de Paulicéia, Estado de São Paulo		
Nome da Instituição: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP		CNPJ: 63.025.530/0019-33

Observações, ressalvas e condicionantes

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	Esta autorização não exime o titular e a sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade.
3	Esta autorização não poderá ser utilizada para fins comerciais, industriais, esportivos ou para realização de atividades inerentes ao processo de licenciamento ambiental de empreendimentos. O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br/cites . Em caso de material consignado, consulte www.ibama.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.
7	Em caso de pesquisa em Unidade de Conservação Federal, o pesquisador titular deverá contactar a administração dessa unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.
8	As atividades contempladas nesta autorização NÃO abrangem espécies brasileiras constante de listas oficiais (de abrangência nacional, estadual ou municipal) de espécies ameaçadas de extinção, sobreexplotadas ou ameaçadas de sobreexploração.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Marcelo Bahia Labruna	Orientador do projeto de pesquisa	934.277.436-91	M5513065 SSP-MG	Brasileira

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1	PAULICEIA	SP	Propriedades rurais	Fora de UC

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Captura de animais silvestres in situ	Argasidae, Prostigmata, Ixodidae, Laelaptidae, Didelphis
2	Coleta/transporte de amostras biológicas in situ	Ixodidae, Laelaptidae, Argasidae, Didelphis, Prostigmata
3	Coleta/transporte de espécimes da fauna silvestre in situ	Argasidae (*Qtde: 9999999), Ixodidae (*Qtde: 9999999), Didelphis (*Qtde: 100), Laelaptidae (*Qtde: 9999999), Prostigmata (*Qtde: 9999999)

* Qtde. de indivíduos por espécie/localidade/unidade de conservação, a serem coletados durante um ano.

Material e métodos

1	Método de captura/coleta (Invertebrados Terrestres)	Outros métodos de captura/coleta (armadilha gelo seco e flanela), Captura manual
---	---	--

Destino do material biológico coletado

#	Nome local destino	Tipo Destino
1	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	pesquisa
2	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP	coleção

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica), foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154/2007. . Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet (www.ibama.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 54698561

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 14614-1	Data da Emissão: 15/02/2008 12:07	Data de Validade: 14/02/2009
Dados do titular		
Registro no Ibama: 2425129	Nome: Iara ...	CPF: 086.986.118-26
Título do Projeto: Pesquisa da infecção pela bactéria Rickettsia parkeri em muriquis, equinos, gambás (Didelphis spp.) e carrapatos do gênero Amblyomma spp. no município de Paulicéia, Estado de São Paulo		
Nome da Instituição : Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia USP		CNPJ: 63.025.530/0019-33

Anexo para registrar Coletas Imprevistas de Material Biológico

De acordo com a Instrução Normativa Ibama nº154/2007. , a coleta imprevista de material biológico ou de substrato não contemplado na autorização ou na licença permanente deverá ser anotada na mesma, em campo específico, por ocasião da coleta, devendo esta ser comunicada ao Ibama por meio do relatório de atividades. O transporte do material biológico ou do substrato deverá ser acompanhado da autorização ou da licença permanente com a devida anotação. O material biológico coletado de forma imprevista, deverá ser destinado à instituição científica, preferencialmente depositado em coleção biológica científica registrada no Cadastro Nacional de Coleções Biológicas (CCBIO).

Nível	Táxon*	Qtde.	Amostra	Qtde.	Data

* Identificar o espécime no nível taxonômico mais específico possível.

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SILVEIRA, Iara

Título: Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, equinos, gambás (*Didelphis* spp) e carrapatos do gênero *Amblyomma* spp no município de Paulicéia, Estado de São Paulo

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____ Instituição _____

Assinatura _____ Julgamento _____

AGRADECIMENTOS

Ao Pastor Welligton, que abençoou este projeto desde o seu início.

À minha família, por sempre acreditar nos meus projetos.

Ao Anand pelo seu amor, companheirismo e principalmente paciência.

A prefeitura do município de Paulicéia pela colaboração e por cederem a Agente de Saúde Dila.

Ao laboratório de Análises Clínicas Nova Era de Paulicéia pela centrifugação das amostras.

Aos moradores de Paulicéia pela hospitalidade, principalmente ao Seu Duca e família.

Aos companheiros de campo em Paulicéia e viva o Rio Paraná!

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna pela suas “labrunadas” e elogios.

À Profa. Solange Maria Gennari pela sua generosidade

Aos “parças” do Laboratório de Doenças Parasitárias pelo companheirismo e diversão, já estou com saudades!.

Ao funcionários Pedrinho e Renatinho, por manterem o laboratório funcionando!

À técnica Hilda, pela carta de recomendação para a seleção do doutorado.

Ào Prof. Fernando Ferreira, pela inestimável ajuda com os mapas e estatística.

Aos professores e funcionários do VPS, pela hospitalidade e alegria!

À todos os colegas antigos e recentes do curso de Pós-Graduação do VPS.

Aos amigos que escutaram derem opiniões valiosas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro para a execução deste projeto, através do processo de número 07/.59706-9

MUITO OBRIGADA!!!!

RESUMO

SILVEIRA, I. **Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, equinos, gambás (*Didelphis* spp) e carrapatos do gênero *Amblyomma* spp no município de Paulicéia, Estado de São Paulo.** [*Rickettsia parkeri* infection research in humans, dogs, horses, opossums (*Didelphis* spp) and *Amblyomma* gender ticks in Paulicéia municipal, São Paulo State]. 2011. 98f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Em trabalho recente, foi encontrada a infecção de 9,7% da população de *Amblyomma triste* por *Rickettsia parkeri*, agente etiológico de rickettsiose humana, na várzea do Rio Paraná, no município de Paulicéia. Desta forma o presente trabalho busco a soroprevalência de anticorpos anti-*R. parkeri* em humanos, cavalos, cães e gambás; e a prevalência de infecção por *R. parkeri* em ectoparasitas e diferentes áreas do local. Os carrapatos adultos e ninfas coletados foram identificados com chaves específicas e as larvas por técnicas moleculares (PCR para gene 16S rRNA mitocondrial, seguido de sequenciamento). Também foi feito o teste de presença de DNA de *Rickettsia*. Amostras de soro sanguíneo de cães, cavalos e humanos foram analisadas pela técnica de reação de imunofluorescência indireta, para a pesquisa de anticorpos anti-*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephalii* e *R. felis*. De 1699 carrapatos coletados, a maioria (1511) foi *Amblyomma cajennense*. Os demais pertenciam às espécies *A. coelebs* (6), *A. triste* (2), *A. dubitatum* (114), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (55), *Dermacentor nitens* (10) e *Amblyomma rotundatum* (1). Somente 2 ninfas da espécie *A. coelebs* estavam infectadas com *Rickettsia*, com sequências 99% de identidade para o gene *ompA* *R. amblyommii*. Dos soros de humanos coletados 25 foram negativos e somente um apresentou títulos ≤ 64 para *R. parkeri* e *R. rickettsii*. De 140 soros dos equinos, 24% apresentou anticorpos anti-*Rickettsia*, com títulos variando de 64 a 1024, sendo que nove amostras tinham títulos anti-*R. parkeri* pelo menos quatro vezes maior que os para demais espécies de *Rickettsia*, indicando a *R. parkeri* como provável antígeno homólogo. Em 55 amostras de cães 7,7% apresentaram anticorpos anti-*Rickettsia*, com títulos variando de 64 a 256. Para duas amostras a *R. parkeri* foi o provável antígeno homólogo. Analisando os questionários epidemiológicos dos eqüinos, juntamente com os resultados sorológicos, a regressão logística indicou associação estatisticamente significativa entre a presença de anticorpos anti-

Rickettsia com as variáveis independentes (i) acesso à várzea (ii) e tempo de residência na região, os quais podem ser considerados fatores de risco para rickettsiose na região estudada. Foram capturados quatro gambás (*Didelphis albiventris*) e todos tinham anticorpos para *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephalii*, porém sem variação de pelo menos quatro vezes entre os títulos. Os gambás estavam infestados com ninfas *A. cajennense* e *A. coelebs*, todas negativas para o PCR para *Rickettsia*. Em vista destes resultados pode-se dizer que os animais domésticos e os gambás estiveram em contato com bactérias do gênero *Rickettsia* na região estudada, onde a várzea parece ser a principal foco de carrapatos infectados.

Palavras-chave: Carrapatos. Febre Maculosa. *Rickettsia parkeri*. *Rickettsia amblyommii*. RIFI.

ABSTRACT

SILVEIRA, I. **Research of the *Rickettsia parkeri* infection in humans, dogs, horses, opossums (*Didelphis* spp) and *Amblyomma* ticks in Paulicéia municipaly, São Paulo State** . [Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, equinos, gambás (*Didelphis* spp) e carrapatos do gênero *Amblyomma* spp no município de Paulicéia, Estado de São Paulo]. 2011. 98f. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

In recent work, 9.7% of the *Amblyomma triste* of the marsh by the Paraná River in Paulicéia, State of São Paulo, was found infected with *Rickettsia parkeri*, the etiological agent of spotted fever rickettsiosis in humans. Based on this report, the present study aimed to determine soroprevalence of anti-*R. parkeri* antibodies in humans, horses, dogs and opossums, and the prevalence of rickettsial infection in ectoparasites, in different areas of Paulicéia. While ticks were identified by using current morphological Keys for adults and nymphs, larva were identified to species by molecular methods (PCR targeting the mitochondrial 16S rRNA gene followed by DNA sequencing). Ticks were tested by PCR for the presence of *Rickettsia* DNA. Animal and human sera samples were tested by immunofluorescence assay (IFA) for the presence of antibodies reactive to *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. belli*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephalii* and *R. felis*. From 1699 collected ticks, a vast majority (1511) was *Amblyomma cajennense*. The remaining were the species *A. coelebs* (6), *A. triste* (2), *A. dubitatum* (114), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (55), *Dermacentor nitens* (10) and *Amblyomma rotundatum* (1). Only two nymphs of *A. coelebs* were found infected by *Rickettsia*, yielding DNA sequences 99% identical to the gene *ompA* of *R. amblyommii*. 25 of human sera collected were negative, except for one for one that showed endpoint titer ≤ 64 to both *R. parkeri* and *R. rickettsii*. Among horses, 24% sera contained anti *Rickettsia* antibodies, with titles ranging from 64 to 1024, nine samples showed anti-*R. parkeri* titles at least four times higher than the remaining *Rickettsia* species, indicating that these animals had been infected by *R. parkeri*. For 55 dogs, 7.7% anti *Rickettsia* antibodies, with endpoint titles ranging from 64 to 256. For two canine serum *R. parkeri* was considered the possible agent responsible for the infection. Through statistical analyses of the serological results with independent variables, the presence of seropositive horses was significantly associated with (i) grazing in the marsh (ii) and being for more than 8.5 years in the region;

these two independent variables were considered to be risk factors for rickettsiosis in the study region. A total of four opossums (*Didelphis albiventris*) were captured. All four had antibodies reactive to *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. amblyommii* and *R. rhipicephalii*, however, with less than 4-fold differences between endpoint titers to different *Rickettsia* species. Opossums were found infested by nymphs of *A. cajennense* and *A. coelebs*, all negative to rickettsia by PCR. Based in these results, it is concluded that domestic animals and opossums had been in contact with *Rickettsia* of the spotted fever group in the study region, where the marsh area seems to be the main focus of *Rickettsia*-infected ticks

Key-words: ticks. Spotted fever. *Rickettsia parkeri*. *Rickettsia amblyommii*. IFA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Margem do Rio Paraná, Paulicéia, 2009	27
Figura 2 –	Locais de coleta de amostras, pontos zero a nove, propriedades rurais com distância mínima de 2 Km e máxima de 19 Km do ponto zero - município de Paulicéia - Estado de São Paulo, 2008 e 2009.....	42
Figura 3 –	Método de arraste de flanela para a captura dos carrapatos em vida livre.....	43
Figura 4 –	Reação de imunofluorescência indireta positiva para <i>R. rickettsii</i> , soro de equino, 2008	49
Figura 5 –	Armadilha para captura de gambás – município de Paulicéia – Estado de São Paulo, 2009	51
Figura 6 –	Sorologia positiva em equinos para antígenos anti- <i>Rickettsia</i> - município de Paulicéia - Estado de São Paulo, 2008 e 2009.	56
Figura 7 –	Sorologia positiva em cães para antígenos anti- <i>Rickettsia</i> - município de Paulicéia - Estado de São Paulo, 2008 e 2009	57
Figura 8 –	<i>R. parkeri</i> como provável antígeno envolvido na reação homóloga (PAH), em soros de equinos e cães, município de Paulicéia - Estado de São Paulo – 2008	59
Figura 9 –	Animais coletados acidentalmente nas armadilhas. A Saña-castanha (<i>Laterallus viridis</i>); B. Teiú (<i>Tupinambis</i> spp)	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Primers (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados para amplificação de diferentes fragmentos de genes para bactérias do gênero <i>Rickettsia</i>	46
Quadro 2 – Concentração dos reagentes empregados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), de acordo com o gene alvo buscado	46
Quadro 3 – Protocolos do termociclador de acordo com o gene alvo utilizado na reação de PCR	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Casos confirmados de Febre Maculosa, por Unidade da Federação de notificação e ano dos primeiros sintomas, 2006 a 2010, Sinan-Net.....	29
Tabela 2 –	Casos confirmados de Febre Maculosa por critério de confirmação, segundo ano dos primeiros sintomas, 2006 a 2010 ...	30
Tabela 3 –	Casos confirmados de Febre Maculosa por evolução, segundo UF de notificação, 2006 a 2010	33
Tabela 4 –	Categorias dicotômicas para cada variável independente usada na análise estatística da presença ou ausência de anticorpos anti- <i>R. parkeri</i> no soro de equinos, município de Paulicéia - São Paulo - fevereiro de 2008 e março de 2009	50
Tabela 5 –	Carrapatos adultos coletados em vida livre separados por local de coleta, espécie e gênero, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - fevereiro de 2008, janeiro e setembro de 2009.	53
Tabela 6 –	Ninfas de carrapatos coletadas em vida livre, separadas por local de coleta e espécie, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009.....	54
Tabela 7 –	Larvas de carrapatos coletadas em vida livre, separadas por local de coleta e espécie, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009.....	54
Tabela 8 –	Títulos das amostras positivas para RIFI de seis espécies de <i>Rickettsia</i> , em cães, equinos e humanos, originários do município de Paulicéia - Estado de São Paulo - fevereiro a março de 2008 e fevereiro de 2009	58
Tabela 9 –	Distâncias em quilômetros dos locais de coleta ao local de referência (ponto zero) e porcentagem de soros com anticorpos anti- <i>R. rickettsii</i> e anti- <i>R. parkeri</i> , para cães, equinos e humanos, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - fevereiro a março de 2008 e março de 2009	60
Tabela 10 –	Análise da associação univariada das variáveis independentes quando comparadas com a variável dependente: presença de anticorpos anti- <i>R. parkeri</i> no soro de equinos – município de Paulicéia – estado de São Paulo - 2010	61
Tabela 11 –	Análise da associação univariada da variável independente ponto de coleta, com a variável dependente: presença de anticorpos anti- <i>R. parkeri</i> no soro de equinos – município de Paulicéia – estado de São Paulo – 2010.....	61

Tabela 12 – Regressão logística das variáveis independentes com a variável dependente: presença de anticorpos anti- <i>R. parkeri</i> no soro de equinos, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - fevereiro a março de 2008 e março de 2009	62
Tabela 13 – Ectoparasitas coletados em gambás (<i>D. albiventris</i>), originários do município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009	63
Tabela 14 – Títulos das amostras positivas para RIFI de seis espécies de <i>Rickettsia</i> , em gambás (<i>D. albiventris</i>), originários do município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009.....	63
Tabela 15 – Ectoparasitas coletados em lagartos (<i>Tupinambis</i> spp) e pássaros Saia-castanha (<i>Laterallus viridis</i>), município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009	63

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	27
2	OBJETIVOS	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1	Coleta dos carrapatos em vida livre e parasitária na área rural do município de Paulicéia	41
3.2	Teste de hemolinfa dos carrapatos.....	44
3.3	Extração de DNA dos carrapatos e ácaros	44
3.4	Reação em cadeia pela polimerase (PCR) do DNA dos ectoparasitas.....	45
3.5	Análise dos produtos amplificados.....	47
3.6	Sequenciamento do DNA genômico	47
3.7	Análise do DNA genômico	48
3.8	Coleta de sangue em humanos e animais domésticos.....	48
3.9	Deteção e titulação de níveis de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> no soro de humanos e animais domésticos.....	49
3.10	Método de análise estatística para os questionários epidemiológicos.....	50
3.11	Captura de gambás (<i>Didelphis</i> spp).....	51
3.12	Frequência dos carrapatos infectados com <i>Rickettsia</i>	51
4	RESULTADOS	53
4.1	Coleta de carrapatos em vida livre parasitária na área rural do município de Paulicéia	53
4.2	Teste de hemolinfa dos carrapatos.....	55
4.3	Reação em cadeia pela polimerase (PCR) do DNA dos ectoparasitas e sequenciamento do DNA genômico.....	55
4.4	RIFI do soro dos animais domésticos e dos seres humanos.....	55
4.5	Análise univariada dos questionários epidemiológicos dos equinos..	60
4.6	Análise multivariada dos questionários epidemiológicos dos equinos.....	62
4.7	Captura de gambás (<i>Didelphis albiventris</i>)	62
4.8	Outros animais coletados acidentalmente nas armadilhas	63

5	DISCUSSÃO	65
	CONCLUSÕES	69
	REFERÊNCIAS	71
	APÊNDICE A	91
	APÊNDICE B	92
	APÊNDICE C	93
	APÊNDICE D	94
	APÊNDICE E	95
	APÊNDICE F	97

1 INTRODUÇÃO

A hidrelétrica de Porto Primavera está localizada ao sudeste do estado de São Paulo, na divisa com o estado do Mato Grosso do Sul. Seu reservatório de água, provido pelo Rio Paraná (Figura 1), inundou uma área de 2.2000 Km² nas fronteiras destes estados, ao longo de aproximadamente 180 km do Rio Paraná (SZABÓ, 2003). Labruna et al. (2002), descreveram o carrapato *A. cajennense* como o mais prevalente no local, coletado em 5 táxon: Artiodactyla, Carnivora, Edentata, Primates e Rodentia. Recentemente ocorreu uma alteração do panorama econômico na região, em virtude do arrendamento dos pastos para plantio de cana-de-açúcar, visando o suprimento de usinas de produção de álcool etílico, com mudança do uso do solo e expansão agrícola.

Fonte: do autor

Figura 1 –

Margem do Rio Paraná, Paulicéia, 2009

As bactérias do gênero *Rickettsia* são α Proteobactérias da família *Rickettsiaceae*, ordem *Rickettsiales*. Apresentam formato de cocobacilos gram-negativos, são parasitas intracelulares obrigatórias, tanto no hospedeiro vertebrado como no invertebrado, com tamanho de 0,3 a 1,00 μm e cujo genoma tem de 1,1 a 1,6 Mb (XU; RAOULT, 1998; BLAIR, 2004). Esta ordem divide-se em: grupo do tifo, composto pela *R. prowazekii* e *R. typhi*; grupo da febre maculosa, com mais de 30 espécies descritas, agentes de enfermidades conhecidas, dentre elas: *R. rickettsii*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. akari*, *R. africae*, *R. japonica*, *R. parkeri*, *R. massilliae*, e outras riquetsias de patogenicidade desconhecida, até o presente momento; e outras espécies, tais como *R. bellii* e *R. canadensis*, que não pertencem a nenhum dos dois grupos citados acima. Os vetores destes patógenos são artrópodes como ácaros, carrapatos, piolhos e pulgas. (ROUX; FOUNIER; RAOULT, 1996; RAOULT; ROUX, 1997; FOURNIER; ROUX; RAOULT, 1998; SEKEYOVA; ROUX; RAOULT, 2001; EREMEEVA, DASCH, SILVERMAN, 2003; FENG, 2003; WATT; PAROLA, 2003; LABRUNA, 2004a,c, 2009a).

O primeiro relato da febre maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) foi em 1899, no estado de Idaho, noroeste dos Estados Unidos. Os principais vetores neste país são: *Dermacentor variabilis*, *D. andersoni* e *Rhipicephalus sanguineus* (DEMMA, 2005). A FMMR também foi relatada em outros países da América Latina: Argentina, Brasil, Colômbia, Costa Rica, México e Panamá e Peru (SEXTON, 1993; LEMOS, 2001; LIMA, 2003; GALVÃO, 2003; GUEDES, 2005; OLIVEIRA, 2010; HIDALGO, 2011).

No Brasil foi primeiramente descrita por Piza, em 1929, como uma enfermidade chamada de tifo exantemático de São Paulo, cujos sintomas eram semelhantes à FMMR: febre alta, mialgias, prostração, cefaléia e no 2º a 6º dia exantema máculo-papular na face, regiões palmar e plantar, com evolução para óbito. Na década de 1930 foram descritos casos em Minas Gerais, com a renomeação da doença para febre maculosa brasileira (FMB), pois havia semelhança antigênica à FMMR (DIAS; MARTINS; RIBEIRO, 1937; MOREIRA; MAGALHÃES, 1935, 1937; RAOULT; ROUX, 1997). Após a década de 1950 o registro dos casos foi esparso, a partir de 1985 a doença foi novamente relatada nos estados de São Paulo e Minas Gerais, inclusive com casos no estado do Espírito Santo e Rio de Janeiro, onde não havia relato anterior desta mazela (MELLES, 1992; LEMOS, 1996; ROZENTAL, 2002; LIMA, 2003; GALVÃO, 2003). A partir de

2002 a FMB foi considerada de notificação compulsória, pelo Ministério da Saúde, apresentando algumas regiões endêmicas nos estados do sudeste do Brasil. Atualmente existem casos notificados de riquetsiose do GFM nos estados da Região Sul (Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul), porém sem a confirmação da espécie de *Rickettsia* envolvida (SEXTON, 1993; LEMOS, 1997; GALVÃO, 2003; GUEDES, 2005; GALVÃO, 2005; ANGERAMI, 2006; LAMAS, 2008; LABRUNA, 2009a). O principal vetor de *R. rickettsii* no Brasil é o carrapato *Amblyomma cajennense*, porém existem locais endêmicos para FMB cujo vetor é *A. aureolatum* (PINTER, 2006).

No estágio inicial há febre não específica, cefaléia, mialgia, náusea, vômitos, dor abdominal e em 50% dos pacientes há exantema máculo-papular. Ao redor do sexto dia de hipertermia, há maior comprometimento de células endoteliais, ocasionando vasculite, hipoperfusão e mudanças na permeabilidade vascular, com prejuízo de órgãos nobres, como os pulmões e o cérebro. Também há exantema petequial, dificuldade respiratória e desordens neurológicas, sintomas que definem um quadro de risco de morte, usualmente associado à falência múltipla de órgãos e alto índice de fatalidade (ANGERAMI, 2009a,b,c; DEL FIOL, 2010). A maioria dos casos é confirmado por sorologia indireta, associada à critérios clínico-epidemiológicos. O diagnóstico clínico da FMB é difícil por esta apresentar sintomas inespecíficos: febre alta, mialgia e cefaléia, confundindo-se com outras doenças febris e exantemáticas presentes no país como: dengue, febre amarela, febre tifóide, leptospirose, meningocoxemia, sarampo (DUMBLER; WALKER, 2005; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Os laboratórios de referência utilizam exames indiretos específicos para *R. rickettsii* ou para o gênero *Rickettsia* para o diagnóstico da FMB (GALVÃO, 2003).

Tabela 1 – Casos confirmados de Febre Maculosa, por Unidade da Federação de notificação e ano dos primeiros sintomas, 2006 a 2010, Sinan-Net

Ano	AP	TO	CE	PB	BA	MG	ES	RJ	SP	PR	SC	RS	MS	MT	Total
2006	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
2007	1	0	0	0	1	14	4	13	35	2	35	1	0	0	106
2008	0	0	0	0	0	11	3	8	45	2	24	0	0	0	93
2009	0	1	0	0	0	12	1	8	63	1	37	2	0	1	126
2010	0	0	1	1	0	11	6	4	47	3	22	0	2	1	98
Total	1	1	1	1	1	48	14	33	190	8	119	3	2	2	424

Fonte: Sinan-Net, Ministério da Saúde, Brasil

A tabela 1 mostra que ocorreu um aumento do número de casos confirmados desde 2006 e que o ano com maior número de casos foi 2009. O estado com maior número de casos foi São Paulo, seguido de Santa Catarina. A tabela 2 aponta que a confirmação da maioria dos casos foi por critério laboratorial, o qual consiste de: reação sorológica de imunofluorescência indireta para antígeno de *Rickettsia* spp, cujo título de anticorpo sejam $\geq 1:64$, em uma única amostra, ou com diferença de quatro vezes em duas amostras pareadas de soro, coletadas com diferença de 2 a 4 semanas; pesquisa direta da riquetsia por imuno-histoquímica em amostras de biópsia de pele e das petéquias de pacientes infectados, ou material de necropsia (fragmentos de pele com lesões, pulmão, fígado, baço, coração, músculos e cérebro); isolamento do agente em cultura de células de sangue ou órgãos, usando técnicas de biologia molecular, como a PCR (DEL FIORE, 2010; BRASIL; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). O critério clínico epidemiológico é usado quando há sintomas e antecedentes epidemiológicos compatíveis com FMB, como ter frequentado local endêmico para a doença e ter tido contato com carrapatos.

Tabela 2 – Casos confirmados de Febre Maculosa por critério de confirmação, segundo ano dos primeiros sintomas, 2006 a 2010

Ano	Ignorado/Branco	Laboratorial	Clínico- epidemiológico	TOTAL
2006	0	1	0	1
2007	1	99	6	106
2008	3	83	7	93
2009	4	111	11	126
2010	1	90	7	98
Total	9	384	31	424

Fonte: Sinan-Net, Ministério da Saúde, Brasil

Casos não tratados de FMMR demonstram uma progressão severa culminando em hospitalização e óbito (PADDOCK, 2010), no entanto houve a evolução para cura na maioria dos pacientes, principalmente nos Estados de São Paulo e Santa Catarina (Tabela 3) Um paciente da cidade de Peruíbe, litoral sul do

estado de São Paulo, reportou febre alta persistente, cefaléia, mialgia, escara em local de fixação de um carrapato; sinais clínicos idênticos aos observados em caso de riquetsiose parkeri nos Estados Unidos, assim como em outras riquetsioses da África, Ásia e Europa. A partir da biópsia da escara de inoculação, foi detectada uma nova cepa *Rickettsia*, chamada de cepa Mata Atlântica (strain Atlantic rainforest), que apresenta similaridades com *R. africae*, *R. parkeri* e *R. sibirica*. Houve um aumento de pelo menos 8X entre o soro coletado na fase aguda e os coletados nas fases convalescentes (SPOLIDORIO, 2010).

Silva et al. (2011) descreveram, no estado da Bahia, um caso de escara associada à riquetsiose, cujo início se deu 9 dias após o encontro de um carrapato fixado ao pulso direito do paciente, após acampar no Parque Nacional da Chapada Diamantina. Os sintomas foram febre persistente de 39 a 40°C, miagia severa, inchaço e dor no local de fixação do carrapato, que se transformou em escara. Após 4 dias ocorreu linfadenopatia regional na axila direita e exantema generalizado na face, tronco e extremidades superiores, lesões ulcerativas na mucosa bucal, língua e lábios, com pápulas que se transformaram em pústulas. Após o tratamento com Doxiciclina via oral (100 mg 2X/dia) em 2 dias houve o desaparecimento da febre e exantema e em 2 semanas da linfadenopatia. A sorologia para lâminas com antígenos para *R. parkeri* e *R. rickettsii* da fase aguda foi não reativa, com título ≥ 128 para *R. parkeri* e *R. rickettsii* na fase convalescente. Da biópsia da escara foram obtidos por PCR produtos para os genes *gltA* e *ompA*, cujas sequências de DNA corresponderam à cepa Mata Atlântica (GenBank GQ853063, GQ900666), idênticos à detectada por Spolidorio et al. (2010), indicando que esta era o agente responsável pela infecção. Esta cepa Mata Atlântica tem sido considerada uma nova cepa de *R. parkeri* no Brasil, transmitida pelo carrapato *Amblyomma ovale* (SABATINI et al. 2010).

O primeiro isolamento de *R. parkeri* foi em carrapato *A. maculatum* em 1937, também em 1948 (PARKER, 1939; BELL; PICKENS, 1953). Esta bactéria foi considerada não patogênica por mais de 65 anos, pois os primeiros casos confirmados de riquetsiose por *R. parkeri* nos Estados Unidos foram relatados a partir de 2004, com o isolamento do agente em cultura celular a partir de biópsia da necrose associada à fixação do carrapato, sem a confirmação do vetor implicado (PADDOCK, 2004). Foram identificados mais de 20 casos em vários estados no sudoeste dos Estados Unidos com sintomas comuns: febre persistente (39°C a

40°C), mialgia, cefaléia, mal-estar e erupção máculo-papular em extremidades, como palmas das mãos e palmas dos pés e ausência de óbito (RAOULT; PADDOCK, 2005; WHITMAN, 2007).

Whitman et al. descreveram, em 2007, a primeira infecção humana por *R. parkeri* associada ao parasitismo pelo carrapato *A. maculatum* (SUMNER, 2007). Como há coincidência da distribuição geográfica dos vetores muitos casos de riquettsiose *parkeri* foram diagnosticados como febre maculosa por *R. rickettsii* (TROUT, 2010). O uso do método Western Blot em 15 soros de pacientes previamente diagnosticados com FMMR, demonstrou quatro amostras reativas para proteína de 120 Kda de *R. parkeri*, sugerindo a infecção por este agente (RAOULT; PADDOCK, 2005). A infecção experimental de carrapatos *A. americanum* por *R. parkeri* mostrou que há a manutenção e transmissão da mesma para este vetor (GODDARD, 2003). Esta espécie é mais abundante que *A. maculatum*, sua distribuição se sobrepõe ao mesmo e apresenta antropofilia (MERTEN; DURDEN, 2000). Existem evidências moleculares de carrapatos *A. maculatum* naturalmente infectados por *R. parkeri* e *R. amblyommii* (SUMNER, 2007; TROUT, 2010). Cohen et al. (2009), identificaram, por técnicas moleculares, a infecção por *R. parkeri* em *A. americanum* coletado em coite (Canis latrans). Paddock et al. (2010) relataram infecção por *R. parkeri* em 10% a 40% da população de *A. maculatum* no EUA.

Em 2009 foram descritos três casos no Uruguai com manifestações clínicas semelhantes às descritas para a riquettsiose causada por *R. parkeri* (CONTI-DÍAZ, 2009). Febre até 40°C, cefaléia, escantema, escara de inoculação no local de fixação do carrapato, linfadenopatia regional, ausência de letalidade, títulos altos e similares para *R. parkeri* e *R. rickettsii* e baixos títulos para os outros antígenos testados. Foi comprovada a existência da *R. parkeri* em carrapato da espécie *A. triste*, coletado em uma pessoa diagnosticada com riquettsiose no Uruguai (CONTI-DÍAZ, 1991, 2001a, b, 2003; VENZAL, 2004). A presença de escara com necrose central no local de fixação do carrapato é uma manifestação característica nas riquettsioses causadas por *R. parkeri*, porém existem alguns relatos em regiões endêmicas para FMMR (CRAGUN, 2010; GARCÍA-GARCÍA, 2010). A semelhança dos sintomas não diferencia o gênero da bactéria e também há reação cruzada nos exames sorológicos, indicados como padrão ouro, já que geralmente o que se usa são lâminas de antígeno para *R. rickettsii*.

Tabela 3 – Casos confirmados de Febre Maculosa por evolução, segundo UF de notificação, 2006 a 2010

UF	I/B ¹	Cura	Óbito	
			Agravo notificado	Outra causa
AP	0	1	0	0
TO	0	0	1	0
CE	0	1	0	0
PB	1	0	0	0
BA	0	1	0	0
MG	3	26	19	0
ES	1	13	0	0
RJ	3	17	13	0
SP	8	120	56	6
PR	1	5	2	0
SC	2	117	0	0
RS	0	3	0	0
MS	0	2	0	0
MT	1	1	0	0
TOTAL	20	307	91	6

Fonte: Sinan-Net, Ministério da Saúde, Brasil

¹I/B – Ignorado ou em branco

A tabela três demonstra que 72% (307/424) dos casos de febre maculosa evoluíram para cura e 21% (91/424) evoluíram para óbito. No estado de Santa Catarina nenhum paciente veio a óbito, o que pode indicar uma evolução branda da rickettsiose e um agente distinto da *R. rickettsii*.

Recentemente houve o isolamento de *R. parkeri* cepa NOD e *R. bellii* de *A. nodosum* de aves (OGRZEWALSKA, 2009). Sabatini (2010) detectou a infecção por *R. bellii* em *A. aureolatum*, *A. incisum* e *A. ovale* de vida livre. No mesmo estudo 8,8% (3/34) dos *A. ovale* de vida livre, 13,6% (8/59) dos *A. ovale* de cão e 1,9% (1/54) *R. sanguineus* de cão, estavam infectados com *Rickettsia* sp cepa Mata Atlântica.

Pesquisando ectoparasitas de animais domésticos em Minas Gerais, em uma região endêmica para a FMB, foram encontradas amostras homólogas para *R. felis* em carrapatos *A. cajennense* e *R. sanguineus* e também em pulgas do gênero *Ctenocephalides*, além de *R. rickettsii* em carrapatos *A. cajennense*. A *R. felis* foi caracterizada como agente de infecção branda no Brasil, tendo como possíveis vetores pulgas *Ctenocephalides* spp (OLIVEIRA, 2002; HORTA, 2005; CARDOSO, 2006; GALVÃO, 2006). Há casos confirmados de rickettsiose por *R. typhi* no estado de São Paulo (SILVA; PAPAIOORDANOU, 2004).

No Brasil foi detectada, por técnicas moleculares, *R. amblyommii* em carrapatos *A. cajennense* e *A. coelebs* no estado de Rondônia (LABRUNA, 2004b). Em área de Floresta Atlântica, cidade de Nazaré Paulista, estado de São Paulo, foram coletados *A. longirostre* em aves que estavam infectados com *Rickettsia* sp cepa AL, próxima da *R. amblyommii* (OGRZEWALSKA, 2008). A *R. amblyommii* foi detectada em *Anocentor nitens*, *Amblyomma* spp coletado em anta e *R. B. Microplus* de vaca (EREMEEVA, 2009; NICHOLSON; MASTERS; WORMSER, 2009). Há suspeitas desta bactéria ser agente de doença leve em humanos, como no caso de um paciente que desenvolveu esantema macular após o parasitismo por carrapato infectado (BILLETER, 2007).

Tomassone et al. (2010), demonstram na Bolívia a detecção de *R. parkeri* infectando *A. tigrinum* em local com alta prevalência para *Rickettsias* do GFM em carrapatos, assim como alta soroprevalência das mesmas em cães. Esse fato sugere que há circulação ativa de agentes nesta área, mesmo sem casos confirmados em humanos e indica o uso de sorologia de cães como indicador de risco para riquetisioses.

O principal vetor da FMB, *A. cajennense*, (FABRICIUS, 1787) é uma espécie endêmica da região Neotropical, ocorre da Argentina ao sul do México, porém ausente no Chile e Uruguai. Seu comportamento é trioxeno, generalista e seus hospedeiros primários são equinos, antas e capivaras. Suas formas imaturas parasitam várias espécies de mamíferos e acidentalmente o homem (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006). Foi encontrada no município de Paulicéia parasitando cateto (*Tayassu tajacu*) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga trydactyla*) (LABRUNA, 2002).

Para o *A. dubitatum* a capivara é o principal hospedeiro, de todos os estágios, com relatos de formas imaturas em gambás (*Didelphis* spp) e humanos (hospedeiro acidental). Segundo Lemos et al. (1996) foi encontrado *A. dubitatum* infectado *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*. Existe evidência sorológica de infecção de cães, cavalos, capivaras e gambás por *R. parkeri* em áreas, do estado de São Paulo, associadas à infestações por *A. dubitatum* e *A. cajennense* (HORTA, 2004, 2007; HORTA, 2009; PACHECO, 2007). O papel desse carrapato como vetor enzoótico da *R. rickettsii* ainda é desconhecido.

O *A. coelebs* (NEUMANN, 1899), tem ocorrência na Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Guatemala, Guiana, Guiana Francesa, Honduras, sul

do México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname e Venezuela. Parasita mamíferos da ordem Perissodactyla e suas formas adultas são geralmente encontradas em anta. (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

O ectoparasita *Rhipicephalus (B) microplus* tem comportamento monoxeno, parasita preferencialmente bovinos e há parasitismo eventual em humanos em altas infestações. É Vetor da tristeza parasitária bovina, causada por diferentes agentes tais como: *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* e *Babesia bovis* (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006; PEREIRA, 2008).

O carrapato *Dermacentor nitens* (NEUMANN, 1897) é uma espécie monoxena que parasita equinos, asininos e muare, principalmente o meato auricular, divertículo nasal, área perianal, entre pernas, crina e cauda. Quando há infestação maciça pode causar anemia por depleção sanguínea e os exudatos presentes no local infeccionado predispõem à ocorrência de miíases. É o principal vetor de *Babesia caballi*, agente da piroplasmose equina (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006).

O carrapato *A. triste* foi descrito por Kock (1844) em Montevideo, capital do Uruguai, a partir de duas fêmeas, sem informações sobre o hospedeiro. O primeiro registro no Brasil foi também uma fêmea, em 1928, no município de Obidos, Estado do Pará. Em 1947 foi descrita outra fêmea, coletada em anta (*Tapirus* spp), no mesmo local e em 1948 foram coletados um macho e duas fêmeas, às margens do Rio Xingu, no estado do Mato Grosso do Sul (KOHLS, 1956). Posteriormente foram relatados exemplares de *A. triste* coletados em cão doméstico e capivara (*Hydrochoeris hydrochaeris*) no estado do Rio Grande do Sul; em gambá (*Didelphis marsupialis*) e tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) no Estado de São Paulo (FREIRE, 1967/1968; LEMOS, 1997; SINKOCK, 1997; EVANS; MARTINS; GUGLIEMONE, 2000; LABRUNA, 2002). Os hospedeiros primários no Brasil são considerados o cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), para o estágio adulto na região do Pontal do Paranapanema e foi encontrada uma fêmea parasitando tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga trydactyla*) no mesmo local (LABRUNA, 2002; SZABÓ, 2003).

Na América do Sul foi confirmado, no Uruguai, o parasitismo por *A. triste* em cão doméstico, bovinos, caprinos e eqüinos, humanos e em animais silvestres, segundo Venzal et al. (2003a). Esta espécie foi encontrada parasitando humanos na Argentina, Colômbia, Peru, Uruguai e Venezuela (SAMPALIO; CARBELLO;

PARIETTI, 1992; VENZAL, 2003a,b). Na Argentina foi relatado o parasitismo de cão doméstico; no Equador foi relatado em suçuaranas (*Puma concolor*), onça-pintada (*Panthera onca*) e gado (IVANCOVICH, 1980; DURDEN, 2006). No Uruguai foram encontradas formas imaturas do *A. triste* parasitando diversos roedores silvestres: camundongo-do-mato (*Oligorysomys flavescens*), (*Oxymycterus nasutus*), rato-da-palha (*Scapteromys tumidus*), preá (*Cavia aperea aperea*) e em pequeno marsupial chamado guaiquica (*Monodelphis dimidiata*) (ESTRADA-PEÑA; VENZAL; GUGLIELMONE, 2002; VENZAL, 2003c). A ausência de relatos das formas imaturas no Brasil pode estar ocorrendo pela identificação errônea desta espécie com outras, já que a descrição dos hospedeiros para estágios imaturos da maioria das espécies *Amblyomma* no Brasil, ainda são incompletos. A identificação das formas adultas do *A. triste* se confunde com outras espécies neotropicais, como *A. maculatum* e *A. tigrinum*, pois tanto *A. tigrinum* como *A. triste* são consideradas sinônimos do *A. maculatum* (KOHLS, 1956; VENZAL, 2003a). A distribuição das espécies favorece o erro, pois tanto o *A. triste* como o *A. tigrinum* estão restritos à América do Sul, enquanto o *A. maculatum* é encontrado do Sul dos E.U.A à Colômbia, Venezuela e Peru (GUGLIELMONE; MANGOLD; HADANI, 1982; EVANS, 2000). É interessante ressaltar que existem evidências moleculares que *A. maculatum* e *A. triste* sejam a mesma espécie de carrapato (GUGLIELMONE; MANGOLD; HADANI, 1982; VENZAL, 2003a).

Labruna et al. (2003) estudaram em laboratório o ciclo de vida do *A. triste*, usando modelos animais para simular os hospedeiros naturais. A melhor recuperação das larvas e ninfas foi em cobaia (*Cavia aperea porcellus*), seguido pelas galinhas (*Gallus gallus*), assim supõem-se que a manutenção na natureza do ectoparasita de dê em seus paralelos silvestres: preás e aves silvestres. Para as formas adultas o hospedeiro mais competente foi a capivara (*H. hydrochaeris*), seguida pelo cão. A distribuição da capivara corresponde às áreas alagadiças próximas a cursos de água, onde foram encontrados os exemplares de *A. triste* no Brasil. A adaptação do *A. triste* aos seus hospedeiros no Brasil pode ser diferente da observada no Uruguai, onde o cão exerce o papel de hospedeiro primário para as formas adultas.

No estado do Rio de Janeiro, na cidade de Barra do Piraí, área endêmica para febre maculosa, foi detectado DNA de *R. rickettsii* por PCR com gene *gltA* de *Rickettsia*, em sangue de 2 cães e um equino (GEHRKE, 2010). No mesmo estado

21,43% das amostras de cavalos e 15,9% das amostras de cães apresentaram anticorpos anti- *R. rickettsii* (CORDEIRO, 2010a,b).

Pena et al. (2009) em local endêmico para FMB, Santa Cruz do Descalvado no estado de Minas Gerais, encontraram em 2,7% dos soros de equinos, 2% dos soros de cães e 81,25% de soros de ratos (*Rattus rattus*) sororeatividade para riquetsias do GFM. Dos soros de gambás 14,3% apresentaram anticorpos anti-*R.parkeri* e anti-*R.rickettsii*.

Em áreas não endêmicas: no estado do Mato Grosso do sul, cidade de Campo Grande, 80% das amostras de soros de cavalos apresentaram anticorpos anti-*Rickettsia* (ALMEIDA, 2010). Já na cidade de Corumbá, 64,7% das amostras de soros de cães apresentaram anticorpos anti-*Rickettsia*, com *R. parkeri*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephalii* como prováveis antígenos homólogos (MELO, 2010). Em cidades do norte do estado do Paraná, foram detectados anticorpos anti-*Rickettsia* em 5,29% (15/284), com a *R. parkeri* como provável antígeno homólogo em 13% (2/15) das amostras positivas (OTOMURA, 2010). Em outro estudo na mesma região Tamekuni et al. (2010) descrevem uma prevalência de 33% em soros de equinos, homólogos para *R. rickettsii*. Já no sudoeste do Paraná 9,33% dos cavalos com anticorpos anti-*Rickettsia* (FREITAS, 2010).

No estado de Santa Catarina 3% (8/268) dos carrapatos das espécies *A. cajennense*, *A. ovale* e *R. sanguineus*, apresentaram sequenciamento positivo para *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, coletados em áreas endêmicas e não endêmicas em Santa Catarina (MEDEIROS, 2010).

No Brasil o isolamento de *R. rickettsii* em condições naturais se deu somente em gambás (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935) Os gambás podem agir como hospedeiro amplificador da *R. rickettsii*, em áreas endêmicas para FMB, possibilitando a infecção de carrapatos (HORTA, 2009). Preenchem os requisitos de possível hospedeiro amplificador: abundantes em áreas endêmicas para FMB; têm altos títulos de riquetsemia; sofrem infestação frequente por larvas e ninfas de *Amblyomma* spp, incluindo *A. cajennense*; tem alta taxa de renovação da população, proporcionando animais susceptíveis à infecção por *Rickettsia*. Segundo Horta (2009) o DNA de *R. rickettsii* não era encontrado no sangue de gambás (*D. aurita*), mesmo com a riquetsemia demonstrada por infecção indireta do modelo experimental (cobaia). Em infecção experimental de gambás (*D. albiventris*), com diferentes antígenos de *Rickettsia*, houve produção de anticorpos anti-*R. bellii*, *R.*

felis e *R. parkeri*. A ricketsemia foi indetectável para os dois primeiros antígenos e muito baixa para *R. parkeri* (HORTA et al., 2010)

As capivaras (*Hydrocoerus hydrocaeris*) apresentam ricketsemia, são susceptíveis à infecção, porém sem febre, com a capacidade de infectar cobaias e carrapatos *A. cajennense*. Dessa maneira elas podem agir como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* em regiões endêmicas para FMB (SOUZA, 2009).

Recentemente, Silveira et al. (2007) encontraram infecção por *R. parkeri* em 9,7% de carrapatos *A. triste* coletados numa região de várzea do Rio Paraná, no município de Paulicéia, estado de São Paulo. Como esta rickettsia está atualmente reconhecida como um patógeno emergente, este achado motivou o presente trabalho.

2 OBJETIVOS

- Avaliar a soroprevalência de infecção por *R. parkeri* em humanos, cães, equinos e gambás, em áreas periféricas e distantes, até 20 Km, do local previamente conhecido de ocorrência desta bactéria, no município de Paulicéia.
- Avaliar a infecção por *Rickettsia* spp em carrapatos em áreas periféricas e distantes, até 20 Km, do local previamente conhecido de ocorrência de *R. parkeri* no município de Paulicéia .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta dos carrapatos em vida livre e parasitária na área rural do município de Paulicéia

O local de estudo localiza-se a 686 Km da capital do estado de São Paulo, com 374 Km² de área total e apresentando 6.342 habitantes (IBGE, 2010). A economia local é baseada na extração de argila para produção de produtos de cerâmica, pecuária de corte, plantio da cana-de-açúcar e turismo de pesca.

A escolha das propriedades a serem amostradas teve como ponto de referência uma fazenda da Companhia Energética de São Paulo (CESP), onde 9,7% de uma população de *A. triste* estavam infectados por *R. parkeri* (SILVEIRA, 2007). A partir deste local foi traçado um raio de até 20 Km e foram determinados 10 pontos de coleta (contemplando uma ou mais propriedades rurais): o ponto zero é a própria fazenda da Cesp; pontos 1, 2, 3 estavam num raio mínimo de 2 Km do ponto zero; pontos 4, 5, 6 estavam num raio mínimo de 7 Km do ponto zero; e pontos 7, 8 e 9 estavam num raio mínimo de 15 Km do ponto zero. Além disso foram coletadas amostras na área urbana de Paulicéia (Figura 2).

Figura 2 – Locais de coleta de amostras, pontos zero a nove, propriedades rurais com distância mínima de 2 Km e máxima de 19 Km do ponto zero - município de Paulicéia - Estado de São Paulo, 2008 e 2009.

Foram capturados carrapatos, de vida livre, provenientes de propriedades rurais em três coletas: janeiro de 2008, fevereiro e setembro de 2009. Para captura dos carrapatos, foram utilizadas armadilhas de gelo seco (CO_2), segundo Oliveira et al. (2002). As armadilhas foram montadas em áreas de várzea e áreas de capoeiras e matas, locais de maior favorabilidade para a presença de *A. cajennense*, *A. dubitatum* e *A. triste* (SZABÓ, 2003, 2007). Também foi utilizado o método de arraste de flanela, de forma aleatória por no mínimo uma hora, para a captura dos carrapatos em vida livre (Figura 3).

Fonte: do autor.

Figura 3 – Método de arraste de flanela para a captura dos carrapatos em vida livre

Os carrapatos capturados foram transportados vivos em frascos plásticos tampados, com pequenos furos na tampa para a entrada de ar e papel absorvente em seu interior, para evitar o excesso de umidade. Os artrópodes foram trazidos para o Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. Foram mantidos vivos em estufa BOD (câmara climática MA 402 Marconi®) a 34°C, com umidade relativa maior que 95% durante quatro a cinco dias, buscando favorecer a multiplicação das riquetsias que porventura existissem no interior dos artrópodes.

A identificação dos carrapatos adultos, para gênero e espécie, foi realizada segundo as chaves taxonômicas para carrapatos neotropicais de Barros-Battesti et al. (2006). A identificação das ninfas foi realizada segundo chave de identificação para ninfas de *Amblyomma*, proposta por Martins et al. (2010). A identificação das larvas até nível de espécie foi feita pela PCR de fragmento de gene 16S rRNA mitocondrial de carrapato (Quadro 1).

3.2 Teste de hemolinfa dos carrapatos

O teste de hemolinfa é um método de triagem que permite identificar carrapatos adultos, que estejam infectados por organismos morfológicamente compatíveis com o gênero *Rickettsia* (BURGDORFER, 1970). A porção distal de uma das patas dianteiras, de cada carrapato, foi cortada com tesoura e depositada uma a duas gotas de hemolinfa em lâminas de vidro, previamente limpas e desengorduradas. As lâminas foram fixadas a temperatura ambiente, coradas pelo método de Giménez (1964) e examinadas ao microscópio óptico com aumento de 1000x, em óleo de imersão. Após este procedimento os carrapatos, acondicionados individualmente em microtubos de 1,5 ml (Eppendorf®) foram congelados em freezer a -20°C, para posterior análise pelas técnicas de biologia molecular.

3.3 Extração de DNA dos carrapatos e ácaros

Todos os carrapatos adultos congelados, negativos ou positivos ao teste de hemolinfa, assim como as ninfas, foram descongelados e processados, individualmente, para a extração do DNA. A técnica utilizada é uma adaptação do protocolo descrito por Chomekzynski (1993), adotado por Sangioni et al. (2005). Cada carrapato inteiro foi triturado em microtubo de 1,5 ml, com o auxílio de uma agulha estéril (Tamanho 40X12 marca BD®) e triturado com uma ponteira 1000 ml com a ponta selada em bico de Bulsen, a este tubo foram adicionados 150 µl de tampão TE pH 8,0 (10 mM TRIS HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0) seguindo-se de homogeneização no vórtex e centrifugação (Eppendorf® Centrifuge 5415D), por 6 segundos. Foi acrescentado 450µl de GT (5 ml TRIS HCl pH 7,5; 10 ml EDTA 0,5 M, pH 8,0; 60g de isotiocianato de guanidina; 100 ml de fenol equilibrado, azul de ortotoluidina), seguido de homogenização no vórtex a cada 2 minutos e meio, até o tempo total de dez minutos. Foram acrescentados 100 µl de clorofórmio P.A., os tubos foram centrifugados a 12.000 rpm (Eppendorf® Centrifuge 5415D), durante cinco minutos. Após a retirada do sobrenadante para um novo microtubo, o tubo com o carrapato foi descartado, foi adicionado 600 µl de isopropanol P.A. e colocado em descanso em freezer (-20°C), por um tempo mínimo de duas horas e máximo de 24 horas. Após o repouso a amostra foi centrifugada (Eppendorf® Centrifuge 5804R) refrigerada (4°C) a 12.000 rpm, durante 15 minutos e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspensionado em 800 µl de etanol 70% (30 ml de água e 70 ml de

etanol P.A.) e centrifugado refrigerado (4°C) a 12.000 rpm, durante 15 minutos. O líquido foi descartado e o sedimento final foi ressuspensionado em 30 µl de TE pH 8,0, com aquecimento em banho-maria a 56°C por 15 minutos, para facilitar a dissolução do DNA previamente precipitado. O material genético extraído foi congelado a -20°C, para aguardar análise pela reação em cadeia da polimerase (PCR).

As larvas foram separadas em conjuntos (pools) de 3 a 5 indivíduos, por local de coleta, com 3 a 5 larvas por microtubo (1,5 ml) para a extração de DNA. A este tubo foi acrescentado 30 µl de TE pH 8,0 para aquecimento a 100°C em termobloco (Eppendorf® Termomixer Confort) por 30 minutos.

Os ácaros tiveram o DNA extraído pelo kit "DNeasy Tissue Kit" (Quiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

3.4 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) do DNA dos ectoparasitas

Para a identificação da espécie de carrapato os “pools” de larvas extraídas foram utilizados na PCR de um fragmento do gene mitocondrial ribossômico rDNA 16S de carrapato (Quadro 1), com protocolos específicos para cada 1 (Quadro 2).

O DNA extraído de cada carrapato, adultos e imaturos, foi testado para o par de primers 1 (Quadro 1). Esse par de primers amplifica um fragmento de 401-pb do gene citrato sintase (*gltA*) de qualquer espécie do gênero *Rickettsia*, sendo indicado para triagem da presença de DNA de *Rickettsia* (GUEDES, 2005). Quando positivo para *gltA*, o material foi testado para o par de primers 2 (Quadro 1) que amplificam um fragmento do gene *ompA*, específico para riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, proteína externa de membrana A, cuja função é importante para adesão e invasão celular. Como controle positivo da PCR, foi utilizado DNA de carrapato *A. nodosum*, experimentalmente infectado por *R. parkeri*.

Pares de primers	Genes e primers	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	Produto amplificado (pb)	Posição relativa ORF
	<i>gltA</i> (citrato sintase)			
1	CS-78	GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT	401	-78 a -56
	CS-323	GCT TCC TTA AAA TTC AAT AAATCAGGAT		323 a 296
2	CS-239	GCT CTT CTC ATC CTA TGG CTA TTA T	834	239 a 263
	CS-1069	CAG GGT CTT CGT CGA TTT CTT		1069 a 1049
3	<i>ompA</i> (190 kDa)			
	<i>Rr190.70p</i>	ATG GCG AAT ATTTCTCCAAAA	530	478 a 499
	<i>Rr190.602n</i>	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT		990 a 969
4	<i>htrA</i> (17kDa)			
	17K3	GCT TTA CAA AAT TCT AAA AAC CAT ATA	549	-62 a 34
	17K5	CAT TAC TTG GTT CTC AAT TCG G		+6 a 465
5	16S TICK			
	16s +1	CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T	460	
	16s -1	GCT CAA TGA TTT TTT AAA TTG CTG T		

Quadro 1 – Primers (oligonucleotídeos iniciadores) utilizados para amplificação de diferentes fragmentos de genes para bactérias do gênero *Rickettsia*

Reagentes	<i>gltA</i>	<i>OmpA</i>	<i>htrA</i>	16S Tick
Nucleotídeos trifosfatados (Dntp 1,25 mM)	8,0 µl	10,0 µl	8,0 µl	8,0 µl
Tampão "buffer" 10 X	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl	5,0 µl
MgCl ₂ (50 mM)	1,5 µl	2,0 µl	1,5 µl	1,5 µl
Primer Forward (pmoles/µl)	2,5 µl	3,0 µl	2,5 µl	2,5 µl
Primer Reverse (pmoles/µl)	2,5 µl	3,0 µl	2,5 µl	2,5 µl
Taq polimerase (5000 U/ml)	0,3 µl	0,3 µl	0,5 µl	0,3 µl
H ₂ O mili Q q.s.p.	25,2 µl	21,7 µl	25,0 µl	25,2 µl
TOTAL	45 µl	45 µl	45 µl	45 µl

Quadro 2 – Concentração dos reagentes empregados na reação em cadeia pela polimerase (PCR), de acordo com o gene alvo buscado

Após o acréscimo do DNA, cada reação de PCR foi processada pelo aparelho de termociclador (Eppendorf® Mastercycler gradient), conforme o protocolo específico para cada gene, demonstrado no quadro 3.

Etapas	<i>gltA</i>	<i>ompA</i>	<i>htrA</i>	16S TICK
Desnaturação inicial	95°C 5 min	95°C 5 min	95°C 3 min	94°C 3 min
Número de ciclos	39	34	39	40
Desnaturação	95°C 30 seg	95°C 40 seg	95°C 15 seg	94°C 30 seg
Anelamento	52°C 30 seg	58°C 30 seg	48°C 30 seg	52°C 30 seg
Extensão	72°C 40 seg	72°C 45 seg	72°C 30 seg	72°C 40 seg
Extensão final	72°C 7 min	72°C 10 min	72°C 7 min	72°C 7 min

Quadro 3 – Protocolos do termociclador de acordo com o gene alvo utilizado na reação de PCR

3.5 Análise dos produtos amplificados

Aos produtos amplificados na reação de PCR foi acrescentado 2 a 3 µl de tampão de corrida em gel de agarose a 1,5% (100ml TBE 0,5%; 1,5 g UltraPure™ Agarose Invitrogen™), com aparelho de eletroforese em cuba horizontal e tampão TBE 0,5X (2,7g Tris-borato; 10 ml EDTA pH 8,0; 13,75g ácido bórico; água destilada q.s.p.) submetida à 50V/100mA durante 20 a 30 minutos. Para a revelação este gel foi mergulhado em solução de brometo de etídeo (0,5 ug/ml), em agitação, por 10 a 30 minutos e as bandas foram visualizadas em transiluminador ultravioleta.

3.6 Sequenciamento do DNA genômico

Os produtos amplificados obtidos nas reações de PCR foram purificados com o acréscimo de 3,0 µl de ExoSAP-IT (USB Corporation) à 7,5 µl da amostra e colocados no termociclador por 30 minutos. Ao DNA purificado foram acrescentados os reagentes do kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com as especificações do fabricante.

Após a reação de sequenciamento no termociclador foi realizada a precipitação do DNA com o acréscimo de 40 µl de álcool isopropílico 65% ao total da amostra, após homogeneização o tubo foi deixado em descanso protegido da luz, por 20 minutos e centrifugado refrigerado (25°C) a 14.000 rpm durante 25 minutos. O sobrenadante foi descartado e acrescentado ao tubo 300 µl de etanol 60%, homogeneizado e centrifugado refrigerado (25°C) a 14.000 rpm durante 10 minutos. Após a centrifugação o líquido foi descartado e o tubo colocado em termobloco a 80°C por 2 minutos. O tubo foi armazenado em freezer (-20°C) para aguardar a

leitura do sequenciamento direto de nucleotídeos no sequenciador automático de DNA.

Após junho de 2010 o protocolo de precipitação de DNA foi substituído para o protocolo de precipitação que utiliza edta-etanol, da seguinte maneira: foi adicionado a 10, ml de amostra, proveniente do sequenciamento, 5 µl de edta 1,25 mM e 60 µl de etanol (100%), foi homogeneizado e permaneceu protegido da luz a temperatura ambiente por 30'. Foi centrifugado refrigerado (4°C) a 16.000g por 30 minutos, o sobrenadante foi desprezado e ao tubo foi acrescentado 65 µl de etanol (75%), com homogeneização manual. Foi novamente centrifugado refrigerado (4°C) a 16.000g por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado. e o tubo colocado em termobloco a 95°C por 5 minutos e armazenado congelado para aguardar a leitura no sequenciador automático de nucleotídeos ABI Prism™377 DNA Sequencer (Applied Biosystems), segundo seu manual de instruções.

3.7 Análise do DNA genômico

Para cada um dos nucleotídeos nos eletroferogramas gerados para as seqüências senso e anti-senso de cada amostra foram atribuídos escores pelo aplicativo Phred (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>), sendo utilizadas as posições que apresentaram nucleotídeos com índice maior que 20. A seqüência dos nucleotídeos consenso final de cada amostra foi obtida com o aplicativo CAP-contig do programa Bioedit versão 7.0.5.3 (1997-2001 Tom Hall), sendo a mesma submetida ao BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para confirmação do seqüenciamento.

As seqüências obtidas foram editadas com o pacote de programas BioEdit® Sequence Alignment Editor (HALL, 1999) e submetidas à análise de similaridade com as seqüências disponíveis de espécies de riquetsias no GenBank, utilizando o programa BLAST analysis (ALTSCHUL, 1990).

3.8 Coleta de sangue em humanos e animais domésticos

Em cada uma das propriedades escolhidas foram coletadas amostras de sangue de humanos e animais domésticos (cães e equinos), com o preenchimento de um termo de consentimento para coleta de amostras (Apêndices E e F). A coleta

foi por venocentese de veia cefálica para os cães e nos equinos foi realizada a venocentese de veia jugular.

Para a coleta de sangue foram utilizadas seringas e agulhas estéreis, além de tubos sem anti-coagulante para acondicionamento do sangue. O sangue total foi centrifugado para a obtenção do soro em laboratório local, aliquotado e armazenado a -20°C, para aguardar a realização do teste de imunofluorescência.

Em humanos, a coleta de amostras de sangue foi realizada por profissionais da saúde habilitados, cedidos pela coordenadoria de saúde municipal de Paulicéia.

3.9 Detecção e titulação de níveis de anticorpos anti-*Rickettsia* no soro de humanos e animais domésticos

Os soros sanguíneos obtidos dos humanos e animais foram testados pela técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Os antígenos utilizados foram: *R. rickettsii* cepa Taiaçu, *R. parkeri* cepa At24, *R. felis* cepa Pedreira, *R. rhipicephali* cepa HJ#5, *R. amblyommii* cepa Ac37 e *R. bellii* cepa Mogi (HORTA, 2004; LABRUNA, 2007). Os conjugados espécie-específico da marca Sigma® utilizados foram: IgG anti-humanos, diluição 1:1.200; IgG anti-cão, diluição 1:400; IgG anti-cavalo, diluição 1:800; o conjugado anti-gambá, diluição 1:600, foi produzido pelo Centro de Controle de Zoonoses do Município de São Paulo.

Foram considerados positivos os soros que apresentaram títulos ≤ 64 (demonstrado na figura 4) e este soros foram diluídos para determinar o título final de positividade. Para considerar um antígeno como provável homólogo causador da infecção, deve existir pelo menos uma diferença de quatro vezes maior o título entre essa *Rickettsia* e as outras testadas.

Fonte: do autor

Figura 4 – Reação de imunofluorescência indireta positiva para *R. rickettsii*, soro de equino, 2008

3.10 Método de análise estatística para os questionários epidemiológicos

Para cada amostra de sangue coletada, tanto de animais como humanos, foi preenchido um questionário epidemiológico de variáveis independentes, que poderiam ser fatores de risco para a infecção por *Rickettsia* (Apêndices A a D).

Os resultados dos questionários foram transformados em categorias dicotômicas para cada variável independente, conforme demonstrado na tabela 4, sendo que para a variável dependente: presença de anticorpos anti-*R. parkeri* no soro, os códigos usados foram 1 para resultado positivo e 0 para resultado negativo.

Para o estudo da associação entre as categorias primeiramente foi usado um modelo de associação para cada variável, chamado de análise univariada. A variável dependente era: presença de anticorpos anti-*R. parkeri* no soro do equino e as variáveis independentes: ponto de coleta, sexo, idade, tempo de residência na região, acesso à mata e acesso à várzea do rio Paraná (Tabela 4). Para este modelo de associação foi usado o teste de Qui-quadrado (X^2) como medida de associação, com intervalo de confiança de 95%.

Para as variáveis que apresentaram valor de $p \leq 0,20$ (20%) na análise univariada, foi aplicado o teste de análise multivariada, ou de regressão logística, utilizando o programa SPSS (ANHÃO, 2009), considerando significativo o valor de $p \leq 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

Tabela 4 – Categorias dicotômicas para cada variável independente usada na análise estatística da presença ou ausência de anticorpos anti-*R. parkeri* no soro de equinos, município de Paulicéia - São Paulo - fevereiro de 2008 e março de 2009

Número	Variáveis independentes	Código 0	Código 1
1	Sexo	Macho	Fêmea
2	Idade	≥ 10	≤ 10
3	Tempo de residência na região	$\geq 8,5$	$\leq 8,5$
4	Acesso à mata	Não	Sim
5	Acesso à várzea do rio Paraná	Não	Sim

3.11 Captura de gambás (*Didelphis* spp)

Nos locais pré-determinados de coleta de amostras foram utilizadas 33 armadilhas de arame tipo “live trap” (Figura 5) com iscas de carne embutida suína defumada, durante quatro noites, dispostas próximas às árvores.

Fonte: do autor

Figura 5 – Armadilha para captura de gambás – município de Paulicéia – Estado de São Paulo, 2009

Os animais capturados foram sedados com 0,5ml/Kg de quetamina intramuscular, para a coleta de sangue via caudal e busca de ectoparasitas por visualização, após a coleta das amostras os animais eram soltos no mesmo local da captura. O sangue total foi centrifugado para a obtenção do soro em laboratório local, aliquotado e armazenado a -20°C, para aguardar a realização do teste de imunofluorescência.

3.12 Frequência dos carrapatos infectados com *Rickettsia*

As amostras com sequenciamento para qualquer *Rickettsia* foram divididas pelo total de carrapatos testados e também pelo total da espécie coletada.

4 RESULTADOS

4.1 Coleta de carrapatos em vida livre parasitária na área rural do município de Paulicéia

Foram coletados 13 fêmeas e 21 machos de *Dermacentor nitens* em cinco equinos no ponto 6 e 42 fêmeas e 18 machos também de *D. nitens* em seis equinos do ponto 4.

De um total de 1595 carrapatos coletados em vida livre, 2,7% eram carrapatos adultos (45/1593). Destes 43 eram *A. cajennense* (95%), 20 fêmeas e 23 machos e 5% eram *A. coelebs*, 2 machos, conforme demonstrado na tabela 5.

Tabela 5 – Carrapatos adultos coletados em vida livre separados por local de coleta, espécie e gênero, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - fevereiro de 2008, janeiro e setembro de 2009.

Local de coleta	<i>A. cajennense</i>		<i>A. coelebs</i>		Total
	Fêmea	Macho	Fêmea	Macho	
Ponto zero	9	9	0	2	18
Ponto 1	1	0	0	0	1
Ponto 2	4	7	0	0	11
Ponto 3	1	2	0	0	3
Ponto 4	5	5	0	0	10
Ponto 5	0	0	0	0	0
Ponto 6	0	0	0	0	0
Ponto 7	0	0	0	0	0
Ponto 8	0	0	0	0	0
Ponto 9	0	0	0	0	0
Total	20	23	0	2	45

Também foram coletadas 985 ninfas (62% do total), destas, 99,5% (980/985) eram *A. cajennense*, 0,4% (4/985) eram *A. coelebs* e 0,1% (1/985) eram *A. triste*, conforme demonstrado na tabela 6.

Tabela 6 – Ninfas de carrapatos coletadas em vida livre, separadas por local de coleta e espécie, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009

Local de coleta	<i>A. cajennense</i>	<i>A. coelebs</i>	<i>A. triste</i>	Total
Ponto zero	455	0	0	455
Ponto 1	26	0	0	26
Ponto 2	295	4	0	299
Ponto 3	48	0	0	48
Ponto 4	95	0	0	95
Ponto 5	2	0	0	2
Ponto 6	23	0	0	23
Ponto 7	29	0	1	30
Ponto 8	4	0	0	4
Ponto 9	3	0	0	3
Total	980 (99,5%)	4 (0,4%)	1 (0.1%)	985

Um total de 565 larvas foram coletadas (Tabela 7) Destas 480 (85,0%) foram identificadas como *A. cajennense*, 99 a 100% de identidade para o gene 16S rRNA mitocondrial de *A. cajennense* (GenBank FJ424404.1). Outras 55 (9,7%) larvas foram identificadas como *R. B. microplus*, 100% de identidade para o gene 16S rRNA mitocondrial de *R. B. microplus*, disponível no GenBank (EU918187.1). Um total de 20 (3,5%) das amostras foram identificadas como *A. dubitatum*, 100% de identidade para o gene 16S rRNA mitocondrial de *A. dubitatum* (GenBank DQ858955). Somente 10 (1,8%) das amostras foram identificadas como *D. nitens*, 100% de identidade para o gene 16S rRNA mitocondrial de *D. nitens* (GenBank AY375436.1).

Tabela 7 – Larvas de carrapatos coletadas em vida livre, separadas por local de coleta e espécie, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009

Local de coleta	<i>A. cajennense</i>	<i>A. dubitatum</i>	<i>R. B. microplus</i>	<i>D. nitens</i>	Total
Ponto zero	130	0	0	0	130
Ponto 1	105	0	0	0	105
Ponto 2	95	0	0	0	95
Ponto 3	30	0	0	0	30
Ponto 4	55	20	0	0	75
Ponto 5	5	0	0	0	5
Ponto 6	60	0	0	0	60
Ponto 7	0	0	15	0	15
Ponto 8	0	0	0	10	10
Ponto 9	0	0	40	0	40
Total	480 (85,0%)	20 (3,5%)	55 (9,7%)	10 (1,8%)	565

4.2 Teste de hemolinfa dos carrapatos

Somente os carrapatos adultos da espécie *A. cajennense* foram testados pelo teste de hemolinfa, porém nenhum apresentou microorganismos, corados com fuscina, morfologicamente semelhantes à *Rickettsia*.

4.3 Reação em cadeia pela polimerase (PCR) do DNA dos ectoparasitas e sequenciamento do DNA genômico

Todas as amostras foram testadas para a PCR com primers do gene *gltA* (Quadro 1) e tanto os carrapatos adultos, como as larvas foram negativos. Das ninfas testadas somente 2 amostras, originárias do ponto 2, da espécie *A. coelebs*, foram positivas. Estas também foram testadas por PCR para o gene *ompA* (Quadro 1), sendo ambas positivas. No sequenciamento de DNA, dos produtos amplificados, as duas amostras mostraram sequências idênticas entre si, com 99% de identidade para o gene *ompA* com *R. amblyommii*, disponível no GenBank (número de acesso EF194096). A distância entre o ponto de coleta das ninfas infectadas para o ponto zero é de 2 Km. Para o total de carrapatos *A. coelebs*, coletados em vida livre, a frequência de infecção foi de 33% (2/6).

4.4 RIFI do soro dos animais domésticos e dos seres humanos

Dentre os moradores das propriedades rurais pré-estabelecidas, somente em um indivíduo foi detectada a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp, com título 64 para os antígenos *R. rickettsii* e *R. parkeri* (Tabela 8).

Foram coletadas 140 amostras de sangue dos equinos, destas 34 (24%) apresentaram anticorpos para os antígenos *R. rickettsii* e *R. parkeri*, com títulos variando de 64 até 1024 (Tabela 8). Deste total, quatro animais apresentaram título 128 para *R. amblyommii*, três animais apresentaram título 128 para *R. bellii* e nenhum mostrou-se reagente aos antígenos *R. rhipicephali* e *R. felis*. Os pontos, 2, 4, 8 e 9 não apresentaram equinos com sorologia positiva para anticorpos anti-*Rickettsia* (Figura 6).

Figura 6 – Sorologia positiva em equinos para antígenos anti-*Rickettsia* - município de Paulicéia - Estado de São Paulo, 2008 e 2009.

Foram coletadas 65 amostras de sangue de cães, porém 10 foram descartadas por não ser possível o preenchimento do questionário epidemiológico, portanto foi processado um total de 55 amostras. Destas, cinco amostras (7,7%) apresentaram anticorpos anti-*Rickettsia* para os antígenos *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Os títulos para estes antígenos variavam de 64 até 256 (Tabela 9). As amostras de cães coletadas apresentaram positividade nos pontos 0, 1 e 9, entretanto os pontos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 não apresentaram cães com sorologia positiva para anticorpos anti-*Rickettsia* (Figura 7).

Figura 7 – Sorologia positiva em cães para antígenos anti-*Rickettsia* - município de Paulicéia - Estado de São Paulo, 2008 e 2009

Em nove equinos, pontos 0, 1 e 6, a *R. Parkeri* foi considerada o antígeno com maior probabilidade de estar envolvido na reação homóloga, por apresentar títulos maiores, em pelo menos 4 vezes, em comparação com títulos dos outros antígenos testados (Figura 9). A amostra do equino 20 apresentou títulos 64 para *R. parkeri* e *R. rickettsii* e este equino apresentou em 2008, títulos 64 para *R. parkeri* e 128 para *R. rickettsii*. Em duas amostras de cães, pontos 0 e 1, a *R. parkeri* foi considerada o antígeno com maior probabilidade de estar envolvido na reação homóloga (Figura 8).

Tabela 8 – Títulos das amostras positivas para RIFI de seis espécies de *Rickettsia*, em cães, equinos e humanos, originários do município de Paulicéia - Estado de São Paulo - fevereiro a março de 2008 e fevereiro de 2009

Soro	Títulos RIFI						Local	PAH ¹
	<i>R. parkeri</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. rhipicephalii</i>	<i>R. felis</i>		
Cão 1	256	64	NR ²	NR	NR	NR	1	<i>R. parkeri</i>
Cão 2	128	64	NR	NR	NR	NR	9	
Cão 3	256	256	NR	NR	NR	NR	9	
Cão 4	128	64	NR	NR	NR	NR	0	
Cão 5	256	64	NR	NR	NR	NR	0	<i>R. parkeri</i>
Equino 1	256	128	NR	NR	NR	NR	0	
Equino 2	128	64	NR	NR	NR	NR	0	
Equino 3	512	128	NR	NR	NR	NR	0	<i>R. parkeri</i>
Equino 4	256	128	NR	NR	NR	NR	0	
Equino 5	64	64	NR	NR	NR	NR	0	
Equino 6	128	128	NR	NR	NR	NR	0	
Equino 7	128	128	NR	NR	NR	NR	1	
Equino 8	128	256	NR	NR	NR	NR	1	
Equino 9	512	128	128	NR	NR	NR	1	<i>R. parkeri</i>
Equino 10	64	128	NR	NR	NR	NR	1	
Equino 11	128	64	NR	128	NR	NR	1	
Equino 12	64	128	128	NR	NR	NR	1	
Equino 13	512	64	NR	NR	NR	NR	1	<i>R. parkeri</i>
Equino 14	512	128	NR	NR	NR	NR	1	<i>R. parkeri</i>
Equino 15	64	64	NR	NR	NR	NR	1	
Equino 16	1024	256	128	NR	NR	NR	1	<i>R. parkeri</i>
Equino 17	64	128	NR	128	NR	NR	1	
Equino 18	256	256	NR	128	NR	NR	3	
Equino 19	128	64	NR	NR	NR	NR	5	
Equino 20	64	64	NR	NR	NR	NR	5	
Equino 21	128	64	NR	NR	NR	NR	6	
Equino 22	256	64	NR	NR	NR	NR	6	<i>R. parkeri</i>
Equino 23	64	64	NR	NR	NR	NR	6	
Equino 24	512	64	NR	NR	NR	NR	6	<i>R. parkeri</i>
Equino 25	1024	512	NR	NR	NR	NR	6	
Equino 26	128	64	NR	NR	NR	NR	6	
Equino 27	1024	256	NR	NR	NR	NR	6	<i>R. parkeri</i>
Equino 28	512	256	NR	NR	NR	NR	6	
Equino 29	512	64	NR	NR	NR	NR	6	<i>R. parkeri</i>
Equino 30	512	256	128	NR	NR	NR	6	
Equino 31	128	64	NR	NR	NR	NR	7	
Equino 32	256	256	NR	NR	NR	NR	ZU ³	
Equino 33	128	128	NR	NR	NR	NR	5	
Equino 34	64	128	NR	NR	NR	NR	5	
Humano 1	64	64	NR	NR	NR	NR	2	

¹PAH – Provável antígeno envolvido na reação homóloga (se um soro apresenta título a uma espécie de *Rickettsia* no mínimo quatro vezes maior que os títulos observados às demais espécies de *Rickettsia*, considera-se reação homóloga à primeira espécie de *Rickettsia*); ²NR = Soro não reagente à diluição 1/64 (ponto de corte); ³ZU Zona urbana.

Figura 8 – *R. parkeri* como provável antígeno envolvido na reação homóloga (PAH), em soros de equinos e cães, município de Paulicéia - Estado de São Paulo – 2008

Para os eqüinos com sorologia positiva para anticorpos anti-*Rickettsia*, o ponto 5 apresentou 67% de positividade e o ponto 6 apresentou 62,5%, respectivamente 10 e 11 km de distância do ponto zero (Tabela 9). Os pontos zero, 1, 3, 7 e a zona urbana apresentaram sorologia positiva menor que 50%, variando de 14,3 a 37,5%. Os pontos 2, 4, 8 e 9 e zona urbana não apresentaram eqüinos com sorologia positiva para anticorpos anti-*Rickettsia*, pois o soro proveniente da zona urbana pertencia a um animal originário do ponto zero.

Das amostras de cães com sorologia positiva para anticorpos anti-*Rickettsia*, o ponto 9 mostrou 50%, de positividade, o ponto 0 apresentou 17% e o ponto 1 apresentou 7%. As amostras dos pontos 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 não apresentaram cães com sorologia positiva para anticorpos anti-*Rickettsia* (Tabela 9).

Tabela 9 – Distâncias em quilômetros dos locais de coleta ao local de referência (ponto zero) e porcentagem de soros com anticorpos anti-*R. rickettsii* e anti-*R. parkeri*, para cães, equinos e humanos, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - fevereiro a março de 2008 e março de 2009

Local de coleta	Distância do Ponto zero (Km)	Sorologia <i>R. parkeri</i> e <i>R. rickettsii</i> (%)			Total
		Equinos	Cães	Humanos	
Zero	0	6/16 (37,5)	2/9 (22,0)	0/4 (0,0)	29
1	5	11/50 (22,0)	1/14 (7,0)	0/5 (0,0)	69
2	2	0/3 (0,0)	0/4 (0,0)	1/2 (50,0)	11
3	5	1/4 (25,0)	0/2 (0,0)	0/2 (0,0)	8
4	5	0/5 (0,0)	0/1 (0,0)	0/3 (0,0)	9
5	10	2/3 (67,0)	0/1 (0,0)	0/1 (0,0)	5
6	11	10/16 (62,5)	0/2 (0,0)	0/1 (0,0)	20
7	15	1/7 (14,3)	0 (0,0)	0/4 (0,0)	11
8	14,5	0/2 (0,0)	0/3 (0,0)	0/2 (0,0)	7
9	17	0/5 (0,0)	2/5 (40,0)	0/4 (0,0)	14
ZU¹	25	1/11 (9,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	11
Total		34/140 (24,0)	5/55 (7,7)	1/26 (4,0)	221

¹ZU: Zona urbana

4.5 Análise univariada dos questionários epidemiológicos dos equinos

Somente os dados epidemiológicos dos equinos foram analisados, pelo fato que a quantidade de cães positivos para RIFI não foi suficiente para análise estatística e a única amostra humana que apresentou anticorpos tinha títulos basais, não possibilitando a análise estatística dos fatores de risco para cães e humanos.

A tabelas 10 e 11 mostram os resultados da análise univariada da variável dependente: presença de anticorpos anti-*R. parkeri* no soro, quando comparada com as variáveis independentes. Todas as variáveis independentes apresentaram o valor de $p \leq 0,20$, sendo portanto selecionadas para a análise multivariada.

Tabela 10 – Análise da associação univariada das variáveis independentes quando comparadas com a variável dependente: presença de anticorpos anti-*R. parkeri* no soro de equinos – município de Paulicéia – estado de São Paulo - 2010

Variáveis independentes	Presença de anticorpos anti- <i>R. parkeri</i>			χ^2	P
	Total de amostras	Positivas	%		
Sexo					
Macho	98	21	21,42	2,222	0,143
Fêmea	42	14	33,33		
Idade					
≤10	75	11	14,66	9,199	0,003
≥10	65	24	39,92		
Tempo de residência na Região					
≤8,5	80	11	13,75	12,600	0,001
≥8,5	60	24	40		
Acesso à Mata					
Não	56	8	14,28	5,714	0,018
Sim	84	27	32,14		
Acesso à Várzea do rio Paraná					
Não	45	3	6,66	11,888	0,0001
Sim	95	32	33,68		

Tabela 11 – Análise da associação univariada da variável independente ponto de coleta, com a variável dependente: presença de anticorpos anti-*R. parkeri* no soro de equinos – município de Paulicéia – estado de São Paulo – 2010

Ponto de coleta	Presença de anticorpos anti- <i>R. parkeri</i>			χ^2	P
	Total de amostras	Positivas	%		
0	16	6	21,15	38,927	0,0001
1	52	11	0		
2	1	0	28,57		
3	7	2	0		
4	14	0	100		
5	4	4	66,66		
6	15	10	14,28		
7	7	1	0		
8	4	0	0		
9	9	0	9,09		
ZU¹	11	1	21,15		

¹ZU: zona urbana

4.6 Análise multivariada dos questionários epidemiológicos dos equinos

A tabela 12 demonstra o modelo final da análise de regressão logística, os respectivos valores de *odds ratio*, *p* e intervalo de confiança. Estas variáveis foram controladas pelo efeito ponto de coleta, para evitar confusão dos resultados entre animais do mesmo local.

Ocorreu associação estatisticamente significativa ($p < 0.05$) entre a presença de anticorpos anti-*R. parkeri* no soro de equinos e o fato do equino ter acesso à várzea do rio Paraná e o tempo maior que 8,5 anos de residência na região. Com este resultado, estas variáveis são consideradas fatores de risco para equinos se infectarem com *Rickettsia* do GFM no município de Paulicéia.

Tabela 12 – Regressão logística das variáveis independentes com a variável dependente: presença de anticorpos anti-*R. parkeri* no soro de equinos, município de Paulicéia - Estado de São Paulo - fevereiro a março de 2008 e março de 2009

Variável	Odds ratio	p	IC (95%)
Ponto de coleta	0,990	0,889	0,863 – 1,136
Acesso à Várzea do rio Paraná	4,799	0,018	1,315 – 17,513
Tempo de residência na Região	2,785	0,025	1,139 – 6,811

4.7 Captura de gambás (*Didelphis albiventris*)

Foram utilizadas 14 armadilhas “live trap” com iscas compostas por embutidos de carne suína defumada durante 5 dias.

No ponto 0 foi capturada uma fêmea da espécie *Didelphis albiventris*, apresentando três ninfas de carrapato do gênero *A. cajennense*, porém não foi possível a coleta de sangue.

No ponto 0 foi capturada uma fêmea (0G1) com 1 ninfa de *A. cajennense* e 3 ninfas de *A. coelebs*. No ponto 2 havia uma fêmea (2G1) com 3 ninfas de *A. cajennense*, 2 ninfas de *A. coelebs* e uma ninfa, que realizou a muda em laboratório, mostrando-se um exemplar adulto de *A. coelebs* macho. Também no ponto 2 foi capturado um macho (2G2), com 3 ninfas de *A. cajennense*, 3 ninfas de *A. coelebs* e uma ninfa, que realizou a muda em laboratório, tornando-se um exemplar adulto de *A. coelebs* fêmea. No ponto 4 foi coletado um indivíduo macho (4G1), com 4 ninfas de *A. cajennense* e 1 ninfa de *A. coelebs*. Todos estes carrapatos coletados (Tabela 13) foram negativos para a PCR com primers do gene *gltA* de *Rickettsia*.

Tabela 13 – Ectoparasitas coletados em gambás (*D. albiventris*), originários do município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009

Animal	Sexo	Espécie de ninfa		Total Ninfas
		<i>A. cajennense</i>	<i>A. coelebs</i>	
0G1	Fêmea	1	3	4
2G1	Fêmea	3	3	6
2G2	Macho	3	4	7
4G1	Macho	4	1	5
Total		11	11	22

Todos os gambás testados apresentaram anticorpos reativos a antígenos de *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. amblyommii* e *R. rhipicephalii* (Tabela 14). Como não ocorreu diferença de quatro títulos ou mais entre os antígenos testados, não foi possível apontar o provável antígeno homólogo.

Tabela 14 – Títulos das amostras positivas para RIFI de seis espécies de *Rickettsia*, em gambás (*D. albiventris*), originários do município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009

Soro	<i>R. parkeri</i>	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. amblyommii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. felis</i>	<i>R. rhipicephalii</i>
0G1	1024	256	512	NR	NR	256
2G1	128	128	1024	NR	NR	512
2G2	1024	1024	256	NR	NR	1024
4G1	64	64	128	NR	NR	64

4.8 Outros animais coletados acidentalmente nas armadilhas

Outras espécies de animais silvestres foram capturadas acidentalmente nas armadilhas (Figura 9), apresentando-se infectados por ectoparasitas (Tabela 15).

Tabela 15 – Ectoparasitas coletados em lagartos (*Tupinambis* spp) e pássaros Saia-castanha (*Laterallus viridis*), município de Paulicéia - Estado de São Paulo - setembro de 2009

Animal	<i>A. cajennense</i>	<i>A. triste</i>	<i>A. rotundatum</i>	Total
Pássaro 1	6	0	0	6
Lagarto 1	1	0	1	2
Pássaro 2	0	1	0	1
Lagarto 2	1	0	0	1
Total	8	1	1	10

Dois passeriformes jovens, da espécie Saña-castanha (*Laterallus viridis*), foram examinados. Um, coletado no ponto 0, apresentou 6 larvas de *A. cajennense* e o outro pássaro, coletado no ponto 7, tinha apenas uma larva que mudou para ninfa, identificada como *A. triste*. Também foram capturados dois exemplares jovens de lagarto Teiú (*Tupinambis* spp). O capturado no ponto 6 apresentou 1 larva de *A. rotundatum* (GenBank EU805569.1) e 1 larva de *A. cajennense* (GenBank FJ424404.1), além de 7 ácaros da família *Trombiculidae*. O lagarto coletado no ponto 7 apresentou uma larva de *A. cajennense* (GenBank FJ424404.1).

Todos os ectoparasitas coletados nestes animais foram negativos para o PCR para o gene *gltA* de *Rickettsia*.

Fonte: do autor

Figura 9 – Animais coletados acidentalmente nas armadilhas. **A** Saña-castanha (*Laterallus viridis*); **B**. Teiú (*Tupinambis* spp)

5 DISCUSSÃO

O encontro de maioria de carrapatos da espécie *A. cajennense*, era esperada para a região, pois existia uma grande frequência nos locais amostrados de equinos e por informações dos moradores e observação de uma carcaça de capivara em local de várzea, (dados não mostrados), indicando que os hospedeiros primários estão presentes, assim como pequenos mamíferos. Como todos os estágios de desenvolvimento desse carrapato foram encontrados, em sua maioria imaturos (62% de ninfas) pode-se afirmar que há a manutenção da população no local. A pouca representatividade de *R. B. microplus* e *D. nitens* provavelmente se dá pelo fato desses carrapatos terem um comportamento monoxeno, desenvolvendo todo o seu ciclo de vida em um único hospedeiro, com exceção da postura de ovos no solo. As larvas de *A. dubitatum* foram coletadas em local de várzea, habitat adequado ao seu hospedeiro primário a capivara.

Apesar do esforço de captura empregado, somente dois exemplares de *A. triste* foram coletados, sendo um em vida parasitária, em local distante do ponto zero, onde anteriormente se concentrava a maioria da população em 2005, com coleta de 31 exemplares adultos (SILVEIRA, 2007). É possível que seu hospedeiro primário (cervo-do-pantanal) esteja ausente ou em baixa densidade no local, por migração dos hospedeiros infestados para locais mais preservados, com menor ocupação humana, em virtude da diminuição drástica de seu habitat após a inundação da área para construção da usina hidrelétrica de Porto Primavera (SZABÓ et al., 2003). Em coleta realizada no ponto zero, em agosto de 2010, com o objetivo de encontrar novos exemplares de *A. triste* para reposição de colônia, foi observada a ausência de carrapatos, indicando uma mudança do panorama ecológico do local, em comparação com as coletas anteriores, em setembro de 2009.

Segundo Sinkock et al. (1997) a frequência parasitária de *A. triste* encontrada em capivaras (*H. hydrochaeris*) de vida livre no Brasil pode indicar adaptação a este roedor como hospedeiro de formas adultas, concordando com os resultados encontrados por Labruna et al. (2003). Há a hipótese da manutenção da população

de *A. triste* nas áreas pesquisadas em capivaras (*H. hydrochaeris*) substituindo o cervo-do-pantanal (*B. dichotomus*) como hospedeiro primário, cuja população foi drasticamente diminuída na região. Estudos realizados ainda na década de 1940, apontam a probabilidade de préas (*C. aperea*) e capivaras (*H. hydrochaeris*) serem amplificadores e mantenedores da *R. rickettsii*, mantendo assim o ciclo da bactéria na natureza e outras bactérias do GFM podem ter esta característica, inclusive a *R. parkeri* (TRAVASSOS; VALLEJO, 1942a,b).

Os carrapatos infectados com *R. parkeri*, relatados por Silveira et al. (2007), eram de uma população, aparentemente não antropofílica, restrita à um local de coleta, com baixa densidade populacional,. A hipótese da manutenção do ciclo silvestre deste agente nos hospedeiros naturais do *A. triste* na região: adultos em cervo-do-Pantanal e antas, imaturos em pequenos roedores e aves pode explicar a ausência de infecção por *R. parkeri* nos carrapatos do presente estudo, já que o próprio *A. triste* está praticamente ausente. A manutenção da *R. parkeri* pode estar em outros hospedeiros como antas que são parasitadas por *A. cajennense* os quais podem parasitar os animais domésticos. Sem a infecção dos vetores não dá pra afirmar se ainda há a manutenção da mesma na região. O achado de uma ave com comportamento forrageiro infestada com uma larva que foi capaz de mudar para ninfa, corrobora a hipótese de este ser um bom hospedeiro. para imaturos de *A. triste*.

A presença de anticorpos anti- *R. parkeri* nos soros dos animais, inclusive com indicação da *R. parkeri* como provável antígeno homólogo, mostra que ocorreu contato com vetor infectado. O uso da várzea do Rio Paraná pelos equinos foi considerado um fator de risco significativo para apresentar anticorpos anti-*R. parkeri*, e a suspeita é que seja o local de provável infecção para os equinos, que lá pastam ou guiam o gado e estão na região há mais de 8 anos. Os achados sorológicos indicam uma cicatriz sorológica, sem indicação da data que se deu o contato desse animais com o vetor.. Os cães soropositivos também eram dos mesmos pontos de coleta dos eqüinos soropositivos. De qualquer forma, esses resultados indicam que o uso da várzea para trabalho ou lazer é um risco para que humanos se infectem com *R. parkeri*, e possam sofrer a febre maculosa causada por *R. parkeri*.

As amostras de soro (24% das amostras de equinos e 7% de cães) foram reativas para, pelo menos, dois dos seis antígenos testados, com títulos altos e similares para *R. parkeri* e *R. rickettsii* (Tabela 8), porém baixos títulos para os

outros antígenos experimentados, indicando que há a circulação de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa no local. A exposição à *R. amblyommii* pode ser responsável pelos altos títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* do GMF, principalmente na sorologia dos gambás, já que estes se mostravam infestados por formas imaturas de *A. coelebs*, espécie encontrada infectada por *R. amblyommii* na região. De todas as formas, são necessárias mais pesquisas para avaliar a capacidade de infecção, transmissão e manutenção de *A. coelebs* por *R. amblyommii*.

O relato de lagartos infestados com *A. cajennense* é incomum, já que esse ectoparasita prefere animais homeotermos, porém como há grande população deste ectoparasita na vegetação, há grande chance de parasitismo oportunista.. O encontro de larvas de *A. rotundatum* está de acordo com a literatura.

CONCLUSÕES

- Há evidência de infecção por espécies de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa em cães, eqüinos e gambás da área rural de Paulicéia.
- Há evidências sorológicas de infecção por *R. parkeri* em cães e eqüinos da área rural de Paulicéia.
- Equinos que têm acesso à várzea do Rio Paraná em Paulicéia e que vivem há mais tempo na região apresentam maiores chances de se infectarem por rickettsias do grupo da febre maculosa, sobretudo por *R. parkeri*.
- Relata-se primeira vez o encontro de carrapatos *A. coelebs* infectados por *R. amblyommii* no Estado de São Paulo.

REFERÊNCIAS

AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; MARVULO, M. F. V.; SILVA, J.C.R.; PINTER, A.; VASCONCELLOS, S. A.; MORAIS, Z. M.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; GENNARI, S. M. Fatores de risco associados à ocorrência de anticorpos anti-*Leptospira* spp. em cães do município de Monte Negro, Rondônia, Amazônia Ocidental Brasileira. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 59, n. 1, p. 70-76, 2007.

ALMEIDA, R. F.C.; ANDREOTTI, R.; LABRUNA, M. B.; SILVEIRA, I.; MATOS, M. F. C. Ocorrência de anticorpos anti- *Rickettsia* spp em equinos no Mato Grosso do Sul. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010.

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

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S.; SILVA, L. J. Brazilian spotted fever: a case series from an endemic area in southeastern Brazil: clinical aspects. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.1078, p. 252-254, 2006

ANGERAMI, R. N.; NUNES, E. M.; NASCIMENTO, E. M. M.; FREITAS, A. R.; KEMP, B.; FELTRIN, A. F. C.; PACOLA, M. R.; PERECIN, G. E. C.; SINKOC, V ; RESENDE, M. R.; KATZ, G.; DA SILVA L. J. Clusters of Brazilian spotted fever in São Paulo State, southeastern Brazil. A review of official reports and the scientific literature. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 202-204, 2009a. Supplement, 2.

ANGERAMI, R. N.; MORAIS, E. O.; KATZ, G.; DA SILVA, L. J. Brazilian spotted fever in the paediatric age-segment in the State of São Paulo, southeastern Brazil, 2003–2006. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 205-206, 2009b. Supplement, 2.

ANGERAMI R. N.; DA SILVA, A. M. R.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S.; WADA, M. Y.; DOS SANTOS, F. C. P.; MANCINI, D. M.; DE OLIVEIRA, R. C.; KATZ, G.; MARTINS, E. C.; DA SILVA, L. J. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 202-204, 2009c. Supplement, 2.

ANHÃO, P. P. G. **O processo de interação social na inclusão escolar de crianças com Síndrome de Down em educação infantil**. 2009. 88 f. Dissertação (Mestrado em Saúde da Comunidade) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

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

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, n. 2, p. 115-130, 1961.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.

BARROS-BATTESSTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical**: um guia ilustrado para identificação das espécies. São Paulo; Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223 p.

BATISTA, F. G.; DA SILVA, D. M.; GREEN, K. T.; TEZZA, L. B. L.; DE VASCONCELOS, S. P.; CARVALHO, S. G. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B.; FORTES, F. S.; MOLENTO, M. B. Serological survey of *Rickettsia* sp. in horses and dogs in a non-endemic area in Brazil. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 205-209, 2010.

BELL, E. J.; PICKENS, E. G. A toxic substance associated with the *Rickettsias* of the spotted fever group. **Journal of Immunology**, v. 70, n. 5, p. 461-72, 1953

BILLETER, S. A.; BLANTON, H. L.; LITTLE, S. E.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. Detection of *Rickettsia amblyommii* in association with a tick bite rash. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 4, p. 607-610, 2007

BLAIR, P. J.; JIANG, J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; MENDOZA, L.; VILLASECA, P.; SUMNER, J. W.; RICHARDS, A. L.; OLSON, J. G. Characterization of spotted fever group rickettsiae in flea and tick specimens from northern Peru. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 11, p. 4961-4967, 2004.

BURGDORFER, W. Hemolymph test: a technique for detection of rickettsiae in ticks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 19, n. 6, p. 1010-1014, 1970.

CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493-1495, 2004.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V.; FIGUEIRA, F. C.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, n. 3, p. 495-501, 2006.

CHOMEKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **BioTechniques**, v. 153, n. 3, p. 532-537, 1993.

COHEN, S. B.; YABSLEY, M. J.; GARRISON, L. E.; FREYE, J. D.; DUNLAP, B. G.; DUNN, J. R.; MEAD, D. G.; JONES, T. F.; MONCAYO, A. C. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma americanum* ticks, Tennessee and Georgia, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 9, p. 1471-1473, 2009

CONTI-DÍAZ, I.; A RUBIO, I.; MOREIRA, E. S.; BÓRMIDA, G. P. Rickettsiosis cutáneo ganglionar por *Rickettsia conorii* en el Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, n. 5, p. 313-318, 1990.

CONTI DÍAZ, I. A. Rickettsiosis por *Rickettsia conorii* (fiebre botonosa del Mediterráneo o fiebre de Marsella). Estado actual en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, v. 17, p. 199-124, 2001a.

CONTI-DÍAZ, I. A. Enfermedades emergentes y reemergentes en Uruguay. **Revista Médica del Uruguay**, v. 17, n. 2, p. 180-199, 2001b.

CONTI-DÍAZ, I. A. Rickettsiosis caused by *Rickettsia conorii* in Uruguay. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 990, p. 264-266, 2003.

CONTI-DÍAZ, I. A.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as the etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 51, n. 6, p. 337-339, 2009.

CORDEIRO, M. D.; SOUZA, C. E.; SOUZA, M. M. S.; FONSECA, A. H. Detecção de anticorpos contra rickettsias do grupo da febre maculosa em equinos na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010a.

CORDEIRO, M. D.; SOUZA, C.E.; VALIM, J.R.A.; SOUZA, M.M.S.; FONSECA, A. H. Detecção de anticorpos contra *Rickettsias* do grupo da febre maculosa em cães errantes na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010b.

CRAGUN, W. C.; BARTLETT, B. L.; ELLIS, M. W.; HOOVER, A. Z.; TYRING, S. K.; MENDOZA, N.; VENTO, T. J.; NICHOLSON, W. L.; EREMEEVA, M. E.; OLANO, J. P.; RAPINI, R. P.; PADDOCK, C. D. The expanding spectrum of eschar-associated rickettsioses in the United States. **Archives of Dermatology**, v. 146, n.6, p. 641-648, 2010

DEL FIOLE, F.; JUNQUEIRA, F. M.; DA ROCHA, M. C.; DE TOLEDO, M. I.; FILHO, S. B. A Febre Maculosa no Brasil. **Revista Panameña Salud Publica**, v. 27, n. 6, p.461-466, 2010

DEMMA, J. L.; TRAEGER, M. S.; Rocky Mountain Spotted Fever from an unexpected tick vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 587-594, 2005.

DIAS, M. E.; MARTINS, A. V.; DOMINGOS, J. R. Tífo Exantemático no Oeste de Minas Gerais. **Brasil-Médico**, v. 51, n. 24, p. 651-655, 1937.

DUMLER, J. S.; WALKER, D. H. Rocky Mountain spotted fever – changing ecology and persisting virulence. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 51-553, 2005.

DURDEN, L. A.; CUNNINGHAM, M. W.; MCBRIDE, R.; FERREE, B. Ectoparasites of free-ranging pumas and jaguars in the Paraguayan Chaco. **Veterinary Parasitology**, v.137, n. 1-2, p. 189-193, 2006.

falta sobrenome dos autor E. J.; LINHARES, A. X. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 68-71, 2006.

ELLISON, D. W.; CLARK, T. R.; STURDEVANT, D. E.; VIRTANEVA, K.; PORCELLA, S. F.; HACKSTADT, T. Comparison of virulent *Rickettsia rickettsii* Sheila Smith and avirulent *Rickettsia rickettsii* Iowa. **Infection and Immunology**, v. 76, n. 2, p. 542–550 2008.

EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; SILVERMAN, D. J. Evaluation of a PCR assay for quantitation of *Rickettsia rickettsii* and closely related spotted fever group Rickettsiae. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5466-5472, 2003.

EREMEEVA, M. E.; KARPATY, S. E.; LEVIN, M. L.; CABALLERO, C. M.; BERMUDEZ, S.; DASCH, G. A.; MOTTA, J. A. Spotted fever rickettsiae, Ehrlichia and Anaplasma, in ticks from peridomestic environments in Panama. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, s. 2, p. 12-14, 2009

ESPEJO-ARENAS, E.; RAOULT, D. First isolates of *Rickettsia conorii* in Spain using a centrifugation-shell vial assay. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 159, n. 6, p. 1158-1159, 1989.

ESTRADA, D. A.; SCHUMAKER, T. T. S.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES NETO, E. J.; LINHARES, A. X. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* ticks (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 68-71, 2006.

ESTRADA-PENÑA; A.; VENZAL; J. M.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma dubitatum* Neumann: description of nymph and redescription of adults, together with the description of the immature stage of *A. triste* Koch. **Acarologia**, v. 17, n. 4, p. 323-333, 2002

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari: Ixodidae) of Brazil, their hosts and geographic distribution -1. The State of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

FENG, HUI-MIN; WALKER, D. H. Cross-protection between distantly related spotted fever group rickettsiae. **Vaccine**, n. 21, p. 3901-3905, 2003.

FIGUEIREDO, L. T. M.; BADRA, S. J.; PEREIRA, L. E.; SZABÓ, M. P. J. Report on ticks collected in the southeast and mid-west regions of Brasil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 6, p. 613-619, 1999.

FORTES, F. S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE, R. V.; BONACIM, J. E.; BIONDO, A. W.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M.B. Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 222-227, 2010.

FOURNIER, P. E.; ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of spotted fever group rickettsiae by study of the outer surface protein *rOmpA*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 48, p. 839-849, 1998.

FOURNIER, P. E.; DUMLER, J. S.; GREUB, G.; ZHANG, J.; WU, Y.; RAOULT, D. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 12, p. 5456-5465, 2003.

FREIRE, J. J. Fauna parasitária riograndense. **Revista da Faculdade de Agronomia e Veterinária (RS)**, v. 9, p. 111-149, 1967/1968.

FREITAS, M. C. D. O.; GRYCAJUK, M.; MOLENTO, M. B.; J. B.; LABRUNA, M.B.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; DECONTO, I.; BIONDO, A. W. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 2, p. 130-131, 2010

FUENTES, L. Ecological study of Rocky Mountain Spotted Fever in Costa Rica. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 1, p. 192-196, 1986.

GALVÃO, M. A. M.; DUMLER, S.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B. CHAMONE, C. B.; FILHO, C. G.; OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Fatal spotted fever rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1402-1405, 2003.

GALVÃO, M. A.; ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; ZAVALA-CASTRO, J. E.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in the Americas. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1078, p. 156-158, 2006

GALVÃO, M. A.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M.; CALIC, S. B.; SOUSA, R.; BACELLAR, F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurrence, distribution and diagnosis. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 5, p. 850-856, 2005

GARCÍA-GARCÍA, J. C.; PORTILLO, A.; NÚÑEZ, M. J.; SANTIBÁÑEZ, S.; CASTRO, B.; OTEO, J. A. A patient from Argentina infected with *Rickettsia massiliae*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 82, n. 4, p. 691-692, 2010

GEHRKE, F. S.; GAZETA, G. S.; SOUZA, E. R.; MARRELLI, M.; SCHUMAKER, T. T. S. *Rickettsia rickettsii* em cavalos e cães residentes em focos de febre maculosa do município de Barra do Piraí do estado do Rio de Janeiro. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010.

GIMÉNEZ, D. F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v. 39, p. 135-140, 1964.

GODDARD, J.; NORMENT, B. R. Spotted fever group rickettsiae in the Lone Star tick *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 23, n. 5, p. 465-472, 1986.

GODDARD, J. Experimental infection of Lone Star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 686-689, 2003.

GODDARD, J. PADDOCK, C. D. Observations on distribution and sazonal activity of the Gulf Coast tick in Mississippi. **Journal of Medical Entomology**, v. 42, n. 2, p. 176-179, 2005.

GORDON, J. C.; GORDON, S. W.; PETERSON, E.; PHILIP, R. N. Epidemiology of rocky Mountain Fever in Ohio, 1981: Serologic evaluation of canines and rickettsial isolation from ticks associated with human case exposure sites. **Americal Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 33, n. 5, p.1026-1031, 1984.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. **Guia de vigilância epidemiológica/Ministério da Saúde**. 440p. il. 8^a ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2010.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C. A.; 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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 8, p. 841-845, 2005

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; HADANI A. *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 em la Argentina. Su diagnóstico errôneo como *Amblyomma maculatum* y su distribución geográfica. **Gaceta Veterinária**, v. 45, n. 367, p. 57-63, 1982.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L. BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VANZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZALES-ALCUÑA, D. ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, p. 83-100, 2006.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

HIDALGO, M.; MIRANDA, J.; HEREDIA, D.; ZAMBRANO, P.; VESGA, J. F.; LIZARAZO, D.; MATTAR, S.; VALBUENA, G. Outbreak of Rocky Mountain spotted fever in Córdoba, Colombia. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.106, n.1, p.117-118, 2011

HORTA, M. C.; LABRUNA, M.B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. 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. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

HORTA, M. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 321-325, 2005.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; SCHUMAKER, T. T.; LABRUNA, M. B. Natural infection, transovarial transmission and transtadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1078, p. 285-290, 2006.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 793-801, 2007.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. 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, n. 1, p. 109-117, 2009.

HORTA, M. C.; SABATINI, G. S.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; CANAL, R. B.; PACHECO, R. C.; MARTINS, T. F.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of the Opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 959-967, 2010.

HORTA, M. C.; SCOTT, F. B.; CORREIA, T. R.; FERNANDES, J. I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* infection in cat fleas *Ctenocephalides felis felis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 3, p. 813-818, 2010.

IBGE. **Cidades @**: Paulicéia. 2010. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/cidadesat/topwindow.htm?1>>. Acesso em: 02 nov. 2010.

IVANCOVICH, J. C. Reclasificación de algunas especies de garrapatas del género "*Amblyomma*" (Ixodidae) en la Argentina. **Revista de Investigaciones Agropecuarias**, v. 15, n. 4, p. 673-682, 1980.

KELLY, P. J.; RAOULT, D.; MASON, P. R. Isolation of spotted fever group rickettsias from triturated ticks using a modification of the centrifugation-shell vial technique. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 3, p. 397-398, 1991.

KNIGHT, J. C. Observations on potential ticks vectors of human disease in the Cerrado region of Central Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 25, n. 2, p. 145-146, 1992.

KOCH, C. L. Systematische Uebersicht uber die Ordnung der Zecken **Archiv fur naturgeschichte**, v. 1, p. 217-239, 1844.

KOHL, G. M. Concerning the identity of *Amblyomma maculatum*, *A. trigrinum*, *A. triste*, and *A. ovatum* of Koch, 1844 (ACARINA: IXODIDAE). **Proctor Entomology Society Wash**, v. 58, n. 3, p. 143-147, 1956.

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; DE WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, n. 1, p. 1-14, 2001a.

LABRUNA, M. B.; SOUZA, S. L. P.; GUIMARÃES JR, J. S.; PACHECO, R. C.; PINTER, A.; GENNARI, S. M. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 5, p. 553-556, 2001b.

LABRUNA, M. B.; DE PAULA, C. D.; LIMA, T. F.; SANA, D. A. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild animals from the Porto-Primavera hydroelectric power station area, Brazil. **Memorias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1133-1136, 2002.

LABRUNA, M. B.; FUGISAKI, E. Y. M.; PINTER, A.; DUARTE, J. M. B.; SZABÓ, M. J. P. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, n. 4, p. 305-316, 2003.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n.1, p. 90-98, 2004a.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 6, p.1073-1081, 2004b.

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

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

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, western Amazon, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 7, n. 2, p. 249-255, 2007a.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MORAES FILHO, J.; LEPE, P.; GALLEGOS, J. L.; LÓPEZ, J. *Rickettsia felis* in Chile. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 11, 1794-1795, 2007b.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; NAVA, S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; GUGLIELMONE, A. A. Isolation of *Rickettsia rhipicephallii* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869-873, 2007c.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of larval stages of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1166, p.156-166, 2009a

LABRUNA, M. B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. **Emerging Infectious Disease**, v. 15, n. 3, p. 458-460, 2009b

LABRUNA, M. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A. Notes on Population Dynamics of *Amblyomma* Ticks (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 95, n. 4, p. 1016-1018, 2009c

LABRUNA, M. B.; ONOFRIO, V. C.; BEATI, L.; ARZUA, M.; BERTOLA, P.B.; RIBEIRO, A. F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Redescription of the female, description of the male, and several new records of *Amblyomma parkeri* (Acari: Ixodidae), a South American tick species. **Experimental Applied Acarology**, v. 49, n. 3, p. 243-260, 2009

LABRUNA, M. B.; BARBIERI, F. S.; MARTINS, T. F.; BRITO, L. G.; RIBEIRO, F. D. New tick records in Rondônia, Western Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 3, p.192-194, 2010.

LACKMAN, D. B.; PARKER, R. R.; GERLOFF, R. K. Serological characteristics of a pathogenic *Rickettsia* occurring in *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 64, n. 43, p. 1342-1349, 1949.

LACKMAN, D.; BELL, E. J.; STONNER, H. G.; PICKENS, E. G. The Rocky Mountain spotted fever group of *Rickettsias*. **Health Laboratory Science**, v. 2, n. 3, p. 138-141, 1965.

LAMAS, C.; FAVACHO, A.; ROZENTAL, T.; BÓIA, M. N.; KIRSTEN, A. H.; GUTERRES, A.; BARREIRA, J.; DE LEMOS, E. R. Characterization of *Rickettsia rickettsii* in a case of fatal Brazilian spotted fever in the city of Rio de Janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12, n. 2, p. 149-51, 2008

LEMOS, E. R. S.; MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted fever rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 273-275, 1996.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; PIRES, F. D. A.; MACHADO, S. L.; COSTA, L. M. C.; COURA, J. R. *Rickettsiae*-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 4, p. 477-481, 1997a.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; SERRA-FREIRE, N. M.; AMORIM, M.; GAZETA, G. S. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo,

Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 181-185, 1997b.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; GUIMARÃES, M. A. A.; COURA, J. R. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p.329-334, 2001.

LIMA, V. L. C.; SOUZA, S. S. L.; DE SOUSA, C. E.; VILELA, M. F. G.; PAPAORDANOU, P. M. O.; DEL GUÉRCIO, V. M. F. ROCHA, M. M. M. Situação da febre maculosa na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 331-334, 2003.

MADEIRA, A.; WEISBRICH, J. Surto de febre maculosa no Estado de Santa Catarina. In: CONGRESSO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA E I SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 8., 2004, Ouro Preto. **Anais...** Ouro Preto: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2004.

MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever *Rickettsia* in blood culture. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 2, p. 197-199, 1989.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brasil: descriptions, redscriptions and identification key. **Ticks and Tick-Bourne Diseases**, n. 1, p. 75-99, 2010.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; MOURA, A. B.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; LABRUNA, M. B. Detecção de *Rickettsia* spp. em Ixodídeos no estado de Santa Catarina, Brasil. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010.

MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; SILVA, M. V. Febre Maculosa: isolamento de *Rickettsia* em amostra de biópsia de pele. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, n. 1, p. 37-41, 1992.

MELO, A. L. T.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Soro-ocorrência de *Rickettsia* spp. e presença de carrapatos em cães de Corumbá, região do pantanal sul-matogrossense. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 16., 2010, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2010.

MERTEN, H. A.; DURDEN, L. A. A state-by-state survey of ticks recorded from humans in the United States. **Journal of Vector Ecology**, v. 25, n.1, p. 102-13, 2000.

MILAGRES, B. S.; PADILHA, A. F.; BARCELOS, R. M.; GOMES, G. G.; MONTANDON, C. E.; PENA, D. C.; NIERI BASTOS, F. A.; SILVEIRA, I.; PACHECO, R.; LABRUNA, M.

B.; BOUYER, D. H.; FREITAS, R. N.; WALKER, D. H.; MAFRA, C. L.; GALVAO, M. A. Rickettsia in Synanthropic and Domestic Animals and Their Hosts from Two Areas of Low Endemicity for Brazilian Spotted Fever in the Eastern Region of Minas Gerais, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 6, p. 1305-1307, 2010.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R. C.; GUTMANN, T. B.; BARBOSA, S. O.; GONZÁLES, M. A. R. M.; MURARO, M. A.; CECÍLIO, S. R. M.; LABRUNA, M. B. New Epidemiological Data on Brazilian Spotted Fever in an Endemic Area of the State of São Paulo, Brazil. **Vector Borne Zoonotic Disease**, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2009.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Tífo Exantemático em Minas Gerais. **Brasil-Médico**, v. 49, n. 21, p. 465-470, 1935.

MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Tífo Exantemático de Minas Gerais (8ª comunicação). **Brasil-Médico**, v. 51, n. 21, p. 583-584, 1937.

NASCIMENTO, E. M.; COLOMBO, S.; NAGASSE-SUGAHARA, T. K.; ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; DA SILVA, L. J.; KATZ, G.; DOS SANTOS, F. C. P. Evaluation of Evaluation of PCR-based assay in human serum samples for diagnosis of fatal cases of spotted fever group rickettsiosis. **Clinical Microbiology and Infectious**, v. 15, p. 232-234, 2009. Supplement, 2.

NAVA, S.; ELSHENAWY, Y.; EREMEEVA, M. E.; SUMNER, J. W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK, C. D. Rickettsia parkeri in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, n. 12, p.1894-1897, 2008

NICHOLSON, W. L.; MASTERS, E.; WORMSER, G. P. Preliminary serologic investigation of '*Rickettsia amblyommii*' in the aetiology of Southern tick associated rash illness (STARI) **Clinical Microbiology and Infectious**, v. 15, n. 2, p. 235–236, 2009

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in an Atlantic forest area in the state of São Paulo, Brazil, with isolation of rickettsia from the tick Amblyomma longirostre. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 4, p. 770-774, 2008.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in Amblyomma nodosum ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals Tropical Medicine Parasitology**, v. 103, n. 5, p. 413-425, 2009.

OLIVEIRA, R. P.; GALVÃO, M. A.; MAFRA, C. L.; CHAMONE, C. B.; CALIC, S. B.; SILVA, S. U.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 3, p. 317-319, Mar. 2002.

OLIVEIRA, K. A.; PINTER, A.; MEDINA-SANCHEZ, A.; BOPPANA, V. D.; WIKEL, S. K.; SAITO, T. B.; SHELITE, T.; BLANTON, L.; POPOV, V.; TEEL, P. D.; WALKER, D. H.;

GALVAO, M. A.; MAFRA, C.; BOUYER, D. H. *Amblyomma imitator* ticks as vectors of *Rickettsia rickettsii*, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 8, p. 1282-1284, 2010.

OTOMURA, F. H.; SANGIONI, L.A.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M. B.; GALHARDO, J. A.; RIBEIRO, M. G.; TEODORO, U. Anticorpos anti-rickettsias do grupo da febre maculosa em equídeos e caninos no norte do Estado do Paraná, Brasil. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 62, n. 3, p. 761-764, 2010.

PACHECO, R. C.; VENZAL, J. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 11, p. 1804-1805, 2006.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; NAVA, S.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Detection of a novel spotted fever group rickettsia in *Amblyomma parvum* ticks (Acari: Ixodidae) from Argentina. **Experimental Applied Acarology**, v. 43, p. 63-71, 2007

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Sao Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomedica**. v. 27, n. 3, p. 364-371, 2007.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; DE SOUZA, S. S. A. L.; DE SOUZA, C. E.; SZABÓ, M.P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. **Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, 2009.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. 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 Epidemiology**, v. 2010

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLCSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. A.; OHL, C.A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004.

PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* as a paradigm for multiple causes of tick-borne spotted fever in the western hemisphere. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1063, p. 315-326, 2005.

PADDOCK, C. D.; FINLEY, R. W.; WRIGHT, C. S.; ROBINSON, H. N.; SCHRODT, B. J.; LANE, C. C.; EKENNA, O.; BLASS, M. A.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A.; MCLELLAN, S. L.; GODDARD, J.; HOLMAN, R. C.; OPENSHAW, J. J.; SUMNER, J. W.; ZAKI, S. R.; EREMEEVA, M. E. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis and its clinical

distinction from Rocky Mountain spotted fever **Clinical Infectious Diseases**, v.47, n. 9, p. 1188-1196, 2008a

PADDOCK, C. D.; FERNANDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMNER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKI, S. R.; REMONDEGUI, C. E. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 4, p. 687–692, 2008b

PADDOCK, C. D.; FOURNIER, P.-E.; SUMNER, J. W.; GODDARD, J.; ELSHENAWY, Y.; METCALF, M. G.; LOFTIS, A. D.; VARELA-STOKES, A. Isolation of *Rickettsia parkeri* and identification of a novel Spotted Fever Group *Rickettsia* sp. from Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) in the United States. **Applied and Environmental Microbiology**, v.76, n. 9, p. 2689-2695, 2010

PARKER, R. R.; KOHLS, G. M.; COX, G. W.; DAVIS, G. E. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**, v. 54, n. 32, p. 1482-1484, 1939.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; ROULT, D. Tick- and flea- borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, v. 36, p. 469-492, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

PENA, D. C.H.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; LABRUNA, M. B.; MILAGRES, B. S.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. M. Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. **Clinical Microbiology Infectious**, v. 15, p. 243-244, 2009. Supplement, 2.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; Klafke, G. M. ***Rhipicephalus (B) microplus: biologia, controle e resistência***. São Paulo: MedVet, 2008. 169 p.

PÉREZ-OSORIO, C. E. C. E.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; LEÓN, J. J. A.; ZAVALA-CASTRO, J. E. *Rickettsia felis* as Emergent Global Threat for Humans. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1019-1023, 2008.

PÉTER, O.; RAOULT, D.; GILOT, B. Isolation by a sensitive centrifugation cell culture system of 52 strains of spotted fever group rickettsiae from ticks collected in France. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 28, n. 7, p. 1597-1599, 1990.

PHILIP, C. B.; WHITE, J. S. Disease agents recovered incidental to a tick survey of the Mississippi Gulf Coast. **Journal of Economic Entomology**, v. 48, n. 4, p. 396-400, 1955.

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, 2006.

PINTER, A. S.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 2, p. 247-252, 2008.

PIRANDA, E. M.; CANÇADO, P. H.; RAIA, V. A.; DE ALMEIDA, T. K.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** v. 103, n. 7, p. 696-701, 2008.

PIZA, J. T.; Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o Tifo Exantemático de São Paulo. In: PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; SALLES GOMES, L. **Tifo Exantemático de São Paulo**. São Paulo. Sociedade Impressora Paulista. p. 11-119, 1932

PORNWIROON, W.; BOURCHOOKARN, A.; PADDOCK, C. D.; MACALUSO, K. R. Proteomic Analysis of *Rickettsia parkeri* Strain Portsmouth. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 12, p. 5262-5271, 2009 □

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Review**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997

RAOULT, D. A new rickettsial disease in the United States **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 812-813, 2004.

RAOULT, D.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* infection and other spotted fevers in the United States. **New English Journal of Medicine**, v. 353, n. 6, p. 626-627, 2005

RAOULT, D. Emerging rickettsioses reach the United States **Clinical Infectious Diseases**, v. 51, n. 1, p. 121-122, 2010.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsiosis as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

RIPOLL, C. M.; REMONDEGUI, C. E.; ORDONEZ, G.; ARAZAMENDI, R.; FUSARO, H.; HYMAN, M. J.; PADDOCK, C. D.; ZAKI, S. R.; OLSON, J. G.; SANTOS-BUCH, C. A. Evidence of Rickettsial Spotted Fever and Ehrlichial Infection in a Subtropical Territory of Jujuy, Argentina. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n. 2, p. 350-354, 1999.

ROLAIN, J.; JENSENIUS, M.; RAOULT, D. Rickettsial Infection – a threat to travellers. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 17, p. 433-437, 2004.

ROUX, V.; FOUNIER, P. E.; RAOULT, D. Differentiation of spotted fever group Rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA of the gene encoding the protein rOmpA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 8, p. 2058-2065, 1996.

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

ROUX, V.; RYDKYNA, E.; EREMEEVA, M.; RAOULT, D. Citrate synthase gene comparison, a new tool for phylogenetic analysis, and its application for the Rickettsiae. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, n. 2, p. 252-261, 1997.

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIN, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E. R. S. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brasil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 3, p. 155-158, 2002.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their Rickettsia in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010

SAMPAIO, I.; CARBELLO, M.; PARIETTI, S. Comprobación de la presencia de *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) en Uruguay. **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay**, v. 7, p. 75-76, 1992.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F. VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SCOLES, G. A. Phylogenetic analysis of the Francisella-like endosymbionts of Dermacentor ticks **Journal of Medical Entomology**, v. 41, n. 3, p. 277-286, 2004.

SEIJO, A.; PICOLLO, M.; NICHOLSON, W.; PADDOCK, C. Fiebre Manchada por *Rickettsias* en el Delta del Parana, una enfermedad emergente. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 67, n. 6/2, p. 723-726, 2007.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGART, B. C.; DUMLER, S.; WALKER, D. H.; PECANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian Spotted Fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n. 2, p. 222-226, 1993

SEKEYOVA, Z.; ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogeny of *Rickettsia* spp. Inferred by comparing sequences of 'gene D'; which encodes an intracytoplasmatic protein.

International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, v. 51, p. 1353-1360, 2001

SILVA, L. J.; PAPAIOORDANOU, P. M. Murine (endemic) typhus in Brazil: case report and review. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 46, n. 5, p. 283-285, 2004

SILVA, M.E.; RIBEIRO, R. R.; COSTA, J. O.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B. Prevalência de anticorpos anti-Rickettsia spp. em cães da cidade de Belo Horizonte, MG. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 1007-1010, 2010.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A.; FAVACHO, A. R.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; DE LEMOS, E. R.; KO, A. I. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 275-278, 2011.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P.J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsia parkeri in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 7, p. 1111-1113, 2007

SINKOCK, A. L. ; BRUM, J. G. W.; MÜLLER, G.; BEGROW, A.; PAULSEN, R. M. M. Ocorrência de Ixodidae parasitos de capivara (*Hydrocoerus hydrochaeris* Linnaeus 1766) na estação ecológica do Taim, Rio Grande – RS. **Ciência Rural**, v. 27, n. 1, p. 119-122, 1997.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 6, n. 1/2, p. 116-121, 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. G.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n.3, p. 521-523, 2010.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; PINHEIRO, S. R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. Survey for Tick-Borne Zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeast Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 1, n. 83, p. 201-206, 2010.

SUMNER, J. W.; DURDEN, L. A.; GODDARD, J.; STROMDAHL, E. Y.; CLARK, K. L.; REEVES, W. K.; PADDOCK, C. D. Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) and *Rickettsia parkeri*, United States. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n. 5, p. 751-753, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C.; DUARTE, J. M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild Marsh-Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil: infestations before and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 3, p. 268-264, 2003.

SZABÓ, M. P. J.; CASTRO, M. B.; RAMOS, H. G. C.; GARCIA, M. V.; CASTAGNOLLI, K. C.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; DUARTE, J. M. B.; LABRUNA, M. B. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, p. 147-154, 2007.

TAMEKUNI, K.; TOLEDO, R. S.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; PACHECO, R. C.; CAVICCHIOLI, J. H.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Serosurvey of antibodies against spotted fever group Rickettsia spp. in horse farms in Northern Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 259-261, 2010.

TOLESANO-PASCOLI, G. V.; TORGA, K.; FRANCHIN, A. G.; OGRZEWALSKA, M.; GERARDI, M.; OLEGÁRIO, M. M.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P.; JÚNIOR, O. M. Ticks on birds in a forest fragment of Brazilian cerrado (savanna) in the municipality of Uberlândia, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 19, n. 4, p. 244-248, 2010.

TOMASSONE, L.; CONTE, V.; PARRILLA, G.; DE MENEGHI, D. *Rickettsia* Infection in Dogs and *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* Ticks, Cochabamba Department, Bolivia. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 953-958, 2010.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, 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. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 15, p. 73-86, 1942a.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Possibilidade de *Amblyomma cajenense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* Experimentalmente Inoculado com o vírus da Febre Maculosa. **Memórias do Instituto Butantan**, Tomo 15, p. 87-90, 1942b.

TROUT, R.; STEELMAN, C. D.; SZALANSKI, A. L.; WILLIAMSON, P. C. Rickettsiae in Gulf Coast ticks, Arkansas, USA. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 5, p. 830-832, 2010.

VENZAL, J. M. . CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; SOUZA, C. G.; GUGLIELMONE, A. A. Garrapatas de importancia médica y veterinaria em Uruguay. **Entomologia y Vectores**, v. 10, n. 4, p. 635-650, 2003a

VENZAL, J. M.; GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABRERA, P. A.; CASTRO, O. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasiting humans in Uruguay. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, n. 7, p. 769-772, 2003b.

- VENZAL, J. M. Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. **Veterinaria (Montevideo)**, v. 38, n. 150-151, p. 17-28, 2003c.
- VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p.1493-1495, 2004.
- VENZAL, J. M.; FÉLIX, M. L.; OLMOS, A.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. A collection of ticks (Ixodidae) from wild birds in Uruguay. **Experimental Applied Acarology**, n. 36, p. 325-331, 2005.
- VENZAL, J. M.; PÉREZ-MARTINEZ, L.; FÉLIX, M. L.; PORTILLO, A.; BLANCO, J. R.; OTEO, J. A. Prevalence of *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides felis* and *Ctenocephalides canis* from Uruguay. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1078, p. 305-308, 2006.
- VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; DE SOUZA, C. G.; FÉLIX, M. L.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts and seasonality of the vector of *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 155, n. 1-2, p.104-109, 2008
- VIANNA, M. C. B.; VIANNA, M. C.; HORTA, M. C.; SANGIONI, L. A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; MAFRA, C. L.; GALVÃO, M. A.; LABRUNA, M. B.; GENNARI, S. M. Rickettsial spotted fever in capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 50, n. 5, p. 297-301, 2008.
- WALKER, D. H. (Ed.). *Rickettsia rickettsii*: as virulente as ever. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, n. 5, p. 448-449, 2002.
- WATT, G.; PAROLA, P.; Scrub typhus and tropical rickettsioses. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, p. 429-436, 2003.
- WHITMAN, T. J.; RICHARDS, A. L.; PADDOCK, C. D.; TAMMINGA, C. L.; SNIEZEK, P. J.; JIANG, J.; BYERS, D. K.; SANDERS, J. W. *Rickettsia parkeri* infection after tick bite, Virginia. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n. 2, p. 334-336, 2007.
- ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E; SÁNCHEZ-ELIAS, R. A.; BECERRA-CARMONA, G.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis* rickettsioses in Yucatán. **The Lancet**, v. 356, n. 9235, p. 1079-1080, 2000.

APÊNDICE A
QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO – HUMANOS

Ponto nº _____

Fazenda: _____

Proprietário: _____

Município: _____

Nome: _____

Sexo: _____

Idade: _____

Tempo de residência na região: _____

Tempo em casa: _____

Tempo na mata: _____

Tempo na várzea: _____

Parasitismo: _____

Frequência: _____

Último caso: _____

Presença de capivara: _____

Presença de cervídeo: _____

Presença “tache noir”: _____

Sintomas compatíveis com riquetsiose: _____

Amostra nº: _____

Volume coletado: _____

Alíquotas: _____

OBS: _____

APÊNDICE B**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO – EQUINOS**

Ponto nº _____

Fazenda: _____

Proprietário _____

Município: _____

Nome: _____

Sexo: _____

Descrição: _____

Marcação: _____

Idade: _____

Tempo de residência na região: _____

Tempo em casa: _____

Tempo na mata: _____

Tempo na várzea: _____

Parasitismo: _____

Frequência: _____

Último caso: _____

Presença de capivara: _____

Presença de cervídeo: _____

Amostra nº: _____

Foto nº: _____

Volume coletado: _____

Alíquotas: _____

OBS: _____

APÊNDICE C**QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO – CÃES**

Ponto nº _____

Fazenda: _____

Proprietário _____

Nome: _____

Sexo: _____

Descrição: _____

Idade conhecida: _____

Tempo na propriedade/região: _____

Tempo em casa: _____

Tempo na mata: _____

Tempo na várzea: _____

Parasitismo: _____

Freqüência: _____

Último caso: _____

Presença de capivara: _____

Presença de cervídeo: _____

Amostra nº: _____

Foto nº: _____

Volume coletado: _____

Alíquotas: _____

OBS: _____

APÊNDICE D
QUESTIONÁRIO EPIDEMIOLÓGICO – GAMBÁS

Ponto nº _____

Fazenda: _____

Proprietário _____

Presença de capivara: _____

Presença de cervídeo: _____

Espécie: _____

Sexo: _____

Marcação: _____

Idade presumida: _____

Ectoparasitas: _____

Quantidade: _____

Amostra nº: _____

Foto nº: _____

Volume coletado: _____

Alíquotas: _____

OBS: _____

APÊNDICE E

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E SAÚDE ANIMAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal

1. NOME DO PACIENTE:.....

IDENTIFICAÇÃO :

SEXO : .M ? F ?

IDADE:/...../.....

DESCRIÇÃO:.....

2. RESPONSÁVEL LEGAL

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M ? F ?

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO: Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE: Paulicéia - SP

CEP: TELEFONE: DDD (.....).....

II - Dados Sobre a Pesquisa Científica

1. TÍTULO DA PESQUISA: Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, eqüinos, gambás (*Didelphis* spp) e carrapatos do gênero *Amblyomma* spp no município de Paulicéia, Estado de São Paulo.

PESQUISADOR: Iara Silveira

CARGO/FUNÇÃO: Médica Veterinária

INSCRIÇÃO CRMV Nº: 14.201

UNIDADE FMVZ/USP: Laboratório de Doenças Parasitárias

CONTATO DO LABORATÓRIO DA PESQUISA: (0**11) 3091-1446/3091-1403

2 AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO **X**

RISCO MÍNIMO ?

RISCO MÉDIO ?

RISCO BAIXO ?

RISCO MAIOR ?

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : quatro anos

III - Registro das Explicações do Pesquisador ao Paciente ou seu Representante Legal Sobre a Pesquisa:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: Como foi encontrada uma população de carrapato infectada com bactéria *Rickettsia parkeri* é importante pode transmitir várias doenças e o nosso objetivo é oferecer novos exames para estas doenças.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Será coletado sangue para a realização de um exame laboratorial para verificar se ocorreu contato com a bactéria *Rickettsia parkeri*.

3. Desconfortos e riscos esperados: O senhor(a) irá coletar sangue, o que apresenta desconforto e riscos mínimos.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: detecção indireta de contato com o agente.

IV - Esclarecimentos Dados Pelo Pesquisador Sobre Garantias ao Sujeito da Pesquisa:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para eventuais dúvidas. O (A) senhor (a) poderá tirar qualquer dúvida sobre a pesquisa a qualquer momento.

2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. O (A) senhor (a) pode deixar de participar da pesquisa a qualquer hora.

3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade: As informações dadas pelo senhor (a) somente serão divulgadas após a sua autorização.

4. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. O senhor (a) somente vai coletar sangue, o que não cabe indenização.

V - Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Paulicéia, __de____de 200__

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)

APÊNDICE F
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA E SAÚDE ANIMAL

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I - Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal

1. NOME DO PACIENTE
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO : .M ? F ?
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
BAIRRO: CIDADE
CEP: TELEFONE:
2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M ? F ?
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº
BAIRRO: CIDADE: Paulicéia - SP
CEP: TELEFONE: DDD
(.....).....

II - Dados Sobre a Pesquisa Científica

1. TÍTULO DA PESQUISA: Pesquisa da infecção pela bactéria *Rickettsia parkeri* em humanos, cães, eqüinos, gambás (*Didelphis* spp) e carrapatos do gênero *Amblyomma* spp no município de Paulicéia, Estado de São Paulo.

PESQUISADOR: Iara Silveira

CARGO/FUNÇÃO: Médica Veterinária

INSCRIÇÃO CRMV Nº: 14.201

UNIDADE FMVZ/USP: Laboratório de Doenças Parasitárias

CONTATO DO LABORATÓRIO DA PESQUISA: (0**11) 3091-1446/3091-1403

2 AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

SEM RISCO	X	RISCO MÍNIMO	?	RISCO MÉDIO	?
RISCO BAIXO	?	RISCO MAIOR	?		

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. DURAÇÃO DA PESQUISA : quatro anos

III - Registro das Explicações do Pesquisador ao Paciente ou Seu Representante Legal Sobre a Pesquisa:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa: Como foi encontrada uma população de carrapato infectada com bactéria *Rickettsia parkeri* é importante pode transmitir várias doenças e o nosso objetivo é oferecer novos exames para estas doenças.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais: Será coletado sangue para a realização de um exame laboratorial para verificar se ocorreu contato com a bactéria *Rickettsia parkeri*.

3. desconfortos e riscos esperados: O senhor(a) vai coletar sangue, o que apresenta desconforto e riscos mínimos.

4. Benefícios que poderão ser obtidos: detecção precoce.

IV - Esclarecimentos Dados Pelo Pesquisador Sobre Garantias ao Sujeito da Pesquisa:

1. acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. O (A) senhor (a) poderá tirar qualquer dúvida sobre a pesquisa a qualquer momento.

2. liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. O (A) senhor (a) pode deixar de participar da pesquisa a qualquer hora.

3. salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade: As informações dadas pelo senhor (a) somente serão divulgadas após a sua autorização.

4. viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa. O senhor (a) somente vai tirar sangue, o que não cabe indenização.

V - Consentimento Pós-Esclarecido

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

Paulicéia, ____ de _____ de 200__

assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome Legível)