



LUCIANA BONATO DE CAMARGO

**SOROPOSITIVIDADE POR RIQUÉTSIAS EM EQUINOS E
ESPÉCIES DE CARRAPATOS VETORES DA FEBRE
MACULOSA BRASILEIRA NA BACIA DO RIO
PIRACICABA, ESTADO DE SÃO PAULO.**

CAMPINAS - SP

2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LUCIANA BONATO DE CAMARGO

**SOROPOSITIVIDADE POR RIQUÉTSIAS EM EQUINOS E
ESPÉCIES DE CARRAPATOS VETORES DA FEBRE
MACULOSA BRASILEIRA NA BACIA DO RIO
PIRACICABA, ESTADO DE SÃO PAULO.**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Rita Donalísio Cordeiro

Dissertação de mestrado apresentada à Pós-graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Saúde Coletiva
Área de concentração: Epidemiologia.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA LUCIANA BONATO DE CAMARGO
E ORIENTADA PELA PROFA. DRA. MARIA RITA DONALÍSIO CORDEIRO
ASSINATURA DO ORIENTADOR**

Campinas – SP

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C14s Camargo, Luciana Bonato, 1980-
Soropositividade por riquetsias em equinos e espécies de carrapatos vetores da febre maculosa brasileira na bacia do rio Piracicaba, estado de São Paulo / Luciana Bonato de Camargo. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Rita Donalísio Cordeiro.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Rickettsia*. 2. Febre maculosa. 3. *Amblyomma*. 4. Equinos. I. Donalísio, Maria Rita, 1957-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: *Rickettsial* seropositivity in horses and tick vectors species of brasilian spotted fever in the Piracicaba river basin, state of São Paulo

Palavras-chave em inglês:

Rickettsia

Spotted fever

Amblyomma

Horses

Área de concentração: Epidemiologia

Titulação: Mestra em Saúde Coletiva

Banca examinadora:

Maria Rita Donalísio Cordeiro [Orientador]

Katia Maria Paschoaletto Micchi de Barros Ferraz

Virgília Luna Castor de Lima

Data de defesa: 11-02-2014

Programa de Pós-Graduação: Saúde Coletiva

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

LUCIANA BONATO DE CAMARGO

Orientador (a) PROF(A). DR(A). MARIA RITA DONALISIO CORDEIRO

MEMBROS:

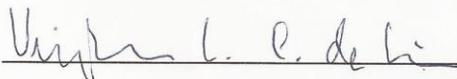
1. PROF(A). DR(A). MARIA RITA DONALISIO CORDEIRO



2. PROF(A). DR(A). KATIA MARIA PASCHOALETTO MICCHI DE BARROS FERRAZ



3. PROF(A). DR(A). VIRGÍLIA LUNA CASTOR DE LIMA



Programa de Pós-Graduação em Saúde Coletiva da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 11 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

**Aos meus pais Ana Lúcia e Luís Fernando
pelo amor e pelo inestimável legado, o estudo.
Ao meu marido Leonardo pelo companheirismo e paciência.**

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Maria Rita Donalísio Cordeiro, que incentivou, ensinou, confiou e que fez possível a realização de um grande passo em minha carreira profissional.

Aos meus pais pelo amor, pelos ensinamentos, pela confiança, proteção, devoção e o exemplo de honestidade que foram necessários para que eu chegasse até aqui.

Ao Leonardo, meu marido por estar ao meu lado em um momento importante em minha vida, me incentivando e me fazendo feliz.

Aos meus irmãos, cunhado e cunhada, que cada um a seu jeito contribuíram sempre, com muita amizade e companheirismo.

Aos meus sobrinhos que me deram alegria todos os dias, com seus abraços, risadas e amor.

Aos meus amados avós Alfredo, Vera, Geraldo e Eunice (*in memoriam*) por terem feito parte da minha vida e por todo o amor doado todos os dias enquanto estiveram presentes.

À minha querida amiga Marcela que tanto me ajudou a superar momentos difíceis da minha vida, contribuindo sempre com sua amizade e bondade.

Às minhas amigas irmãs Renata, Gisela, Juliana e Izabel por tudo, sempre.

Às minhas queridas amigas de residência Acácia, Marcela, Danielle, Janaina, por terem ficado ao meu lado durante a minha jornada profissional, me apoiando nos momentos difíceis e estando presentes até hoje em minha vida.

Todas as minhas amigas que não foram nomeadas, que me ouviram e me fizeram companhia durante os 2 anos do meu mestrado, me dando apoio, meu agradecimento e amor.

Ao Celso e toda a equipe da Sucen de Mogi Guaçu por terem contribuído com todas as informações e coletas imprescindíveis à minha dissertação.

Aos professores Rodrigo Angerami e Virgília Luna Castor de Lima e Katia Ferraz por todas as contribuições que foram importantes para o fim da minha dissertação.

Aos companheiros do laboratório Epigeo da Faculdade de Ciências Médicas – Unicamp, pela ajuda e parceria.

Aos professores do mestrado que tanto contribuíram para meus conhecimentos.

Aos meus amigos, “turma do mestrado e doutorado 2012” por todos os conhecimentos trocados e experiências compartilhadas.

À FAPESP pelo apoio financeiro e institucional (processo 2012/02447-0, São Paulo).

*“É fazendo que se aprende a fazer
aquilo que se deve aprender a fazer.”*

Aristóteles

1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Febre Maculosa Brasileira.....	17
1.2 Vetores da FMB.....	21
1.3 Hospedeiros	29
2. OBJETIVOS.....	33
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos.....	34
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.1 Desenho de Estudo.....	36
3.2 Local de Estudo.....	36
3.3 Critérios para escolha dos locais de estudo.....	36
3.4 Inquérito Sorológico em Equinos.....	41
3.5 Coleta de vetores da FMB.....	43
3.6 Etapas Laboratoriais.....	45
3.7 Questões Éticas.....	47
4. RESULTADOS	48
5. DISCUSSÃO.....	57
6. CONCLUSÃO.....	62
7. REFERÊNCIAS.....	65
8. ANEXOS.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultado da sorologia dos equinos, por meio de técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI), bacia do Rio Piracicaba, 2012-2013.

Tabela 2. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, bacia do rio Piracicaba, 2012-2013.

Tabela3. Espécies de carrapatos identificados e resultados de investigação de infecção pela *Rickettsia* spp em 4 municípios com notificação e quatro sem notificação de casos humanos, na bacia do rio Piracicaba, SP, 2012-2013.

Tabela 4. Dados ambientais das áreas com e sem notificação de casos humanos de FMB na Bacia do Rio Piracicaba, São Paulo, 2012-2013.

Figura 1. Taxa de notificação de casos suspeitos de Febre Maculosa Brasileira por 100.000 habitantes, notificadas pelos grupos de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, Brasil, no período de janeiro de 2007 a junho de 2011.

Figura 2. Distribuição dos municípios com investigação acarológica positiva para *A. cajennense* e *A. dubitatum*. Estado de São Paulo, período de 2003 a 2010.

Figura 3. Ciclo biológico do *Amblyomma cajennense*.

Figura 4. Dinâmica sazonal do carrapato *Amblyomma cajennense* na região sudeste.

Figura 5. Capivaras em pasto limpo.

Figura 6. Equinos em pasto limpo.

Figura 7. Distribuição do *Amblyomma dubitatum*, segundo Unidades Federativas do Brasil.

Figura 8. Distribuição do *Amblyomma aureolatum*, segundo Unidades Federativas do Brasil.

Figura 9. Mapa das bacias do rio Piracicaba, Capivari e Jundiaí.

Figura 10. Coleta de sangue em equino.

Figura 11. Coleta de sangue em equino

Quadro 1. Sequência dos iniciadores e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR dos carrapatos coletados, bacia do rio Piracicaba, 2012-2013.

Quadro 2. Período de coleta de vetores nos municípios de estudo, bacia do rio Piracicaba, SP, 2012 – 2013.

CVE – Centro de Vigilância Epidemiológica

FMB – Febre Maculosa Brasileira

GFB – Grupo da Febre Maculosa

gltA – Gene da proteína citrato sintase

LPI – Local provável de infecção

PCR – Polymerase chain reaction; reação em cadeia da polimerase

PBS – Tampão salino fosfato

RIFI – Reação de imunofluorescência indireta

RMSP – Região Metropolitana de São Paulo

Sucen – Superintendência de Controle de Endemias

Unicamp – Universidade Estadual de Campinas

μL – microlitro

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença infecciosa aguda, cujo agente etiológico mais conhecido é a *Rickettsia rickettsii*, bactéria Gram negativa intracelular obrigatória e transmitida por meio da picada de carrapatos infectados. Vários animais silvestres e domésticos têm papel crucial na epidemiologia da febre maculosa por desenvolverem riquetsemia temporária, possibilitando a infecção de novas gerações de carrapatos e também por servirem de dispersores do vetor infectado facilitando a transmissão para seres humanos. O objetivo deste trabalho é estudar a soropositividade de equinos para riquetsias em áreas com e sem notificação de casos de FMB e identificar as espécies de carrapatos presentes. Foram investigadas quatro áreas consideradas com transmissão de FMB comprovada em Amparo, Valinhos, Jaguariúna e Piracicaba, e quatro áreas consideradas sem transmissão em São Pedro, Rio Claro, Bragança Paulista e Atibaia, todas situadas na bacia do rio Piracicaba, estado de São Paulo. Foi realizado inquérito sorológico de equinos (n = 504) encontrados em propriedades das áreas investigadas, utilizando-se reações de imunofluorescência indireta para os antígenos *R. rickettsii*, *R. belli* e *R. parkeri*. Entre as amostras de sangue examinadas, 183 (36,3%) foram reagentes, sendo 110 (60,1%) de áreas com notificação e 73 (39,9%) em áreas sem notificação de casos humanos. Além do inquérito sorológico também foram coletados 492 carrapatos do gênero *Amblyomma* sendo encontrados 127 adultos das espécies, *Amblyomma cajennense* (25,8%), 13 *Amblyomma dubitatum* (2,6%), além de 352 ninfas (71,5%). A investigação da infecção por *R. rickettsii* utilizando-se a técnica de PCR foi negativa para todos os carrapatos coletados. Os resultados chamaram a atenção para a alta prevalência de equinos sororeagentes em municípios com e sem notificação de casos, destacando-se Bragança Paulista e Rio Claro, considerados municípios em alerta. Ressalta-se a necessidade de maior vigilância e investigação nos municípios sem notificação de FMB. A maior prevalência da espécie *A. cajennense* em todas as áreas de estudo reforçam a hipótese do risco de ocorrência da FMB em todos os municípios estudados.

ABSTRACT

Brazilian spotted fever (BSF) is an acute infectious disease, whose best-known etiologic agent is *Rickettsia rickettsii*, an intracellular Gram negative bacterium, transmitted by the bite of infected ticks. Several wild and domestic animals play a crucial role in the epidemiology of spotted fever, developing a temporary rickettsemia, allowing the infection to new generations of ticks and also serving as a dispersal vector infected, facilitating transmission to humans. The aim of this work is to study the seropositivity of horses for rickettsiae in areas with and without reported cases of BSF and identify the ticks species presents. Four areas considered with proven BSF transmission were investigated, Amparo, Valinhos, Jaguariúna and Piracicaba, and four areas considered without transmission, San Pedro, Rio Claro, Bragança Paulista and Atibaia, all located in Piracicaba river basin, São Paulo State. Serological survey of horses (n= 54) found in the investigated properties areas was performed using the indirect immunofluorescence assay for antigens *R. rickettsii*, *R. parkeri* and *R. belli*. Among blood sample processed 183 (36.3 %) were reagents, 110 (60,1%) of areas with reported human cases and 73 (39.9 %) of areas without reported human cases. Besides serological survey also 492 ticks of the genus *Amblyomma* were collected and were found 127 adults species of *Amblyomma* (25.8 %), 13 *Amblyomma dubitatum* (2.6%), and 352 nymphs (71,5 %). The investigation of infection by *R. rickettsii* using the PCR was negative for all ticks collected. The results demonstrated high prevalence of reactive serum of horses in areas with and without reported human cases, highlighting Bragança Paulista and Rio Claro, considerate areas on alert. We emphasize the need for increased monitoring and research in the counties with no reported cases. The highest prevalence of the species *A. cajennense* in all areas of study reinforces the hypothesis of the risk of BSF occurrence in all municipalities.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Febre Maculosa Brasileira

A febre maculosa, inicialmente denominada febre maculosa das Montanhas Rochosas foi identificada pela primeira vez no estado de Idaho, nos Estados Unidos no final do século XIX. Em 1906, o agente etiológico, foi descrito por Howard Taylor Ricketts, que identificou também o carrapato como principal vetor de transmissão (Piza et al., 1932, Walker, 1989).

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença infecciosa aguda, cujo agente etiológico, *Rickettsia rickettsii*, é uma bactéria Gram negativa intracelular obrigatória, com tropismo por células endoteliais dos hospedeiros vertebrados. Esta bactéria sobrevive por pouco tempo fora do hospedeiro sendo transmitida para humanos e outros animais por diferentes espécies de carrapatos. É considerada a mais importante riquetsiose descrita no Brasil.

Fatores ecológicos e ambientais desempenham um papel importante na distribuição da doença, influenciando diretamente a viabilidade e reprodução de vetores, além de oportunidades de infecção por riquetsia e de exposição humana (Szabó et al., 2013). A sazonalidade da incidência da doença está relacionada ao ciclo de vida do carrapato e sua atividade, promovendo maior contato com o ser humano. Os carrapatos são encontrados em pastos e gramados, preferencialmente sombreados e próximos a rios e lagos (Sá del Fiol et al., 2010).

No Brasil, a doença foi reconhecida pela primeira vez no estado de São Paulo em 1929, em áreas suburbanas da capital. Posteriormente foi identificada em outras regiões do Estado e também em Minas Gerais, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Santa Catarina e Bahia (Dias e Martins, 1939; Del Guercio et al., 1997, Galvão et al., 2005). Entre 1929 e 1933, 88 casos foram relatados no Estado sendo que 76 ocorreram na capital e 12 em municípios no interior (Dias e Martins, 1939).

A partir de 1980 passou a ser observada com maior frequência no estado de São Paulo, sempre com altas taxas de letalidade, ao redor de 40% (Katz et al., 2009). Tem sido considerado um importante problema de saúde pública, devido à expansão das áreas de notificação de casos, à ocorrência de transmissão urbana e à alta taxa de letalidade (Angerami et al., 2012)

A letalidade da doença varia de acordo com a espécie de riquetsia envolvida, a capacidade dos serviços suspeitarem do diagnóstico e do tratamento precoce.

Em geral a FMB tem duas fases clínicas distintas, um estágio inicial com cefaleia, mialgia, náusea, vômito e dor abdominal, seguido por exantema maculopapular em 50% dos pacientes. Com a progressão da doença observa-se disseminação do exantema com evolução para um padrão petequial difuso, dificuldade respiratória e distúrbios neurológicos, sendo fatal em grande parte dos casos (Angerami et al., 2009; Silva Costa et al., 2011)

Na última década no Brasil o maior número de casos ocorreu em São Paulo, onde foram confirmados em 2012, 68 casos que resultaram em 37 mortes, com taxa de letalidade de 54%. Destaca-se a FMB como a doença vetorial com as maiores taxas de letalidade na região Sudeste do Brasil (Moraes-Filho et al., 2009, CVE, 2012).

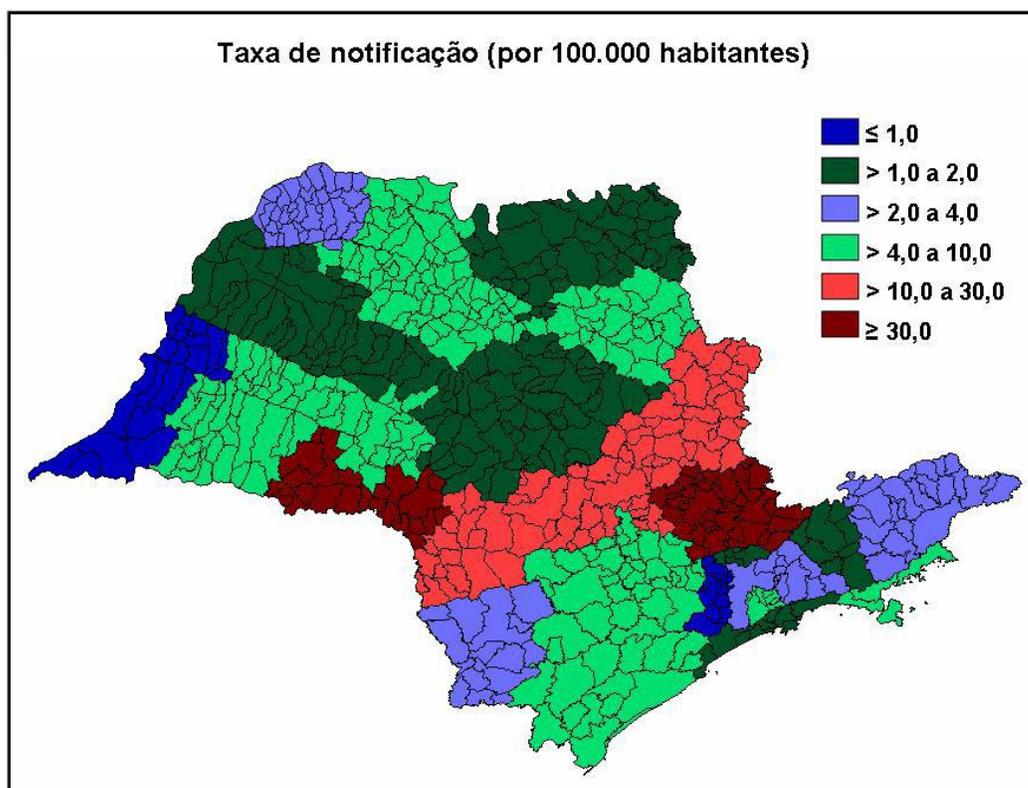
De acordo com o Centro de Vigilância Epidemiológica (CVE), de 1998 a 2012 foram registrados 519 casos confirmados de FMB, sendo que destes 415 (80%) ocorreram em 31 municípios pertencentes à região de Campinas, particularmente na região da bacia do rio Piracicaba (Pinter, 2009). A região se classifica como área de risco no Estado, justificando-se investigações sobre aspectos epidemiológicos da doença, a ocorrência e distribuição de vetores e o papel de reservatórios e hospedeiros.

A figura 1 apresenta taxas de notificação de casos suspeitos por 100 mil habitantes em diferentes regiões do estado de São Paulo, mostrando alto risco nas regiões dos vales dos rios Piracicaba, Paranapanema a oeste e a nordeste do estado, respectivamente.

A região de Campinas, no período de 1985 a 2000 apresentou 47 casos confirmados, sendo que 19 foram diagnosticados em Pedreira e 25 em Jaguariúna, Campinas e Amparo. Em Pedreira, a doença foi considerada um problema em ascensão e grave tendo em vista a alta ocorrência de óbitos (Lima, et al., 2003). A partir destas ocorrências, a região foi considerada área de risco com crescente notificação de casos e expansão de municípios onde a doença passou a ser diagnosticada.

A bacia do rio Piracicaba é considerada região de risco devido a alta incidência da FMB no Estado justificando-se estudos que vinculam a ocorrência de casos humanos, espécies de carrapatos e sua infecção pela *R. rickettsii* e a soropositividade dos equinos.

Figura 1. Taxa de notificação de casos suspeitos de Febre Maculosa Brasileira por 100.000 habitantes, notificadas pelos grupos de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo, Brasil, no período de janeiro de 2007 a junho de 2011.



Fonte: Boletim epidemiológico – SUCEN, 2012

No estado de São Paulo, tem sido observado maior percentual de casos em homens maiores de 10 anos de idade, embora a doença tenha sido descrita em larga faixa etária, de 3 a 59 anos. Acredita-se que situações de exposição no lazer e/ou trabalho estão relacionadas ao parasitismo por carrapato e são fatores de risco de infecção (Katz et al., 2009).

A Vigilância Epidemiológica da FMB

No Brasil, a FMB foi incluída na lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória, do Ministério da Saúde, pela portaria GM/MS nº 1.943, de 18 de outubro de 2001. A partir de 2007, passou a integrar o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (versão Sinan NET).

Atualmente a classificação das diferentes regiões do estado de São Paulo quanto à transmissão da FMB se divide em:

- Áreas de risco, locais onde há populações de carrapatos estabelecidas, condições ambientais favoráveis, presença de residentes ou visitantes e pelo menos um caso confirmado;
- Áreas de alerta, respeitam os mesmos critérios acima, exceto a presença de caso confirmado da doença;
- Áreas silenciosas, áreas onde não houve casos humanos confirmados e não foi realizada pesquisa acarológica (Pinter, 2009).

A vigilância da FMB compreende a vigilância epidemiológica e ambiental dos vetores, reservatórios e dos hospedeiros, tendo como objetivos (Brasil, 2009):

- Detectar e tratar precocemente os casos suspeitos visando reduzir letalidade;
- Investigar e controlar surtos, mediante adoção de medidas de controle;
- Conhecer a distribuição da doença, segundo lugar, tempo e pessoa;
- Identificar e investigar os locais prováveis de infecção (LPI);
- Recomendar e adotar medidas de controle e prevenção.

Os vetores implicados na transmissão da FMB em São Paulo são os carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum* que também se alimentam em seres humanos e são infectados por *R. rickettsii*. O carrapato *A. dubitatum* que parasita principalmente capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*), tem sido relatado também infectado por *R. parkeri* e *R. belli* além da *R. rickettsii* (Pinter e Labruna, 2006).

O carrapato *A. cajennense* é considerado na região Sudeste do Brasil, o principal vetor da doença, principalmente suas formas imaturas devido a sua baixa especificidade hospedeira sendo bastante agressivas para o ser humano e animais domésticos. (Freitas et al., 2010).

1.2 Vetores da FMB

O *Amblyomma sp* é responsável pela manutenção da *R. rickettsii* na natureza devido à transmissão transovariana e perpetuação transestadial. Os carrapatos machos podem transmitir a riquetsia por meio de fluidos corporais durante a cópula. Essas características permitem que o carrapato permaneça infectado durante toda a sua vida e dissemine a bactéria para novas gerações (Raoult et al., 2005).

O gênero *Amblyomma* tem aproximadamente 130 espécies descritas, sendo 29 destas encontradas no Brasil. Este ixodídeo apresenta baixa especificidade hospedeira, parasitando diversos mamíferos, inclusive o homem, sendo encontrado com grande frequência em equinos (Martins et al., 2010).

No Brasil, duas espécies de carrapatos, *A. cajennense* e *A. aureolatum*, são considerados os principais vetores da FMB que podem se alimentar em humanos e podem ser infectados por *R. rickettsii*. Embora haja controvérsias sobre o parasitismo humano pelo *A. dubitatum*, sua importância médica se baseia principalmente numa possível participação no ciclo enzoótico de riquetsias na natureza, já que as capivaras são consideradas potenciais reservatórios de *R. rickettsii*. Além disso, grandes populações de *A. dubitatum* têm sido encontradas, juntamente com a espécie *A. cajennense*, em alguns focos de febre maculosa na região Sudeste (Labruna, et al., 2004a; Guedes e leite, 2008).

Amblyomma cajennense

É uma espécie de carrapato da ordem Ixodida, família Ixodidae, sub família *Amblyominae* com ampla distribuição na região neotropical, com populações de carrapatos do sul do Texas nos Estados Unidos ao sul da América do Sul. Esta espécie de carrapatos possui três hospedeiros durante seus estágios de vida (Figura 3) e tem um ciclo de vida de um ano (Figura 3). A eclosão dos ovos ocorre no verão e as larvas procuram por hospedeiros durante o outono, fator desencadeado devido à diminuição da temperatura e da duração do dia. Portanto as larvas predominam no outono e inverno, ninfas no inverno e primavera, e adultos na primavera e verão (Savina, 2004; Savina et al., 2006). (figura 4)

Altas infestações ambientais de carrapatos na região Sudeste do Brasil têm sido registradas e associadas a equinos e capivaras, que são hospedeiros específicos dos estágios adultos do vetor (Labruna, et al., 2011a). Investigações acarológicas no estado de São

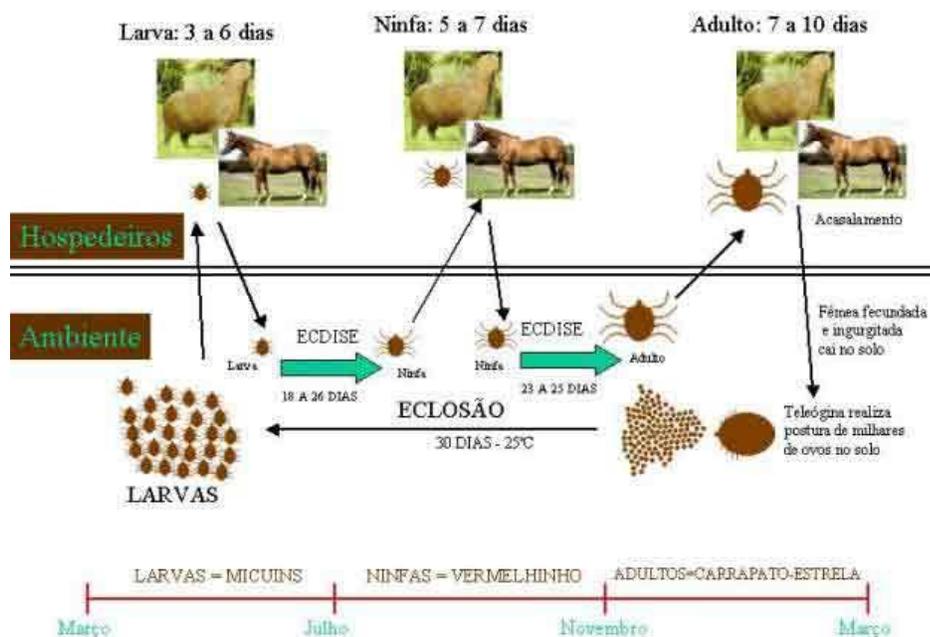
Paulo mostram concentração de carrapatos da espécie principalmente nas bacias do rio Piracicaba e Paranapanema a nordeste e oeste do Estado, respectivamente (Figura 2). São considerados o principal vetor da doença, principalmente suas formas imaturas devido a sua baixa especificidade hospedeira sendo bastante agressivas para o ser humano e animais domésticos (Freitas et al., 2010).

Figura 2. Distribuição dos municípios com investigação acarológica positiva para *A. cajennense* e *A. dubitatum*. Estado de São Paulo, período de 2003 a 2010.



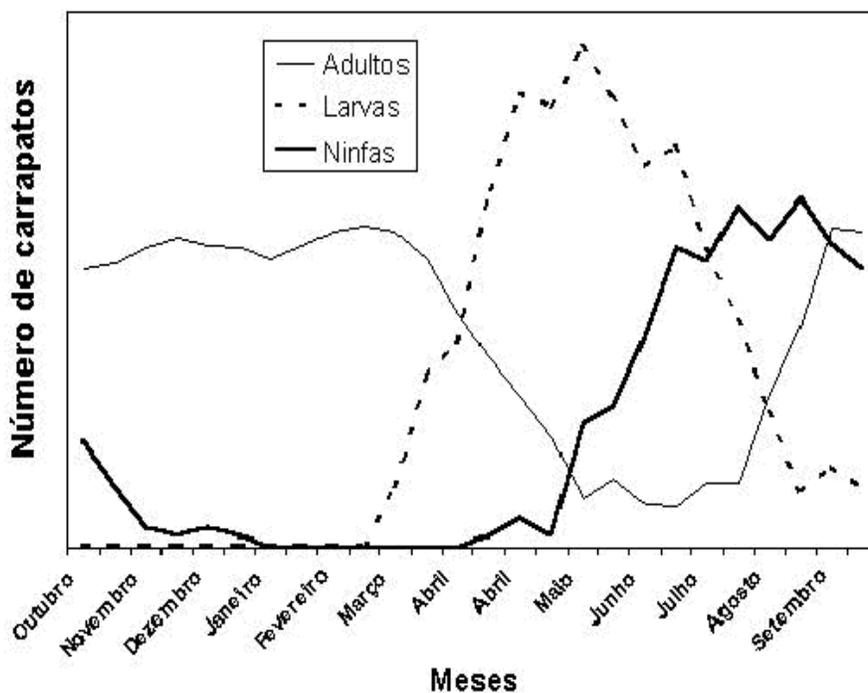
Fonte: Boletim epidemiológico – SUCEN, 2012

Figura 3. Ciclo Biológico do *Amblyomma cajennense*



Fonte: Manual Vigilância Acarológica – SUCEN, 200

Figura 4. Dinâmica sazonal do carrapato *Amblyomma cajennense* na região Sudeste



Fonte: Manual de Vigilância Acarológica – SUCEN

A maior parte dos casos de FMB ocorre durante a estação de ninfa (de junho a outubro), em decorrência da maior agressividade destas em humanos e ao tamanho menor do vetor, o que pode dificultar a sua retirada. Experimentos em laboratório demonstram competência vetorial mais baixa das larvas infectadas comparadas à alta competência vetorial das ninfas (Pinter et al., 2002).

O carrapato *A. cajennense* mantém *R. rickettsii* na natureza pois permanece infectado durante toda a sua vida e também por muitas gerações após uma infecção primária. Portanto, além de vetores, os carrapatos são verdadeiros reservatórios da riquetsia na natureza, uma vez que todas as fases evolutivas são capazes de permanecer infectadas no ambiente durante meses ou anos à espera do hospedeiro, garantindo um foco endêmico prolongado. Quanto maior a densidade populacional de hospedeiros, maior será a população de carrapatos (Labruna, 2000).

Embora *A. cajennense* tenha uma baixa especificidade parasitária, para que uma população do vetor se estabeleça numa área, há dois pontos críticos a serem considerados:

- 1- A presença de hospedeiros primários.
- 2- Condições ambientais favoráveis às fases de vida livre (não parasitárias) do carrapato.

Tanto a presença como a abundância de populações de *A. cajennense* estão fortemente associadas à presença de áreas com média a densa cobertura vegetal, tais como pastos “sujos”, capoeiras e matas (SES, 2002). Nas figuras 5 e 6 podem-se observar equinos e capivaras em pastos limpos.

A taxa de infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos pode ser diminuída ou até suprimida quando uma outra espécie de riquetsia infecta a maioria dos membros de uma população de carrapatos. Assim, uma hipótese para justificar a ausência de casos humanos de FMB (onde existe o parasitismo em humanos por *A. cajennense*) pode se relacionar à presença de outra espécie de riquetsia, menos patogênica, infectando populações de *A. cajennense*. (Sangione et al., 2005).

Figura 5. Capivaras em pasto limpo.



Fonte: Manual Vigilância Acarológica – SUCEN, 2002

Figura 6. Equinos em pasto limpo.



Fonte: SUCEN, 2012

Amblyomma dubitatum

Esta espécie de *Amblyomma* está presente do norte ao sul da América do Sul. No Brasil, é relatada nos estados das regiões Sudeste, Sul e Centro-oeste (Figura 7), e em São Paulo (Figura 2). O papel desta espécie de carrapato na epidemiologia da FMB continua pouco conhecido, pois apesar de ser um carrapato comum em áreas endêmicas, nunca foi encontrado infectado por *R. rickettsii*. Entretanto entre 6-45% de *A. dubitatum* foram encontrados infectados por *R. belli* em muitas populações investigadas incluindo algumas áreas endêmicas de FMB (Almeida et al., 2001; Guedes et al., 2011).

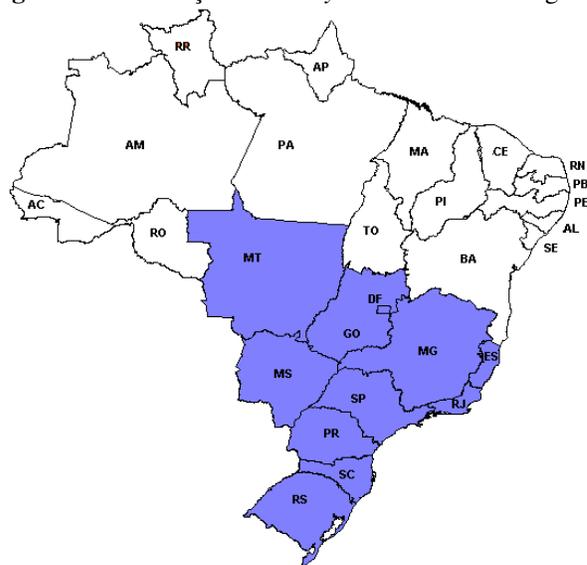
As capivaras são consideradas hospedeiros primários para todos os estágios parasitários de *A. dubitatum*. Grandes populações têm sido encontradas, juntamente com a espécie *A. cajennense*, em algumas áreas de transmissão da FMB no estado de SP e outras da região Sudeste (Souza et al., 2002).

Todos os estágios parasitários desta espécie se alimentam em seus hospedeiros primários, as capivaras, porém larvas e ninfas podem ser encontradas em várias outras espécies de hospedeiros. Não há nenhuma indicação de que *A. dubitatum* esteja envolvido em doença humana. É considerado um potencial vetor enzoótico de *R. rickettsii* (Labruna et al., 2004a)

Lemos et al. (1996a) relataram o primeiro isolamento de riquetsia do grupo da febre maculosa, a partir de um exemplar de *A. dubitatum* coletado de capivara, no município de Pedreira, São Paulo, contudo sem a descrição da espécie de riquetsia encontrada.

Embora as capivaras, abundantes em muitas áreas endêmicas para FMB, sejam consideradas hospedeiros primários para todos os estágios parasitários do carrapato *A. dubitatum*, os estágios de larva e ninfa apresentam menor especificidade parasitária, podendo se alimentar em diversas espécies de hospedeiros em laboratório e em condições naturais (Labruna et al., 2004b).

Figura 7. Distribuição do *Amblyomma dubitatum* segundo unidades federativas do Brasil



Fonte: SUCEN/SES-SP

Amblyomma aureolatum

Essa espécie é restrita ao leste da América do Sul, Uruguai a Suriname, incluindo o nordeste da Argentina, leste do Paraguai, sudeste ao sul do Brasil e Guiana Francesa (Guglielmone, et al., 2003, Labruna et al, 2011a). É encontrada em diversos países da América do Sul, no Brasil, especialmente em áreas de Mata Atlântica das regiões Sul e Sudeste (figura 8).

O carrapato da espécie *Amblyomma aureolatum* é um vetor competente e capaz de transmitir a bactéria *R. rickettsii*. No Brasil este carrapato é endêmico na Floresta Pluvial Atlântica, sendo o vetor responsável pela transmissão da doença nos municípios da Região Metropolitana de São Paulo (RMSP). É uma ameaça ao ser humano naquelas comunidades que vivem adjacentes aos fragmentos da Mata Atlântica, principalmente na periferia RMSP (CVE-BEPA, 2011).

É uma espécie de carrapato típica da Mata Atlântica devido às ótimas condições de umidade alta e temperaturas amenas durante todo o ano (Pinter et al., 2004). Em áreas naturais da floresta, sem distúrbios, os adultos de *A. aureolatum* se

alimentam apenas em espécies de carnívoros silvestres como raposas (*Cyrdocyon thous* e *Lycalopex spp*) e guaxinins (*Procyon cancrivorus*), mas em áreas rurais próximas à floresta tropical, os adultos se alimentam apenas em cães domésticos. Estes mamíferos apresentam um importante papel transportando esses carrapatos de dentro da floresta tropical para lugares onde vivem seres humanos.

Carnívoros silvestres são os hospedeiros primários para o estágio adulto, embora os cães criados em algumas áreas rurais se comportem como hospedeiros primários. As larvas e ninfas parecem estar associadas a roedores e aves silvestres, não havendo registros em carnívoros. Somente o estágio adulto tem sido encontrado parasitando humanos (Pinter et al., 2002; Ogrzewalska et al., 2012).

Na fase adulta, *A. aureolatum* parasita o cão doméstico e nas fases imaturas utiliza como hospedeiros algumas espécies de roedores e aves passeriformes, principalmente as espécies *Turdos rufiventres* (Sabiá-laranjeira) e *Pyriglena leucoptera* (Olho-de-fogo) (Ogrzewalska et al., 2012).

Um estudo de Labruna et al. (2008) demonstrou que *A. aureolatum* é altamente susceptível à infecção por *R. rickettsii* e eficiente na manutenção da infecção por transmissão transovariana e perpetuação transtadial. Outros autores afirmam que taxas de infecção de *A. aureolatum* por *R. rickettsii* são menores que 1% em condições naturais em áreas endêmicas para FMB (Pinter e Labruna, 2006).

Há poucas informações sobre a dinâmica populacional desta espécie de carrapato. Sabe-se que os cães podem se apresentar infestados pelo estágio adulto por todo o ano, porém, sem um pico de infestação definido (Pinter et al., 2002). As populações de *A. aureolatum* nas áreas rurais são geralmente baixas, apresentando baixo risco de infestação humana.

Figura 8. Distribuição do *Amblyomma aureolatum*, segundo unidades federativas do Brasil.



Fonte: Manual Vigilância Acarológica – SUCEN, 2002

1.3 Hospedeiros

Apenas gambás (*Didelphis aurita*) e capivaras têm sido relatados como eficiente fonte de infecção de *R. rickettsii* para carrapatos e atuam como hospedeiros amplificadores. Os gambás são abundantes nas áreas endêmicas de FMB, onde são infestados por larvas e ninfas de *A. cajennense* (Horta et al., 2010).

Seres humanos não têm participação na propagação da FMB, infectam-se acidentalmente e a distribuição da doença depende de espécies de carrapatos responsáveis pela manutenção da infecção na natureza (Lemos et al, 1996). Os casos humanos estão associados ao convívio com animais domésticos e vetores (Lemos, 1996b).

Uma grande variedade de animais silvestres é hospedeiro natural da infecção, entre eles a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e marsupiais, como o gambá (*Didelphis sp*).

Os gambás da espécie *Didelphis aurita* são os únicos animais silvestres no Brasil nos quais isolaram *R. rickettsii* em condições naturais. Essa espécie de gambá foi susceptível à infecção experimental por *R. rickettsii* desenvolvendo longo período de riquetsemia (4 semanas) quando parasitados por *A. cajennense*, indicando que podem servir

como hospedeiros amplificadores para larvas e ninfas desta espécie de carrapatos (Horta et al., 2009).

Os animais domésticos atuam como carreadores de vetores da FMB e da bactéria ao peridomicílio, enquanto os silvestres caracterizam-se como hospedeiros, não apresentando sintomatologia clínica. (Fonseca, 2009).

Nos Estados Unidos foram descritos cães sintomáticos, mas não no Brasil. Em equinos não existem registros de sintomas clínicos, mesmo quando esses animais apresentam títulos altos ($\geq 1:1024$) contra antígenos *R. rickettsii* (Batista et al., 2010).

Segundo Labruna (2006) para que um vertebrado seja considerado um bom hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* na natureza, deve preencher basicamente cinco quesitos:

- 1- Ser abundante na área endêmica de febre maculosa;
- 2- Ser um bom hospedeiro do carrapato vetor em condições naturais;
- 3- Ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*;
- 4- Manter *R. rickettsii* circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar carrapatos;
- 5- Ter alta taxa de renovação populacional (quanto maior a população, maior será a introdução de animais susceptíveis na população);

As capivaras preenchem muito bem estes quesitos, pois são abundantes nas áreas endêmicas para FMB e são um dos principais hospedeiros primários de *A. cajennense* sendo susceptíveis à infecção por *R. rickettsii* (Souza et al, 2009a) e um dos principais hospedeiros do estágio adulto do carrapato *A. cajennense* e hospedeiro exclusivo do *A. dubitatum* (Guedes e Leite, 2008). As capivaras também são consideradas reservatórios naturais e hospedeiros amplificadores da *R. rickettsii*, sendo responsáveis por nova geração de carrapatos infectados em áreas endêmicas (Brites-Neto et al., 2013)

A maioria das áreas endêmicas de FMB no interior de São Paulo apresenta grandes populações de capivaras de vida livre que atuam como hospedeiros primários para *A. cajennense* e *A. dubitatum* e estão expostas à infecção por riquetsia (Guedes et al., 2011). Também tem sido relatado que as capivaras desempenham um importante papel na epidemiologia da FMB, já que atuam como fonte amplificadoras da disseminação de

riquétisia possibilitando a criação de novas linhagens de *R. rickettsii* em carrapatos infectados (Souza et al., 2009).

No estado de São Paulo, a maioria dos casos de FMB está relacionada ao aumento populacional de capivaras. Com a caça proibida pela lei nº 9.605, de 12 de fevereiro de 1998 e sem predadores os bandos circulam livremente por áreas degradadas de matas ciliares, áreas de preservação, parques e jardins urbanos e periurbanos.

O Brasil sofreu alteração de paisagem nas últimas décadas devido à expansão da agricultura e de áreas urbanas em áreas de matas ciliares, com isso aumentou a disponibilidade de alimentos produtos de atividades agropecuárias e áreas de desmatamento, possivelmente permitiram que a população de capivaras aumentasse. Por outro lado, bandos de capivaras circulam livremente por matas ciliares, parques públicos e matas degradadas próximas à ambientes urbanos. Risco a saúde humana está relacionado ao aumento da densidade de capivaras (Ferraz et al., 2009).

Para o *A. cajennense*, equinos, antas (*Tapirus terrestris*), e as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são considerados hospedeiros primários para todos os estágios parasitários. Por outro lado, larvas e ninfas de *A. cajennense* têm baixa especificidade, e são bastante agressivas para seres humanos e cães domésticos. Casos humanos são normalmente acidentais (Moraes – Filho et al., 2009).

Nas áreas rurais na região Sudeste, os equinos são os principais hospedeiros para todos os estágios do *A. cajennense*. A maior importância dos equinos pode ser devido à grande capacidade de albergar altas infestações. Em condições naturais um único equino pode se apresentar parasitado por mais de 50 mil larvas ou mais de 12 mil ninfas ou mais de dois mil adultos de *A. cajennense* sem que sua vida esteja em risco (Labruna, 2000). Os equinos são animais domésticos, a maioria criada em áreas cercadas, com alta densidade de animais, tal fato é extremamente favorável às larvas recém eclodidas ou ninfas e adultos recém mudados, que se encontram no ambiente à espera da passagem de um hospedeiro.

Como os equinos são animais de livre movimentação e utilizados para o transporte, podem dispersar carrapatos infectados, que podem se estabelecer em outras áreas, provocando assim o surgimento de novos focos. Os equinos constituem um dos principais elos na circulação das riquétisias, pois também são responsáveis pela alta densidade populacional de *A. cajennense* (Cardoso et al., 2006).

Equinos são considerados animais sentinelas para FMB devido à sua exposição ao *A. cajennense* (Freitas et al., 2010). Em uma área onde a população desta espécie de carrapato está estabelecida, pelo menos uma dessas três espécies de hospedeiros (equinos, antas e capivaras) deverá estar presente.

Uma vez que a população de carrapatos cresce, ela passa a parasitar outros hospedeiros chamados secundários. Portanto quanto maior a população de *A. cajennense* em uma determinada área, maior a chance de encontrar esses vetores parasitando outras espécies de hospedeiros, inclusive humanos (SES, 2002).

Os cães de áreas rurais normalmente se movimentam livremente pelos pastos e matas e são também animais de companhia. A presença desses animais nos domicílios é um fator de risco para a ocorrência de FMB em humanos devido ao carreamento de carrapatos do ambiente natural para dentro das residências e/ou áreas próximas. Os cães não são hospedeiros primários do *A. cajennense* sendo menos frequentemente atacados por esses carrapatos (Horta, 2002)

As principais espécies de carrapatos associadas à transmissão do agente causador da FMB, o *A. cajennense* e o *A. aureolatum* utilizam, respectivamente, o cavalo e o cão, como importantes hospedeiros primários. Pinter (2009) sugere que esses hospedeiros possam desempenhar o papel de sentinelas da circulação de riquetsias entre os carrapatos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar a soropositividade em equinos, bem como as espécies de carrapatos e a sua infecção por riquetsias, em áreas com transmissão de FMB comprovada e em áreas sem registro de casos, na bacia do Rio Piracicaba, estado de São Paulo, nos anos de 2012 e 2013.

2.2 Objetivos Específicos

- Detectar a positividade sorológica para riquetsias (*R. bellii*, *R. rickettsii* e *R. parkeri*) em equinos encontrados nas áreas com e sem notificação de FMB na região de estudo;
- Verificar a infecção por riquetsias em carrapatos coletados nas áreas com e sem transmissão de FMB notificada;
- Identificar as espécies dos carrapatos nas áreas com e sem registro de FMB na região de estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Desenho de estudo

Trata-se de um estudo transversal com inquérito sorológico em equinos e um estudo descritivo sobre espécies de carrapatos, abundância e infecção pela *R. rickettsii* em oito localidades na bacia do rio Piracicaba, sendo quatro em áreas com notificação de casos humanos e quatro em áreas sem notificação de infecção humana.

3.2 Local de estudo

A bacia hidrográfica do Rio Piracicaba estende-se por uma área de 11.442,82 km², situada no sudeste do estado de São Paulo e extremo sul do estado de Minas Gerais, com extensão de 350 km. Tem um sistema de drenagem altamente denso com cerca de 7850 km de cursos de água. A vegetação original era predominantemente floresta subtropical com pequenas áreas de savanas. Desde 1850 a floresta original tem sido intensamente substituída por pasto e cana de açúcar (Ballester, 2001).

A bacia pode ser considerada um agrossistema com cerca de 70% coberta por pasto e cana de açúcar (43% pasto e 31% cana de açúcar), apenas 10% da floresta remanescente original. Recentemente as capivaras têm sido consideradas espécie invasora com crescimento descontrolado na região e estão associadas ao risco de doenças enzoóticas (Martinelli et al., 1999; Lara et al., 2001). Abrange 55 municípios do estado de São Paulo, com população de 3.000.000 de habitantes como pode ser observado na Figura 13 (SAAE, 2004).

O rio Piracicaba é formado no município de Americana pela junção dos rios Jaguarí e Atibaia (Figura 10) e percorre 250 km até a represa de Barra Bonita – SP, onde ocorre sua foz junto ao rio Tietê. Foi realizado um levantamento de espécies de carrapatos e sua infecção por *Rickettsia* spp seguido por inquérito sorológico de equinos.

3.3 Critérios para escolha dos locais de estudo

No decorrer dos anos de 2012-2013 foram escolhidos em oito locais na bacia do rio Piracicaba, quatro locais entre os municípios com maiores registros de casos de FMB pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica nas últimas décadas. Também foram selecionados quatro locais em municípios onde não houve notificação de casos de FMB nos últimos 20

anos. Nos quatro municípios onde houve transmissão de FMB, foram visitados os locais prováveis de infecção (LPI) para investigação epidemiológica, coleta de vetores e identificação de propriedades adjacentes para autorização e coleta de sorologias de equinos. Para tanto, foram obtidas autorizações dos proprietários para investigação de equinos.

Os pontos nas áreas sem notificação foram escolhidos em locais de beira de rio, circulação de capivaras, áreas onde seria provável o encontro de vetores e hospedeiros, potencialmente viabilizando a infecção humana.

Pode ser observado na Figura 9 a extensão da bacia e os municípios selecionados, em vermelho. Foram alocados os oito pontos em diferentes áreas na extensão da bacia, procurando cobrir distintos rios e ambientes propícios à transmissão. Procurou-se cobrir as extremidades da bacia

No estado de São Paulo foram notificados pelo Sistema de Vigilância Epidemiológica do estado SP, 519 casos de FMB nos anos de 1998 a 2012, sendo 302 (58,19%) em 23 locais prováveis de infecção (LPI) registrados na bacia do rio Piracicaba (CVE). As cidades com maior número de casos confirmados da FMB no período foram Campinas com 78 casos, seguida de Piracicaba com 41 casos, Valinhos com 38, Pedreira com 25, Jaguariúna com 24 e Vinhedo com 18 casos, todas situadas na região nordeste do estado de São Paulo, a qual é considerada a região com maior número de registro da doença (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fm_lpi.htm). Dentre as cidades com maior notificação da doença optou-se por: Piracicaba, Jaguariúna (as margens do rio Jaguari) Valinhos (margens do rio Capivari), acrescentando-se Amparo que apresentou 9 casos e localiza-se em região ao norte da bacia. Esta escolha permitiu a cobertura de área nas margens do rio Camaduaia. (figura 9)

Os critérios de confirmação de casos de FMB são indicados pela SVE/SP, e foram analisados somente os casos notificados e confirmados (http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fm_lpi.htm):

Critério laboratorial - caso suspeito de FMB com pelo menos um dos seguintes resultados laboratoriais:

- **Isolamento em cultura do agente etiológico;**
- **Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)** – quando houver soro conversão dos títulos de RIFI, entendida com:

- ✓ 1ª amostra de soro (fase aguda) não reagente e 2ª amostra (colhida 14-21 dias após) com título ≥ 128 ;
- ✓ Aumento de, no mínimo, 4 vezes os títulos obtidos em 2 amostras de soro, coletadas com intervalo de 14 a 21 dias.
- **Imunohistoquímica reagente para antígenos específicos de *Rickettsia* sp.**

Critério clínico-epidemiológico: Indivíduo que foi a óbito com quadro clínico compatível com a doença e que tenha antecedentes epidemiológicos (picada de carrapatos e/ou áreas sabidamente de transmissão de febre maculosa e/ou vínculo com casos confirmados laboratorialmente), não tendo sido possível a coleta oportuna de material para exames. (Brasil, 2009).

Os municípios sem notificação de casos escolhidos foram Rio Claro e São Pedro às margens do rio Corumbataí a noroeste da bacia. Bragança Paulista e Atibaia foram escolhidas, pois estão em regiões mais altas à leste e ao sul da bacia às margens do rio Atibaia e Jaguarí. Nunca foram notificados casos de FMB nestes municípios.

Os oito locais de estudo foram escolhidos de forma intencional para evidenciar possíveis contrastes entre espécies de vetores, infecção de vetores e soropositividade de equinos. A escolha de locais com potencial circulação de riquetsia em áreas sem notificação de FMB teve o objetivo de evidenciar possíveis diferenças entre os elementos que compõe o ciclo da doença.

como principais atividades econômicas empresas nas múltiplas atividades em indústria, comércio e turismo, como atividades produtivas de alta tecnologia em diversas áreas de atuação, como plásticos, embalagens de papel e papelão, metalúrgica, informática, microeletrônica, e tem forte vocação para desenvolvimento do setor logístico. É banhada pelo Rio Atibaia e Rio Capivari (<http://www.valinhos.sp.gov.br/portal/index.php>).

- **Jaguariúna** possui uma população de 43.331, sendo 43.047 população urbana e 1.284 população rural. Localiza-se a uma latitude 22°42'20" sul e uma longitude 46°59'09" oeste, estando a uma altitude de 584 metros. Possui uma área de 141,401 km². Tem como principais atividades econômicas, agropecuária, indústria e serviços. É banhada pelos rios Jaguarí, Atibaia e Camanducaia. Tem como principais atividades econômicas, indústria, agropecuária e turismo (<http://www.jaguariuna.sp.gov.br/portaljag/>).
- **Piracicaba** possui uma população de 364.872 habitantes, sendo 355,136 população urbana e 9.736 população rural. Localiza-se a uma latitude 22°43'30" sul e uma longitude 47°38'56" oeste, estando a uma altitude de 547 metros. Possui uma área de 1376,913 km², sendo que 31,5733 km² constituem a zona urbana e os 1345,339 km² restantes fazem parte da zona rural. É banhada pelos rios Piracicaba e Corumbataí. Tem como principais atividades econômicas, indústria, serviços e agropecuária. Atualmente a principal fonte econômica está centrada na produção de açúcar e álcool, além de ter um dos principais centros industriais da região e contar com diversas universidades de renome. A cidade é banhada pelos rios Piracicaba e Tietê (<http://www.piracicaba.sp.gov.br/>).

Os municípios sem notificação de casos de FMB foram

- **São Pedro** possui uma população de 31.662 habitantes, sendo que 26,607 corresponde a população urbana e 5.055 corresponde a população rural. Localiza-se a uma latitude 22°32'55" sul e uma longitude 47°54'50" oeste, estando a uma altitude de 550 metros. Possui uma área de 619,75 km². Tem como principal atividade econômica o turismo (<http://www.saopedro.sp.gov.br/>).

- **Rio Claro** possui uma população de 186.253 habitantes, sendo que 163.477 corresponde a população urbana e 4.741 a população rural. Localiza-se a uma latitude 22°32'55" sul e uma longitude 47°54'50" oeste, estando a uma altitude de 613 metros. Possui uma área de 498,422 km². Junto com as cidades, Santa Gertrudes, Limeira, Cordeirópolis, Ipiúna, Piracicaba, e Araras formam o maior polo cerâmico da cidade. Destaca-se também pela diversidade de produtos industrializados. É banhada pelos rios Piracicaba e Corumbataí (<http://www.rioclaro.sp.gov.br/>).
- **Bragança Paulista**, oficialmente Estância Climática de Bragança Paulista, 146.663 habitantes, sendo que 142.174 corresponde a população urbana e 4.489 a população rural. Localiza-se a uma latitude 22°57'07" sul e uma longitude 46°32'31" oeste, estando a uma altitude de 817 metros. Possui uma área de 513,519 km². As principais atividades econômicas são comércio e escolas e faculdades, que compõe a maior parcela da economia local, seguidos por indústrias (papeleira, alimentícia e eletrônica) e agricultura. É banhada pelos rios Jaguarí e Jacareí (<http://braganca.sp.gov.br/v2/>).
- **Atibaia** possui uma população de 126.603, sendo que 115.229 corresponde a população urbana e 11.374 a população rural. Localiza-se a uma latitude 23°07'01" sul e uma longitude 46°33'01" oeste, estando a uma altitude de 803 metros. Possui uma área de 478,101 km², sendo que 57% corresponde a zona rural e 43% corresponde a zona urbana. Tem como principal atividade econômica o turismo. É banhada pelo rio Atibaia (<http://atibaianovo.com.br/>).

3.4 Inquérito sorológico em equinos

Após contato com responsáveis pelas propriedades rurais, foram coletadas amostras de sangue dos equinos existentes. Os locais foram as propriedades mais próximas aos locais de coleta de vetores na região de estudo. Nos 4 municípios onde os casos foram notificados a coleta foi realizada em LPI de casos notificados. Foram realizados testes sorológicos por meio de reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para *Rickettsia rickettsii*, *R. belli* e *R. parkeri*, utilizando-se material e técnica de laboratório descritas abaixo. Foram coletadas

entre 50-70 amostras biológicas de equinos por propriedade, em um total de 504 amostras processadas (Figuras 10 e 11). Os equinos investigados foram confirmados como residentes no local, sem antecedentes de circulação em outros ambientes.

Reações sorológicas cruzadas entre diferentes espécies de riquetsias podem dificultar a compreensão sobre a circulação da *R. rickettsii*.

Destaca-se que a *Rickettsia parkeri* foi considerada não patogênica para humanos nos últimos 60 anos, até ser isolada pela primeira vez em *Amblyomma maculatum* nos Estados Unidos em 2004, onde casos humanos de infecção por esta bactéria têm sido relatados nos últimos anos (Parker, 1939), porém a *R. parkeri* apresenta manifestações menos severas em humanos que a *R. rickettsii* (Silveira et al., 2007).

Já a *Rickettsia belli* tem sido encontrada em várias espécies de carrapatos, incluindo *Amblyomma dubitatum*, apesar de não existir nenhuma evidência de infecção em humanos por esta espécie da bactéria (Labruna, 2006).

Figura 10. Coleta de sangue de equino.



Fonte: Sucen, 2013

Figura 11. Coleta de sangue de equino.



Fonte: Sucen, 2013

3.5 Coleta de vetores da FMB

A coleta dos carrapatos foi realizada por meio de armadilhas de gelo seco e arrasto de flanela na vegetação nos oito locais de estudo.

Esta armadilha consiste em colocar aproximadamente 500 gramas de gelo seco no centro de uma flanela branca medindo um metro de largura por um metro de comprimento esticado sobre o solo, contendo fita adesiva de dupla face em suas bordas. O tempo de permanência desta armadilha foi de uma hora, sendo que logo após serem retiradas foram colocados em sacos plásticos fechados com fita adesiva e levados para o laboratório para identificação taxonômica e realização do teste de hemolinfa nos carrapatos conforme técnica de Gimenez (Burgdorfer, 1970).

A técnica de arrasto consiste em percorrer toda extensão da área andando lentamente e parando a cada 4 a 5 metros para verificação e coleta de carrapatos aderidos

sobre a face da flanela que é arrastada em contato com a vegetação. Para esta técnica é necessário uma flanela branca com dimensões de 1,5 m de comprimento por 0,80m de largura, com duas hastes de ferro com um diâmetro de 0,85 polegadas, transpassadas em presilhas feitas em cada extremidade da mesma, com objetivo de manter a flanela aberta o mais próximo possível da vegetação.

Os carrapatos coletados foram colocados em frascos plásticos e levados ao laboratório para identificação taxonômica e realização do teste de hemolinfa conforme técnica de Gimenez (Burgdorfer, 1970).

Foram realizadas oito coletas distribuídas durante os anos de 2012 e 2013, priorizando-se os meses de fevereiro, março e abril, período ocorrência de adultos, facilitando a identificação taxonômica. Foram também considerados a disponibilidade das equipes da Sucen, e os períodos de chuva para as visitas a campo. Foram instaladas armadilhas de gelo seco em cada local e realizado o arrasto de flanela para cada área. A equipe de campo realizou as coletas usando equipamentos de proteção individual (botas e macacão brancos e luvas) conforme indicação do Ministério da Saúde (Brasil, 2009).

O Quadro 1 apresenta os períodos de coleta de vetores nas áreas de estudo. Com exceção de Bragança Paulista, todas as coletas foram realizadas em períodos de predomínio de formas adultas do vetor.

Quadro 1. Período de coleta de vetores nos municípios de estudo, bacia do rio Piracicaba, SP, 2012 - 2014

	Município	Mês e ano
Municípios com Notificação	Amparo	Março/2012
	Jaguariúna	Março/2013
	Piracicaba	dezembro/2013
	Valinhos	Abril/2013
Municípios sem Notificação	Rio Claro	Março/2012
	Bragança Paulista	Agosto/2012
	São Pedro	Abril/2013
	Atibaia	Nov/2013

3.6 Etapas laboratoriais

- *Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI):*

Cada amostra foi processada por meio da utilização da técnica da imunofluorescência indireta, descrita por Zavala-Velazquez et al. (1996) com a utilização de lâminas com 12 orifícios sensibilizadas no laboratório da Sucen em Mogi-Guaçu-SP com os antígenos *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, e *Rickettsia bellii* e armazenadas em freezer a -20°C . Antes da sua utilização foram descongeladas em imersão em tampão salino fosfato (PBS) por de 10 minutos, secando naturalmente.

Após o descongelamento, os soros foram diluídos em PBS inicialmente na diluição de 1:64. Os reativos a esta diluição foram diluídos até chegar à titulação máxima. Cada lâmina teve um controle positivo e negativo. Feito isso, foi inserido em cada orifício das lâminas 20 μL dos soros. As lâminas foram incubadas em câmaras úmidas em estufas bacteriológicas a 37°C durante o período de 30 minutos. A seguir, foram lavadas com tampão de lavagem e secas naturalmente.

Dando sequência ao processo, foi utilizado um conjugado anti equino diluído na proporção de 1:256 em PBS e colocado 20 μL nos orifícios das lâminas que foram incubadas novamente, utilizando-se o processo acima descrito. (Souza et al 2008)

Em seguida as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem e simultaneamente corada com azul de Evans com dois banhos de 15 minutos cada e secas naturalmente. Após este processo as lâmina foram montadas utilizando-se glicerina tamponada e cobertas por lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência à luz ultravioleta com aumento de 40 vezes. Foram considerados reagentes os orifícios que apresentaram pontos fluorescentes mais ou menos uniformes com formas cocóides, bacilares ou cocobacilares.

Os dados foram armazenados em planilha Excel e os resultados foram discutidos dispostos em tabelas e gráficos.

- *Processamento dos carrapatos:*

Os carrapatos coletados foram enviados para o laboratório da Sucen, onde foram identificados segundo chaves taxonômicas e processados individualmente, quando ainda vivos, pelo teste de hemolinfa. Este teste consiste na amputação das patas distais com coleta de uma ou duas gotas de hemolinfa sobre uma lâmina, em seguida fixada em acetona PA e corada pela técnica de Gimenez. A leitura destas lâminas foi feita no microscópio óptico, sendo consideradas positivas, as hemolinhas que continham dentro das células, estruturas semelhantes à cocobacilos e/ou bastonetes corado em vermelho. Os carrapatos que apresentaram estas estruturas foram armazenados em álcool isopropílico 100%, ou ainda preservados em nitrogênio líquido para posterior realização do PCR. (Burgdorfer, 1970)

- *Extração de DNA dos Carrapatos*

A extração do material genético dos carrapatos foi realizada no laboratório da Sucen em São Paulo e se deu a partir de secção da metade do carrapato, com o auxílio de pinças e de lâminas de bisturi descartáveis, conforme protocolo do fabricante para o isolamento de DNA dos carrapatos.

O DNA extraído foi amplificado por meio da PCR (utilizando-se um Kit comercial PCR Master Mix (Qiagen®), utilizando uma reação duplex contendo dois pares de iniciadores gêneros específico, um que amplifica uma sequência do gene da proteína citrato sintase (glta) e outro que amplifica uma sequência do gene da proteína interna de membrana, 17 KDa (17KDa omp), ambas do gênero específico (Quadro 2).

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de poliacrilamida 2% e corados por brometo de etílio e observado em luz ultravioleta.

Quadro 2. Sequência dos iniciadores e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR dos carrapatos coletados, Bacia do rio Piracicaba, 2012-2013.

Gene	Óligos	Sequência dos óligos
1	CS-62F	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT
2	CS-462R	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT
3	CS-922F	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT
4	CS-239F	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT
5	CS-1069R	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT
6	190.70F-A1	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA
7	190.602R-A2	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT

- *Sequenciamento do DNA Genômico dos Isolados*

Não foi realizado o sequenciamento do DNA dos carrapatos pois a totalidade dos investigados foram negativos ao PCR.

3.7 Questões éticas

O projeto foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da FCM/Unicamp processo CEP: 1192/2011 e SISBIO processo 35154-3.

Não houve identificação e divulgação de dados pessoais de nenhum paciente notificado por FMB bem como nenhuma propriedade investigada.

4. RESULTADOS

Foram coletadas 504 amostras de sangue de equinos nos arredores dos pontos da investigação, das quais, 36,3% foram reagentes, coletados de 183 indivíduos, 60,1% de áreas com notificação e 39,9% em áreas sem notificação de casos humanos. Nos 4 áreas com notificação de casos humanos a soropositividade da RIFI foi de 44,5% (110 de 247 equinos), e nas áreas sem notificação a soropositividade foi de 28,4% (73 de 257 equinos), como pode ser observado na tabela 1.

Os soros também foram testados para *R. belli* e *R. parkeri*, sendo que dos 183 soros reagentes para *R. rickettsii* 46,9% também foram reagentes para *R. belli* e 42,6% para *R. parkeri*. Os resultados para *R. belli* e *R. parkeri* não foram superiores a 4 vezes o resultado para *R. rickettsii*, com exceção de um soro de uma fêmea de 8 anos de Piracicaba com sorologia de 1/64 para *R. rickettsii* e 1/1024 para *R. parkeri*, como pode ser observado na tabela 2. Chama atenção a soropositividade dos equinos nas áreas sem registro de casos de 39,9%.

Não foram encontrados carrapatos nos equinos no momento da coleta do soro.

Tabela 1. Resultados da Sorologia dos Equinos, por meio de técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI), bacia do rio Piracicaba, 2012-2013.

	Local de coleta	Número de amostras	Idade	Sorologia
Municípios com notificação	Jaguariúna	57	2 – 15	43,9% 25 reagentes
	Amparo	58	2 - 28	41,4% 24 reagentes
	Valinhos	68	1 ½ - 17	38,2% 26 reagentes
	Piracicaba	64	1 - 30	54,7% 35 reagentes
Subtotal		247		44,5% 110 reagentes
Municípios sem notificação	Rio Claro	62	2 - 25	43,5% 27 reagentes
	Bragança Paulista	66	2 - 30	53% 35 reagentes
	Atibaia	63	2 - 25	9,5% 6 reagentes
	São Pedro	66	2 - 27	6,1% 5 reagentes
Subtotal		257		28,4% 73 reagentes
Total		504		36,3% 183 reagentes

Tabela 2. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, na bacia do rio Piracicaba, 2012-2013.

	Local de coleta	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. parkeri</i>
Municípios com notificação	Jaguariúna	1/64 (13)	1/64 (6)	1/64 (7)
		1/128 (6)	1/128 (5)	1/128 (3)
		1/256 (5)	1/256 (1)	
		1/512 (1)		
	Amparo	1/64 (11)	1/64 (6)	1/64 (12)
		1/128 (6)	1/128 (4)	1/256 (1)
		1/256 (7)	1/256 (4)	
			1/512 (2)	
	Valinhos	1/64 (5)	1/64 (17)	1/64 (12)
		1/128 (6)	1/128 (4)	1/128 (2)
		1/256 (15)		1/256 (2)
				1/512 (2)
Piracicaba	*1/64 (17)	1/64 (3)	1/64 (7)	
	1/128 (7)	1/128 (3)	1/128 (2)	
	1/256 (5)	1/256 (5)	1/256 (4)	
	1/512 (6)	1/512 (1)	1/512 (1)	
		*1/1024 (1)		
Municípios sem notificação	Rio Claro	1/64 (13)	1/64 (5)	1/64 (9)
		1/128 (6)	1/128 (2)	1/128 (1)
		1/256 (8)	1/512 (1)	
	Bragança Paulista	1/64 (11)	1/64 (4)	1/64 (7)
		1/128 (2)	1/128 (1)	1/128 (1)
		1/256 (14)		
		1/512 (5)		
	Atibaia	1/64 (1)	1/64 (4)	1/64 (2)
		1/128 (3)	1/128 (2)	1/128 (1)
		1/256 (2)		
	São Pedro	1/64 (2)	1/64 (4)	1/64 (1)
		1/128 (2)	1/128 (1)	
1/256 (1)				

*Soro de 1 equino em Piracicaba que teve sorologia 1/64 para *R. rickettsii* e 1/1024 para *R. parkeri*

As espécies de carrapatos coletadas e identificadas, segundo área de coleta, estão apresentadas na tabela 3. Nos municípios com notificação o tipo de vegetação encontrada foi mata ciliar, mata remanescente, pasto sujo, pasto limpo e pomar, como apresentado na tabela 4.

Em Amparo, os vetores foram coletados na zona rural em mata ciliar onde havia a presença de capivaras, equinos, cães e animais silvestres. Foram coletados somente carrapatos adultos, 1 carrapato da espécie *A. dubitatum* e 9 carrapatos da espécie *A. cajennense*.

Em Jaguariúna, os vetores foram coletados na zona rural em mata remanescente e pomar. Havia a presença de capivaras, equinos, cães e animais silvestres. Foram coletados somente carrapatos adultos, 1 carrapato da espécie *A. dubitatum* e 3 carrapatos da espécie *A. cajennense*.

Em Piracicaba, os vetores foram coletados na zona rural em mata remanescente e pasto sujo. Havia a presença de capivaras, cães e animais silvestres. Foram coletados carrapatos adultos e ninfas, 7 carrapatos da espécie *A. dubitatum*, 51 da espécie *A. cajennense* e 161 ninfas.

Em Valinhos, os vetores foram coletados na zona rural em mata remanescente, pasto limpo e pomar. Havia a presença de capivaras e de animais silvestres. Foram coletados carrapatos adultos e ninfas, 2 carrapatos da espécies *A. dubitatum*, 9 carrapatos da espécie *A. cajennense* e 4 ninfas.

Tabela 3. Espécies de carrapatos identificados e resultados de investigação de infecção pela *Rickettsia* spp em 4 municípios com notificação e quatro sem notificação de casos humanos, na bacia do rio Piracicaba, SP, 2012-2013.

	Área de estudo	Espécies	Frequência	% Totais*
Municípios com Notificação	Amparo	<i>A. dubitatum</i>	1	
		<i>A. cajennense</i>	9	
	Jaguariúna	<i>A. dubitatum</i>	1	
		<i>A. cajennense</i>	3	
	Piracicaba	<i>A. dubitatum</i>	7	
		<i>A. cajennense</i>	51	
		<i>Ninfas</i>	161	
	Valinhos	<i>A. dubitatum</i>	2	
		<i>A. cajennense</i>	9	
		<i>Ninfas</i>	4	
Total (n=248)		<i>A. Dubitatum</i>	11	4,4
		<i>A. cajennense</i>	72	29
		<i>Ninfas</i>	165	66,5
Municípios sem Notificação	Rio Claro	0		
	Bragança	<i>Ninfas</i>	55	
	Paulista			
	São Pedro	0		
	Atibaia	<i>A. dubitatum</i>	2	
		<i>A. cajennense</i>	41	
		<i>Ninfas</i>	132	
Total (n=244)		<i>A. dubitatum</i>	2	0,8
		<i>A. cajennense</i>	55	22,5
		<i>Ninfas</i>	187	76,6

* As ninfas não foram identificadas segundo espécie

Foram encontrados 492 carrapatos, sendo 13 (2,6%) *A. dubitatum*, 127 (25,8%) *A. cajennense* e 352 (71,5%) ninfas. Nas áreas com notificação de casos humanos encontrou-se um total de 248 (50,4%) do total de carrapatos, sendo 11 (4,4%) *A. dubitatum*, 72 (29,%) *A. cajennense* e 165 (66,5%) ninfas. Nas áreas sem notificação de casos humanos encontrou-se um total de 244 (49,5%) do total de carrapatos, sendo 2 (0,8%) *A. dubitatum*, 55 (22,5%) *A. cajennense* e 187 (76,6%) ninfas.

Em Rio Claro e São Pedro não foram encontradas nenhum estágio evolutivo de carrapatos, ressaltando o fato de serem áreas sem transmissão, possivelmente sem circulação de carrapatos.

A técnica PCR para a identificação de infecção pela *R. rickettsii* foi negativa em todas as amostras de carrapatos.

A tabela 4 apresenta dados ambientais encontrados nos locais investigados. Em todos os locais foram observados animais domésticos e silvestres potenciais reservatórios da doença, com exceção de São Pedro.

Tabela 4. Dados Ambientais das áreas com e sem notificação de casos humanos de FMB na Bacia do Rio Piracicaba, São Paulo, 2012-2013.

		Estágio vetor	Espécies	Rural Urbana	Peridomicílio	Tipo vegetação	Presença capivaras	Presença animais
Municípios com notificação	Amparo	Adultos	<i>A. cajennense</i>	Rural	Não	Mata Ciliar	Sim	Equinos
		Ninfas	<i>A. dubitatum</i>	Periurbana				Cães Animais silvestres
	Jaguariúna	Adultos	<i>A. cajennense</i>	Rural	Não	Mata remanescente, Pomar	Sim	Equinos
			<i>A. dubitatum</i>					Cães Animais silvestres
	Piracicaba	Adultos	<i>A. cajennense</i>	Rural	Não	Pasto sujo, Mata remanescente	Sim	Cães
		Ninfas	<i>A. dubitatum</i> ,					Animais silvestres
	Valinhos	Adultos	<i>A. cajennense</i>	Rural	Não	Mata Remanescente, Pasto limpo, Pomar	Sim	Animais silvestres
		Ninfas	<i>A. dubitatum</i>					
		Rio Claro	0		Periurbana	Não	Mata Ciliar	Sim
Municípios sem notificação	Bragança Paulista	Ninfas		Rural	Não	Mata Ciliar	Sim	Animais silvestres
	Atibaia	Adultos	<i>A. cajennense</i>	Rural	Não	Mata remanescente Lagoa Pasto limpo	Sim	Equinos
	Ninfas	<i>A. dubitatum</i>		Cães Animais silvestres				
	São Pedro	0		Rural	Não	Mata Ciliar	Não	Não

*Os locais de coleta coincidem com os locais prováveis de infecção (LPI) nos 4 municípios com casos registrados.

Nos municípios sem notificação o tipo de vegetação encontrada foi mata ciliar, mata remanescente, lagoa e pasto limpo, como apresentado na tabela 4.

Em Rio Claro não foi encontrada nenhuma espécie de carrapatos apesar da presença de capivaras, equinos, cães e animais silvestres. Tratava-se de zona periurbana e o tipo de vegetação era mata ciliar.

Em Bragança Paulista, os vetores foram coletados na zona rural em mata ciliar. Havia a presença de capivaras e de animais silvestres. Não foi encontrado nenhum carrapato adulto, sendo coletadas 55 ninfas.

Em Atibaia a coleta foi realizada em área rural, em mata remanescente, lagoa e pasto limpo. Havia a presença de capivaras, equinos, cães e animais silvestres. Foram coletados carrapatos adultos e ninfas, 2 carrapatos da espécie *A. dubitatum*, 41 carrapatos da espécie *A. cajennense* e 132 ninfas.

Em São Pedro, não foi encontrada nenhuma espécie de carrapatos, não havia a presença de capivaras ou de outra espécie de animais. Era zona rural e o tipo de vegetação encontrada era mata ciliar.

Os pontos de coleta apresentavam características semelhantes aos LPI's dos casos. Nos 4 municípios com notificação foram encontrados os carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. dubitatum*, e nessas áreas também havia a presença de capivaras e animais silvestres. Já nas áreas sem notificação de casos humanos apenas em Atibaia foram encontrados os carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. dubitatum* e apenas em São Pedro não havia a presença de capivaras e outros animais.

Nas oito áreas investigadas da Bacia do rio Piracicaba foram encontrados equinos, soropositivos para *R. rickettsii*, além de capivaras e outros animais silvestres envolvidos no ciclo natural da FMB, exceto em São Pedro onde não foi encontrado nenhuma animal silvestre.

A positividade sorológica (RIFI) nos 504 equinos investigados foi alta, tanto nas regiões com notificação de FMB (de 38,2 a 54,7%) como em dois municípios sem notificação de casos humanos (43,5 e 53%).

Os resultados positivos para *R. bellii* 46,9% (86) e para *R. parkeri* 42,6% (78) confirmam a reação cruzada entre as riquetsias, porém indicam reatividade apenas para a *R. rickettsii* entre os animais testados, com a exceção de um indivíduo em Piracicaba.

A soropositividade dos equinos indicam infecção pela *R. rickettsii* sugerindo a circulação deste patógeno nas áreas de estudo. A RIFI tem sido apontada como método padrão ouro para diagnóstico de rickettsioses em humanos e animais, devido a sua alta sensibilidade e especificidade, além de ser o mais disponível na rotina laboratorial. (Brasil, 2009; Fortes et al., 2011 e Souza et al., 2009a)

Vários estudos têm apresentado altas prevalências de soropositividade em equinos, particularmente em áreas endêmicas de FMB. Horta et al. (2004), obtiveram 77,3% dos equinos testados em Pedreira, área endêmica no estado de São Paulo. Sangione et al. (2005) realizaram inquérito sorológico em 3 áreas não endêmicas (Cotia, Pirassununga e Porto Feliz) do estado de São Paulo onde não havia nenhum equino reagente. Utilizaram somente antígenos de *R. rickettsii* para avaliação das espécies de riquetsias circulantes nas áreas de estudo.

O relato de sorologias positivas em equinos de áreas endêmicas sugere que estes animais, hospedeiros primários de todos os estágios evolutivos de *A. cajennense*, podem ser considerados sentinela da ocorrência de casos humanos. Assim, a evidência de infecção nestes animais pode ser utilizada para a vigilância epidemiológica da FMB, indicando a necessidade de treinamento de equipes de saúde para aumentar a suspeição diagnóstica, a notificação, bem como vigilância acarológica de espécies vetoras.

Em São José dos Pinhais, Paraná, onde foi registrado o primeiro caso de FMB em humanos no estado, Freitas et al. (2007), encontraram 7 (9,3%) equinos carroceiros de 75 amostrados, reagentes para *R. rickettsii*. Os autores chamam a atenção para a circulação de

riquétsias na região, evidenciando a exposição humana, particularmente entre equinos carroceiros, os quais, além disso, podem percorrer grandes distâncias, e dispersar carrapatos infectados.

Já em estudo realizado em Caratinga, Minas Gerais, Cardoso et al., 2007 alertaram o sistema de vigilância epidemiológica e acarológica local, pois apesar de não haver registros de casos da FMB nessa região nos últimos 12 anos, encontraram sorologia positiva em 3 de 18 equinos (17%) amostrados e detectaram DNA de riquétsias patogênicas em artrópodes vetores.

O encontro de alta soropositividade (RIFI) em equinos em áreas não endêmicas é indicativo de potencial infecção em humanos, considerando-se que a sorologia em equinos pode ser um indicador precoce de exposição aos vetores infectados. Sendo assim, a testagem sorológica em equinos pode ser uma aliada da vigilância epidemiológica da FMB em áreas onde seres humanos estão expostos, particularmente a carrapatos da espécie *A. cajennense*.

Horta et al. (2004) consideram que a baixa incidência de infecção em humanos pode ser explicada pela baixa exposição de humanos ao carrapato e também pelo fato destes geralmente retirarem os carrapatos do corpo antes deles conseguirem transmitir a bactéria por meio da saliva. Por outro lado, a subnotificação de casos humanos, bem como o não diagnóstico da doença em áreas onde nunca (ou raramente no passado) foi notificado um caso de FMB pode explicar a aparente ausência de registros da doença em áreas com comprovada circulação da *R. rickettsii*, como evidenciado neste estudo.

Alguns autores não encontraram riquétsias circulantes em nenhum soro dos equinos testados em áreas não endêmicas, reforçando o papel sentinela destes animais, aconselhando a pesquisa de soros de equinos como método útil em áreas onde humanos estão expostos a *A. cajennense* (Cardoso et al., 2007). A reatividade em equinos em áreas não endêmicas não foi registrada no presente estudo, embora Atibaia e São Pedro tenham apresentado baixas prevalências de sororeatividade, 6,1% e 9,5%, respectivamente, colocando em alerta a vigilância da doença nestes locais. Por outro lado Rio Claro e Bragança Paulista apresentaram valores tão altos quanto nas áreas reconhecidamente endêmicas.

Os carrapatos encontrados foram das espécies *A. cajennense*, *A. dubitatum*, além de ninfas, pelo método de arrasto de flanela e armadilha de gelo seco, como esperado na região. A pesquisa em diferentes meses do ano obteve resultados compatíveis com o esperado considerando-se a sazonalidade dos diferentes estágios do vetor refletindo-se no ciclo da doença (Pinter, 2009; Labruna, 2006; Zsabó et al., 2013).

Neste estudo foram encontrados resultados negativos para infecção pela riquetsia em todos os carrapatos, como também observado por Sangione et al. (2005) em outras áreas do estado de São Paulo. Labruna et al. (2008) observaram que *A. cajennense* é parcialmente refratário à infecção por *R. rickettsii*, quando comparado com outras espécies de carrapatos.

Em todos os municípios com notificação de casos humanos foi encontrado *A. cajennense*, que tem como hospedeiro primário principalmente os equinos, pois a maioria da população desta espécie vetora se alimenta em seus hospedeiros primários (Horta et al., 2004). Sangioni et al. (2005), consideram equinos os principais hospedeiros de *A. cajennense* no estado de São Paulo, reforçando que estes animais são excelentes sentinelas para a manutenção de FMB.

Apesar de não ter sido encontrado nenhum carrapato em Rio Claro, área não endêmica para FMB, 43,5% das amostras coletadas dos equinos foram reagentes para *R. rickettsii*. Evidencia-se a importância da vigilância epidemiológica no município, já que a presença de animais soropositivos, presença de capivaras, cães e animais silvestres. Sugerem risco da doença humana. Alguns autores sugerem que os animais soropositivos vivendo em condições ambientais favoráveis para carrapatos, nas proximidades de rios e animais silvestres como capivaras podem servir como reservatórios de *R. rickettsii* (Freitas et al., 2010 e Batista et al., 2010)

Por outro lado, vários estudos consideram a capivara importante hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* em carrapatos da espécie *A. cajennense* aumentando o risco de disseminação da doença (Fortes et al., 2011 e Souza et al., 2009b).

Neste estudo os resultados das sorologias em equinos não se comportou como esperado, indicando ou precedendo a infecção humana. Chamam a atenção as titulações relativamente baixas em todos os municípios estudados, sugerindo infecção antiga e circulação de riquetsias não recente nas áreas de estudo.

Algumas limitações podem ser apontadas neste estudo, entre elas a coleta de carrapatos nos meses de março e abril em apenas cinco municípios, porém não em dois deles de áreas não endêmicas (agosto e novembro). Embora esta agenda de coleta não tenha impacto nos resultados de sorologias dos equinos, certamente dificultou o encontro de formas adultas e a identificação de espécies de carrapatos em Bragança Paulista e Atibaia.

A investigação de apenas oito pontos na bacia não permite a avaliação mais aprofundada de padrões ambientais envolvidos na circulação de riquétsias. Outros estudos com maior cobertura da região e coleta de dados ambientais poderiam facilitar a compreensão sobre os motivos da transmissão humana em algumas regiões e não em outras, nas últimas décadas.

De qualquer forma, fica o desafio de se aumentar a suspeição e notificação da doença por parte das equipes de saúde dos municípios, nos quais as condições ecológicas da circulação de riquétsias do grupo da febre maculosa e os indicadores sentinelas, como a soropositividade em equinos, sugiram risco de infecção humana.

6. CONCLUSÃO

- Foi encontrada alta soroprevalência (RIFI) de *R. rickettsii* em equinos na região com registro de casos humanos que variaram entre 38,2% a 54,7%, e também nos municípios sem registros de FMB, com prevalências entre 6,1% a 53%. Estes resultados alertam para a circulação de *R. rickettsii* em áreas conhecidas como não endêmicas para FMB.
- Embora não se tenha observado contraste na soropositividade de equinos de regiões com e sem infecção humana, os resultados indicam circulação de *R. rickettsii* e de forma geral, a presença predominante de carrapatos *A. cajennense*.
- Não foi encontrada evidência de infecção por outras espécies de riquetsias além da *R. rickettsii* na quase totalidade dos equinos investigados, descartando possíveis reações cruzadas, com exceção de um único animal em Piracicaba com título de 1/64 para *R. rickettsii* e 1/1024 para *R. parkeri*.
- Os equinos investigados apresentam titulações RIFI relativamente baixas sugerindo infecção antiga dos equinos e circulação de riquetsias não recente nas regiões de estudo.
- Foi encontrado alto percentual de carrapatos da espécie *A. cajennense* nas áreas com e sem notificação de casos de FMB. Foi baixa a porcentagem de carrapato *A. dubitatum* em ambas as áreas.
- Todos os carrapatos foram negativos na identificação de *R. rickettsii* pela técnica de PCR, confirmando a dificuldade desta identificação, já apontada outros pesquisadores.
- O aumento da suspeição em diagnóstico da FMB, bem como na vigilância epidemiológica são particularmente indicados nos municípios sem notificação de casos e com altas soroprevalência de anticorpos anti-*R. rickettsii*.

- Outros estudos focando aspectos ambientais da bacia do rio Piracicaba, bem como das formas de ocupação do solo, do trabalho e lazer das comunidades em áreas potencialmente de risco podem contribuir para uma maior compreensão sobre a doença.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A.T.S.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. Life cycle of females of *Amblyomma cooperi* (Nuttal & Waburton, 1908) (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v.53, n.3, p.316 - 320, 2001.

ANGERAMI, R. N.; OLIVEIRA MORAES, E.; KATS, G.; SILVA, L. J. Brazilian spotted fever in a paediatric age-segment in the state of São Paulo, southeastern Brazil, 2003-2006. **European Society of Clinical Biology and Infectious diseases.** v. 15, apr. 2009.

ANGERAMI, R. N.; CÂMARA, M.; PACOLA, M. R.; REZENDE, R. C. M.; DUARTE, R. M. R.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S.; SANTOS, F. C. P.; LEITE, R. M.; KATZ, G.; SILVA, L. J. Features of Brazilian Spotted Fever in two diferente endemic áreas in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 3, 2012.

BALLESTER, M. V. R. Características da paisagem e qualidade da água na bacia do rio Piracicaba. **Coletâneas do “Notícias Piracema: a bacia do rio Piracicaba”**, p. 67-73, 2001.

BATISTA, F.G.; SILVA, D.M.; GREEN, K.T.; TEZZA, L.B.L.; 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 de parasitologia Veterinária.** v. 19, n. 4, p. 205-209, out.-dez. 2010.

BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO PAULISTA. **Bepa suplemento.** Febre Maculosa. São Paulo, v. 8, n. 1, out. 2011.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica/ Ministério da saúde, Secretaria de Vigilância em saúde. 7. Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009, 813 p.

BRITES-NETO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; BRASIL, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F.; VERÍSSIMO, C. V.; BARBIERI, A. R. M.; LABRUNA, M. B. Environmental

infestation and rickettsial infection in ticks in na área endemic for Brazilian spotted fever. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 22, n. 3, p. 367-372, jul.-set., 2013.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene** v. 19, p. 1010-1014, 1970.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted Fever in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 19, p. 103-108, 1939.

CARDOSO, L. D.; FREITAS, R. N.; MAFRA, C. L.; NEVES, C. V. B.; FIGUEIRA, F. C. B.; LABRUNA, M. B.; GENNARE, 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. **Caderno de Saúde Pública**. v. 22, n. 3, p. 495-501, mar. 2006.

COMITÊS PCJ. COMITÊ DAS BACIAS HIDROGRÁFICAS DOS RIOS PIRACICABA, CAPIVARI E JUNDIAÍ E COMITÊ DA BACIA HIDROGRÁFICA DOS RIOS PIRACICABA E JAGUARÍ. Disponível em <http://www.comitepcj.sp.gov.br/comitespcj.htm> > Data de acesso em 20/08/2013.

DEL GUERCIO, V.M.F.; ROCHA, M.M.M.; MELLES, H.H.B.; LIMA, V.C.L.; PIGNATTI, M.G. Febre Maculosa no Município de Pedreira, SP, Brasil. Inquérito Sorológico. **Revista da Sociedade Brasileira de medicina Tropical**. v. 30, n. 1, p. 47 – 52, jan. – fev. 1997.

FERRAZ, K. M. P. M. B.; FERRAZ, S. F. B.; MOREIRA, J. R.; COUTO, H. T. Z.; VERDADE, L. M. Capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analyses. **Journal of Biogeography**, v. 34, p. 223-230, 2007.

FERRAZ, K. M. P. M. B.; PETERSON, A. T.; SCACHETTI-PERERIRA, R.; VETORAZZI, C. A.; VERDADE, L. M. Distribution of capybaras in a agroecosystem, southeastern Brazil, based on ecological niche modeling. **Journal of Mammalogy**, v. 90, n. 1, p. 189-194, 2009.

FONSECA, A. H. Sorologia em Animais Sentinelas: *Borrelia* spp e *Rickettsia rickettsii*. In: I SIMPÓSIO ESTADUAL DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS, 2009, Campinas. *Anais...*p. 54-56.

FREITAS, M. C. D. O. Detecção de Rickettsias do grupo da febre maculosa em cães e equinos em São José dos Pinhais, PR. Curitiba, 2007. [Dissertação de Mestrado – Curso de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias da UFPR].

FREITAS, M. C.; GRYCAJUK, M.; MOLENTO, M. B.; BONACIN, J. LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. DE C.; MORAES-FILHO, J.; DECONTO, I.; BIONDO, A. W.; Brazilian Spotted Fever in cart horses in a non-endemic área in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Brasileira**, Jaboticabal, v. 19, n. 2, 130-131, abr.-jun. 2010.

FREITAS, S. F.; SANTOS, L. C.; CUBAS, Z. F.; BARROS-FILHO, I. R.; BIONDO, A. W.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B.; MOLENTO, M. B. Anti-*Rickettsia* spp antibodies in free-ranging and captive capybaras from Southern Brazil. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, n. 11, p. 101 –1018, nov. 2011.

GALVÃO, M. A. M.; SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M. M.; CALIC, S. B.; SOUZA, R.; BACELLAR, F. Rickettsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Revista de Saúde Pública**, v. 39, n. 5, p. 850-856, 2005.

GUEDES, E.; LEITE, R. C. Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Revista Brasileira de parasitologia Veterinária**. v. 17, p. 78-82, 2008. Suplemento 1.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PACHECO, R. C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from na área endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 20, n. 4, p. 308-311, out.-dez., 2011.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; VENZAL, J. M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J.E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Kock, 1844: hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary parasitology**. v. 113, p. 273-288. doi: 10.1016/S0304-4017(03)000883-9.

HORTA, M. C. Pesquisa de infecção por riquetsias do grupo da febre maculosa em humanos, equídeos, caninos e em diferentes estádios de vida de *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do estado de São Paulo. São Paulo, 2002. [Tese de doutorado – Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da USP].

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.; SHUMAKER, 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. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 61, n.1, p. 93 – 97, 2004.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. 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. 109-118, 2009.

HORTA, M. C.; SABATINI, G. S.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWSKA, M.; CANAL, R. B.; PACHECO, R. C.; MARTINS, T. F.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia belli* and *Rickettsia parkeri* and evaluation the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**. v. 10, n. 10, 2010.

KATZ, G.; CAMARGO NEVES, V. L. F.; ANGERAMI, R.N.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa brasileira no estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, 4-13, 2009.

LABRUNA, M.B. Aspectos da biologia e epidemiologia dos carrapatos de equinos no Estado de São Paulo. São Paulo, 2000. [Tese de Doutorado – Curso de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada a Zoonoses da USP].

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, p. 90-98, 2004a.

LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; TEIXEIRA, R.H.F. Life cycle of *Amblyomma cooperi* (Acari: Ixodidae) using capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as hosts. **Experimental and Applied Acarology**, v.32, p.79-88, 2004b.

LABRUNA, M. B. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. In: I SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ACAROLOGIA, Viçosa, 2006. Universidade Federal de Viçosa, *Anais...*, p. 63-78.

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, 1156-1159, nov. 2008.

LABRUNA, M. B.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F. SOARES, H. S.; CABRERA, R. R.; cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology*, v. 54, n. 1, 41 – 19, mai. 2011.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, V. S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. N.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUZA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011.

LARA, L.B.L.S.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L.A.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P.B.; KRUSCHE, A.; AYERS, G.P.; FERRAZ, E.S.B.; BALLESTER, M.V. Chemical composition of rain water and anthropogenic influences in the Piracicaba River basin, southeast Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 35, p. 4937–4945, 2001.

LEMOS, E. R.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A.; CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the survey of dogs and horses in an endemic area in the State of São Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v.38 n. 6, 427-430, nov-dez. 1996a.

LEMOS, E.R.S.; MELLES, H.H.B.; COLOMBO, S. et al. Primary isolation of spotted fever group rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochoerus hydrochoeris* in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.91, n.3, p.273-275, 1996b.

LIMA, V.L.C.; SOUZA, S.S.L.; SOUZA, C.E.; VILELA, M.F.G.; PAPAORDANOU, P.M.O.; DEL GUÉRCIO, V.M.F.; ROCHA, M.M.M.; Situação da Febre maculosa Brasileira na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. **Caderno de Saúde pública**. Rio de Janeiro, v. 19, n. 1. P. 331-334, jan-fev. 2003.

MARTINELLI, L.A.; BALLESTER, M.V.; KRUSCHE, A.V.; VICTORIA, R.L.; CAMARGO, P.B.; BERNARDES, M.; OMETTO, J.P.H.B. Landcover changes and k13C composition of riverine particulate organic matter in the Piracicaba River Basin (Southeast region of Brazil). **Limnology and Oceanography**, v. 44, p. 1826–1833, 1999.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**. v. 1, p. 75-99, 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 and zoonotic Diseases**. v.9, n. 1, 73-78, 2009.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D.G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; COSTA, F.B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. Epidemiology of Brazilian Spotted Fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**. v. 139, p. 1283-1300, 2012.

PARKER, R. R.; observations of na infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**. v. 54, p. 1482-1484, 1939.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B. Ocorrência do carrapato *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae) em cães de uma localidade rural no Município de Mogi das Cruzes, Estado de São Paulo, Brasil. In: Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2002, Rio de janeiro, 2002.

PINTER, A.; DIAS, R. A.; GENNARI, S. M.; LABRUNA, M. B.; Study of the sezonal dynamics, life cycle and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Jornal of Medical Entomology**. v. 41, n. 3, p. 324-332, 2004.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia belli* 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. Carrapatos e Riquetsias: Vigilância e Controle no estado de São Paulo.

In: I SIMPÓSIO ESTADUAL DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS, 2009, Campinas. *Anais...*p. 61-62.

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, LS. Typho Exanthemático de São Paulo. Sociedade Imprensa Paulista, 1932. São Paulo.

PREFEITURA MUNICIPAL DE AMPARO. Disponível em <<http://www.amparo.sp.gov.br/>> data de acesso em 28/08/2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE ATIBAIA. Disponível em <<http://atibaianovo.com.br/>> Data de acesso em 28/08/2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE BRAGANÇA PAULISTA. Disponível em <<http://braganca.sp.gov.br/v2/>>Data de acesso em 28/08/2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE JAGUARIÚNA. Disponível em <<http://www.jaguariuna.sp.gov.br/portaljag/>> Data de acesso em 28/08/2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE PIRACICABA. Disponível em <<http://www.piracicaba.sp.gov.br/>> Data de acesso em 28/08/2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE RIO CLARO. Disponível em <<http://www.rioclaro.sp.gov.br/>> Data de acesso em 28/08/2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE SÃO PEDRO. Disponível em <<http://www.saopedro.sp.gov.br/>> Data de acesso em 28/08/2013.

PREFEITURA MUNICIPAL DE VALINHOS. Disponível em <<http://www.valinhos.sp.gov.br/portal/index.php>> Data de acesso em 28/08/2013.

RAOULT, D.; PAROLA, P.; PADDOCK, C.D. Tick-Bourne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases challenging Old Concepts. **American Society for Microbiology**. v. 18, n. 4, p. 719-756, 2005.

SÁ DEL FIOL, F.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; FILHO, S. B.; A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, n. 6, jun. 2010.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SSCHUMAKER, 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, fev. 2005.

SAVINA, S. A. L. S. Ecologia e técnicas de amostragem de ixodídeos em áreas endêmicas para febre maculosa brasileira na região de Campinas – SP. Campinas, 2004. [Dissertação de Mestrado – Curso de Pós Graduação em Parasitologia da Unicamp].

SAVINA, S. A. L. S.; SOUZA, C. E.; NETO, E. J. R.; PRADO, A. P. Dinâmica Sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para a febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887-891, mai-jun, 2006.

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE DE SÃO PAULO. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof. Alexandre Vranjac”. Secretaria de estado da Saúde de São Paulo. Disponível em <http://www.cve.saude.sp.gov.br/htm/zoo/fm_lpi.htm >_Data de acesso em 20/08/2013.

SECRETARIA DO ESTADO DE SAÚDE, SUPERINTENDÊNCIA DE ENDEMIAS DE SÃO PAULO. Manual de Vigilância Acarológica do estado de São Paulo. São Paulo, 2002. 44 p.

Serviço Autônomo de Águas e Esgotos. SAAE. Bacias Hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá. Serviço Autônomo de Águas e Esgotos. Indaiatuba, 2004. Disponível em <http://www.saae.sp.gov.br/arquivos/as_bacias_hidrograficas_dos_rios_piracicaba.pdf> data de acesso em 30/08/2013.

SILVA COSTA, L. F.; NUNES, P. H.; LABRUNA, M. B.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Distribution of *Rickettsia rickettsii* in ovary cells of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille1806) (Acari: Ixodidae). **Parasites & Vectors**, v. 4. 2011. Disponível em <<http://www.parasitesandvectors.com/content/4/1/222>>. Data de acesso em 9 de out. 2013.

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

SOUZA, S.S.A.L. et al. Aspectos ecológicos da febre maculosa: variação sazonal da fase não parasitária de ixodídeos na mata ciliar da região de Campinas. [Apresentado ao XXI Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Rio de Janeiro, 2002].

SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; NETO, E. J. R.; PRADO, A. P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**. v. 36, n. 3, p. 887-891, mai-jun., 2006.

SOUZA, C. E.; SOUZA, S. S. L.; LIMA, V. L. C.; CALIC, S. B.; CAMARGO, M. C. G. O.; SAVANI, E. S. M. M.; D'AURIA, S. R. N.; LINHARES, A. X.; YOSHINARI, N. H. Serologic Identification of *Rickettsia ssp* from the spotted fever group in capybaras in the region of Campinas, SP, Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p.1694-1699, 2008.

SOUZA, C. E.; A capivara como hospedeiro amplificador da *Rickettsia*. In: I SIMPÓSIO ESTADUAL DE DOENÇAS TRANSMITIDAS POR CARRAPATOS, 2009, Campinas. *Anais...*p. 45-46.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J. ORGZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S.S; BORBA, R.C.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 6, n. 161, 116-121, abr. 2009.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER. A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted fever tick vectors in Brazil. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 27, jul. 2013.

WALKER, D. H. Rock Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. **Clinical Infectious Disease**. v. 2, p. 227-240, 1989.

ZAVALA-VELAZQUEZ, J. E.; YU, X. W.; WALKER, D. H.; unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 157-159, 1996.

Anexo 1. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, Jaguariúna, SP, 2012-2013.

JAGUARIÚNA			
Equinos	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. parkeri</i>
1	1/512	Não reagente	1/64
2	1/64	1/128	Não reagente
3	1/256	1/64	Não reagente
4	1/64	1/128	1/64
5	1/64	1/128	1/64
6	1/64	1/128	1/64
7	1/128	1/256	Não reagente
8	1/128	1/128	Não reagente
9	1/64	Não reagente	Não reagente
10	1/64	1/64	Não reagente
11	1/64	Não reagente	Não reagente
12	1/64	1/64	1/64
13	1/128	1/128	1/64
14	1/256	1/64	1/128
15	1/64	1/64	Não reagente
16	1/64	1/64	1/128
17	1/128	Não reagente	Não reagente
18	1/128	Não reagente	Não reagente
19	1/256	Não reagente	Não reagente
20	1/256	Não reagente	Não reagente
21	1/256	Não reagente	Não reagente
22	1/128	Não reagente	1/128
23	1/64	Não reagente	1/64
24	1/64	Não reagente	Não reagente
25	1/64	Não reagente	Não reagente

Anexo 2. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, Amparo, SP, 2012-2013.

AMPARO			
Equinos	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. parkeri</i>
1	1/128	1/256	1/64
2	1/128	1/128	1/64
3	1/256	Não reagente	Não reagente
4	1/128	Não reagente	Não reagente
5	1/128	1/1024	Não reagente
6	1/256	1/512	Não reagente
7	1/128	1/128	1/64
8	1/64	1/128	1/64
9	1/256	1/256	1/256
10	1/256	1/256	Não reagente
11	1/64	1/256	Não reagente
12	1/64	1/64	1/64
13	1/64	1/128	1/64
14	1/256	1/64	1/64
15	1/64	Não reagente	1/64
16	1/64	Não reagente	1/64
17	1/64	Não reagente	Não reagente
18	1/256	Não reagente	Não reagente
19	1/64	1/64	Não reagente
20	1/128	1/64	1/64
21	1/256	Não reagente	Não reagente
22	1/64	1/64	1/64
23	1/64	1/512	Não reagente
24	1/64	1/64	1/64

Anexo 3. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, Valinhos, SP, 2012-2013.

VALINHOS			
Equinos	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. parkeri</i>
1	1/128	1/64	1/64
2	1/256	1/64	1/64
3	1/256	Não reagente	Não reagente
4	1/64	Não reagente	Não reagente
5	1/256	1/64	1/64
6	1/256	1/64	1/64
7	1/256	1/64	1/512
8	1/64	Não reagente	Não reagente
9	1/256	1/64	Não reagente
10	1/256	Não reagente	Não reagente
11	1/64	1/64	1/128
12	1/256	1/64	1/64
13	1/256	1/64	1/256
14	1/256	1/64	1/128
15	1/256	1/64	1/64
16	1/128	1/64	1/64
17	1/128	1/128	1/64
18	1/128	1/64	1/64
19	1/256	1/64	1/64
20	1/256	1/128	1/512
21	1/256	1/64	1/64
22	1/128	1/64	1/256
23	1/64	Não reagente	Não reagente
24	1/256	1/64	Não reagente
25	1/64	1/128	Não reagente

Anexo 4. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, Piracicaba, SP, 2012-2013.

PIRACICABA			
Equinos	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. belli</i>	<i>R. parkeri</i>
1	1/256	Não reagente	1/64
2	1/128	Não reagente	1/256
3	1/512	1/64	1/64
4	1/64	1/256	1/128
5	1/128	1/256	Não reagente
6	1/128	Não reagente	1/64
7	1/64	Não reagente	Não reagente
8	1/256	Não reagente	Não reagente
9	1/64	1/256	Não reagente
10	1/64	1/128	1/64
11	1/64	Não reagente	Não reagente
12	1/128	1/64	Não reagente
13	1/512	Não reagente	1/256
14	1/512	Não reagente	Não reagente
15	1/512	1/256	Não reagente
16	1/128	1/512	Não reagente
17	1/64	1/128	Não reagente
18	1/64	Não reagente	Não reagente
19	1/64	1/64	Não reagente
20	1/64	Não reagente	Não reagente
21	1/64	1/128	Não reagente
22	1/64	Não reagente	1/256
23	1/64	Não reagente	Não reagente
24	1/64	Não reagente	Não reagente
25	1/64	1/256	1/64
26	1/64	Não reagente	Não reagente
27	1/512	Não reagente	1/64
28	1/256	Não reagente	1/128
29	1/128	Não reagente	Não reagente
30	1/512	Não reagente	1/64
31	1/128	Não reagente	Não reagente
32	1/256	Não reagente	Não reagente
33	1/64	Não reagente	1/1024
34	1/64	Não reagente	1/512
35	1/64	Não reagente	1/256

Anexo 5. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, Rio Claro, SP, 2012-2013.

RIO CLARO			
Equinos	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. parkeri</i>
1	1/256	Não reagente	1/64
2	1/64	Não reagente	Não reagente
3	1/128	1/64	Não reagente
4	1/256	Não reagente	Não reagente
5	1/128	Não reagente	Não reagente
6	1/64	1/512	Não reagente
7	1/256	1/64	1/64
8	1/256	1/128	1/64
9	1/64	1/64	1/64
10	1/128	Não reagente	Não reagente
11	1/128	Não reagente	Não reagente
12	1/256	Não reagente	Não reagente
13	1/64	Não reagente	Não reagente
14	1/64	Não reagente	1/64
15	1/64	1/128	1/64
16	1/64	Não reagente	Não reagente
17	1/256	Não reagente	Não reagente
18	1/128	Não reagente	Não reagente
19	1/64	1/64	Não reagente
20	1/128	Não reagente	Não reagente
21	1/64	1/64	1/64
22	1/256	Não reagente	1/128
23	1/64	Não reagente	1/64
24	1/64	Não reagente	Não reagente
25	1/64	Não reagente	Não reagente
26	1/256	Não reagente	Não reagente
27	1/64	Não reagente	1/64

Anexo 6. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, Bragança Paulista, SP, 2012-2013.

BRAGANÇA PAULISTA			
Equinos	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. parkeri</i>
1	1/64	Não reagente	Não reagente
2	1/128	Não reagente	Não reagente
3	1/256	Não reagente	Não reagente
4	1/256	Não reagente	1/64
5	1/256	Não reagente	1/64
6	1/1024	1/64	1/64
7	1/256	Não reagente	Não reagente
8	1/256	Não reagente	Não reagente
9	1/512	Não reagente	Não reagente
10	1/64	Não reagente	Não reagente
11	1/256	Não reagente	Não reagente
12	1/1024	Não reagente	Não reagente
13	1/64	Não reagente	Não reagente
14	1/64	Não reagente	Não reagente
15	1/256	1/128	1/64
16	1/512	Não reagente	Não reagente
17	1/64	Não reagente	Não reagente
18	1/128	Não reagente	Não reagente
19	1/512	Não reagente	Não reagente
20	1/64	Não reagente	Não reagente
21	1/256	Não reagente	Não reagente
22	1/64	Não reagente	Não reagente
23	1/256	Não reagente	1/64
24	1/64	1/64	Não reagente
25	1/256	Não reagente	Não reagente
26	1/256	Não reagente	1/128
27	1/64	1/64	Não reagente
28	1/512	Não reagente	Não reagente
29	1/64	Não reagente	1/64
30	1/256	Não reagente	Não reagente
31	1/256	Não reagente	Não reagente
32	1/64	Não reagente	1/64
33	1/512	Não reagente	Não reagente
34	1/256	1/64	Não reagente
35	1/1024	Não reagente	Não reagente

Anexo 7. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, , Atibaia, SP, 2012-2013.

ATIBAIA

Equinos	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. parkeri</i>
1	1/128	1/64	Não reagente
2	1/256	1/64	Não reagente
3	1/256	1/64	1/64
4	1/128	1/128	Não reagente
5	1/128	1/64	1/64
6	1/64	1/128	1/128

Anexo 8. Inquérito sorológico de equinos utilizando-se reações de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para antígenos *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. bellii*, , São Pedro, SP, 2012-2013.

SÃO PEDRO

Equinos	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. bellii</i>	<i>R. parkeri</i>
1	1/256	1/64	1/64
2	1/64	1/128	Não reagente
3	1/128	1/64	Não reagente
4	1/64	1/64	1/64
5	1/128	1/64	Não reagente

