

Universidade Federal de Juiz de Fora  
Pós- Graduação em Ciências Biológicas  
Mestrado em Comportamento e Biologia Animal

Emília de Carvalho Nunes

**BIOEPIDEMIOLOGIA DE POSSÍVEIS VETORES E RIQUÉTSIAS NA  
MICRORREGIÃO DE JUIZ DE FORA, MÉDIO PARAIBUNA, MINAS GERAIS,  
BRASIL.**

Juiz de Fora

2014

Emília de Carvalho Nunes

**Bioepidemiologia de possíveis vetores e riquetsias na Microrregião de Juiz de Fora,  
Médio Paraibuna, Minas Gerais, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal, da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Erik Daemon de Souza Pinto

Juiz de Fora

2014

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Nunes, Emilia de Carvalho.

Bioepidemiologia de possíveis vetores e riquetsias na microrregião de Juiz de Fora, médio Paraibuna, Minas Gerais, Brasil. / Emilia de Carvalho Nunes. -- 2014.

54 p. : il.

Orientador: Erik Daemon de Souza Pinto

Coorientador: Gilberto Salles Gazeta

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Comportamento Animal, 2014.

1. Rickettsiaceae. 2. epidemiologia. 3. biologia molecular. 4. saúde pública. I. Pinto, Erik Daemon de Souza, orient. II. Gazeta, Gilberto Salles, coorient. III. Título.

Emília de Carvalho Nunes

**Bioepidemiologia de possíveis vetores e riquetsias na Microrregião de Juiz de Fora,  
Médio Paraibuna, Minas Gerais, Brasil.**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Comportamento e Biologia Animal,  
da Faculdade de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito  
parcial para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2014.

BANCA EXAMINADORA

---

**Dr Erik Daemon de Souza Pinto (Orientador)**

**Universidade Federal de Juiz de Fora**

---

**Dr Elizângela Guedes**

**Universidade Federal de Lavras**

---

**Dr Caio Márcio de Oliveira Monteiro**

**Pós doutorando- Universidade Federal de Juiz de Fora**

*Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por cada passo e por cada conquista da minha vida.

Aos meus pais pelo apoio incondicional, por serem os melhores ouvintes do mundo, e meu farol quando tudo parecia perdido: sem vocês eu nada seria. À minha avó, pelo carinho sempre presente, pela ajuda e pela doçura que só os olhos dela têm. À Marilda, que se tornou uma peça fundamental, minha conselheira desde o momento da inscrição até esta última etapa. Ao Rodrigo, meu amor, que esteve ao meu lado sempre com muita paciência e carinho em todos os momentos. A todos da minha família que me apoiaram nesta caminhada, obrigada!

Ao meu querido orientador Doutor Erik Daemon, que esteve lado a lado comigo nesta caminhada me orientando sempre pelo melhor caminho, o meu MUITO OBRIGADA pela amizade e dedicação.

Ao meu Co-orientador Doutor Gilberto Gazêta, me faltam palavras para agradecer todas as oportunidades e portas que você me abriu nesta jornada. Obrigada, obrigada e obrigada pela amizade.

À Doutora Elizângela Guedes sempre solícita, que nos ensinou como realizar nossas coletas, e esteve presente com muita paciência me mostrando a melhor maneira de demonstrar todo meu trabalho em forma de texto, te dou toda minha gratidão e admiração.

À Glênia, que foi parte chave para o término do trabalho, e se sentiu em Veneza durante as coletas, te dou todo meu agradecimento e minha amizade.

Ao meu companheiro de trabalho, amigo e irmão Daniel Navarro, que me ouviu, aguentou meu humor “particular” durante as altas temperaturas durante as coletas e esteve sempre ao meu lado em cada etapa do trabalho. Sem você este trabalho não estaria nem na metade, muito obrigada “Marmotinha”, pra você todo meu carinho, amizade e gratidão. Ao Tony, amigo querido, à Thaiz, minha ouvinte e parte do meu universo particular. A todos os amigos que me acompanharam nesta fase e de alguma forma possibilitaram minha chegada até aqui.

Aos inúmeros colaboradores que encontrei pelo caminho, um beijo especial para o pessoal da Fiocruz: Karen, Fernanda, “Bias”, Vini, e aos meus queridos colegas da FUNED, o que seria deste trabalho sem vocês hein?! Muito obrigada à queridíssima Ana íris Duré pela amizade, carinho e ajuda sempre imediata. Doutora Myrian Duarte pelos ensinamentos, ao Felipe Iani por possibilitar a realização dos PCRs nos meus “carrapatos do mato”, e a todo pessoal do laboratório (Maria, Paulo e Nil), todo meu carinho.

Aos nossos queridos secretários Rita e Osmar, com sua capacidade enorme de dissolver problemas e nos ajudar a qualquer momento, obrigada.

À Rô, pelo cafezinho sempre quente e o sorriso de bom dia sempre iluminando nossos dias!

## Resumo

As riquetsioses, causadas por organismos do gênero *Rickettsia*, são zoonoses presentes em todos os continentes. Com exceção de *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari* associadas, respectivamente, a pulgas e ácaros, riquetsias tem como vetores e/ou reservatórios carrapatos. No Brasil *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale* são os mais importantes vetores para humanos. O presente estudo teve por objetivo avaliar a circulação de *Rickettsia* sp. em diferentes regiões da cidade de Juiz de Fora, Minas Gerais, área endêmica para Febre Maculosa. Foram coletados e identificados 5.832 espécimes de potenciais vetores na área urbana do município. A maioria dos locais de coleta tinham casos confirmados de Febre Maculosa. A análise da presença de *Rickettsia* sp. nas amostras coletadas foi realizada pela PCR quantitativa, utilizando-se oligonucleotídeos para a amplificação do gene *ompA*, e pela PCR qualitativa, empregada para a detecção dos genes *ompA*, *gltA* e *htrA*. Doze amostras de *Amblyomma cajennense*, espécie mais frequente nesse estudo, e uma de *Rhipicephalus microplus* coletada em equino foram positivas, na PCR quantitativa, para a presença de *Rickettsia* sp. Na PCR qualitativa foi encontrado *Amblyomma cajennense*, coletado sobre equino, positivo para riquetsia do Grupo febre maculosa. A relação temporal e espacial de *A. cajennense* com equinos aponta para o ciclo enzoótico de riquetsias envolvendo essas espécies durante atividade dos focos. Sua antropofilia, potencial de transmissão e ocorrência nos focos durante investigação apontam para seu papel como vetor no ciclo antropofílico. Características inerentes ao município de Juiz de Fora potencializam a possível circulação de riquetsias na região urbana, permitindo o contato dos diferentes hospedeiros com os carrapatos, aumentando a disseminação deste vetor pelo município. Os resultados indicam a necessidade de implementação da vigilância de ambiente no município de Juiz de Fora em relação à Febre Maculosa, especialmente pelo monitoramento de *A. cajennense* e cavalos.

Palavras chave: Rickettsiaceae, epidemiologia, biologia molecular, saúde pública.

## Abstract

Rickettsial diseases caused by genus *Rickettsia* are zoonosis present in all continents. With exception of *Rickettsia felis* and *Rickettsia akari*, respectively associated to fleas and mites, the vectors and / or reservoirs of *Rickettsia* sp. are ticks. In Brazil, *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* are the most important vectors to humans. This study aims evaluate the cycles of *Rickettsia* sp. in different regions of Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, endemic area of Spotted Fever. Were collected and identified 5.832 specimens of potential vectors in the urban area, primarily in foci. The detection of *Rickettsia* sp. in the samples was analyzed by quantitative PCR using primers for amplification of *ompA* gene, and by qualitative PCR, used for detecting fragments of *ompA*, *gltA* and *htrA*. 12 samples of *Amblyomma cajennense*, species most observed in this study, and one of *Rhipicephalus microplus*, collected on horses, were positive in the quantitative PCR. *A. cajennense*, collected on equine, was positive for spotted fever group in the qualitative PCR. The temporal and spatial relationship of *A. cjennense* and horses indicate the involvement of these species in the enzootic cycle during the major activity of *Rickettsia* sp. in the foci. The anthropophily, potential of transmission and occurrence in foci, point to the role of this species as a vector in anthropophilic cycle. Inherent characteristics of the municipality can potentiate the circulation of rickettsiae in urban area, increasing the contact of hosts with tick , expanding the spread of this vector. The results indicate the need of implementation of the environmental surveillance to spotted fever in Juiz de Fora, especially by the monitoring of *A. cajennense* and horses.

Key words: Rickettsiaceae, epidemiology, molecular biology, public health.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Gel de amido assinalando (círculo vermelho) a banda formada pela eletroforese do produto amplificado para o gene <i>ompA</i> de amostra de fêmea de <i>Amblyomma cajennense</i> coletada em equino, no bairro Monte Castelo, durante investigação de caso de Febre Maculosa, em 2007.....	<b>29</b>
--	-----------

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Número de casos confirmados de Febre Maculosa no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, segundo a região e bairro (LPI), no período de 2007 a 2012.....	<b>15</b>
<b>Tabela 2</b> Primers utilizados para desenvolvimento da PCR para detecção de riquetsias.....	<b>25</b>
<b>Tabela 3</b> : Primer utilizado para desenvolvimento da PCR quantitativo para Riquetsias do grupo Febre Maculosa.....	<b>25</b>
<b>Tabela 4</b> Espécies de potenciais vetores de riquetsias coletados no ambiente e em hospedeiros, em bairros investigados para Febre Maculosa Brasileira, no Município de Juiz de Fora, no período de agosto de 2012 a setembro de 2012.....	<b>26</b>
<b>Tabela 5</b> Espécies de potenciais vetores de riquetsias coletados no ambiente e em hospedeiros, em bairros investigados para Febre Maculosa Brasileira, no Município de Juiz de Fora, no período de Novembro de 2012 a Abril de 2013.....	<b>27</b>
<b>Tabela 6</b> Espécies de potenciais vetores de riquetsias cedidos pelo centro de controle de zoonoses da PJF.....	<b>27</b>
<b>Tabela 7</b> Espécies de potenciais vetores de riquetsias coletados em hospedeiros, em bairros investigados para Febre Maculosa Brasileira, no Município de Juiz de Fora, na campanha de vacinação antirrábica realizada no dia 23 de setembro de 2012.....	<b>28</b>
<b>Tabela 8</b> : Vetores de riquetsias positivos para o gene riquetsial (ompA), coletados em hospedeiros e em vida livre, nos bairros investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de agosto de 2012 a abril de 2013.....	<b>30</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA: *Desoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucléico

DNAg: *Desoxyribonucleic Acid* - Ácido Desoxirribonucléico genômico

ECP: Estação Climatológica Principal

FMB: Febre Maculosa Brasileira

GPS: Sistema de Posicionamento Global

L.P.I: Local de Provável Infecção

NaCl: Cloreto de Sódio

Pb: Pares de bases

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PJF: Prefeitura de Juiz de Fora

SINAN: Sistema Nacional de Agravos e Notificações

UFJF: Universidade Federal de Juiz de Fora

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>1.1 Objetivos</b> .....	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Agente etiológico</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Vetores</b> .....	<b>19</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
<b>3.1 Local de estudo</b> .....	<b>22</b>
<b>3.2 Coleta de vetores</b> .....	<b>23</b>
<b>3.3 Análise Molecular</b> .....	<b>24</b>
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>26</b>
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	<b>32</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>
<b>ANEXO A:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 A (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene <i>OmpA</i> .....	<b>42</b>
<b>ANEXO B:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 G (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene <i>OmpA</i> .....	<b>43</b>
<b>ANEXO C:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra. 3980 L (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene <i>OmpA</i> .....	<b>44</b>
<b>ANEXO D:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 M (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene <i>OmpA</i> .....	<b>45</b>
<b>ANEXO E:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 N (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene <i>OmpA</i> .....	<b>46</b>
<b>ANEXO F:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 P (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene <i>OmpA</i> .....	<b>47</b>
<b>ANEXO G:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3993 G (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene <i>OmpA</i> .....	<b>48</b>

<b>ANEXO H:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3994 A (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene OmpA.....	<b>49</b>
<b>ANEXO I:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3994 B (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene OmpA.....	<b>50</b>
<b>ANEXO J:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3979 F (macho de <i>R. microplus</i> ) por Real Time para detecção do gene OmpA.....	<b>51</b>
<b>ANEXO K:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3997 A (fêmea de <i>A. cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene OmpA.....	<b>52</b>
<b>ANEXO L:</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 4073 N (pool de 8 ninfas de <i>A.cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene OmpA.....	<b>53</b>
<b>ANEXO M</b> Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 4089 N ((pool de 8 ninfas de <i>A.cajennense</i> ) por Real Time para detecção do gene OmpA.....	<b>54</b>

## 1 Introdução

Historicamente, a Febre Maculosa foi descrita pela primeira vez em 1899 por Maxcy nos EUA, que a denominou de Febre das Montanhas Rochosas (Rocky Mountain Spotted Fever) (Harden, 1990). Uma década depois, Howard Taylor Ricketts, conseguiu sucesso na transmissão da doença para porcos da Índia, identificando o carrapato como principal vetor da doença e descrevendo o agente etiológico, *Rickettsia rickettsii* (Ricketts, 1909). Durante a Segunda Grande Guerra Mundial, surgiram alguns avanços no controle das rickettsioses, como o uso de inseticidas no combate aos vetores e o advento dos antibióticos na década de 40, com resultados importantes no tratamento destas (Galvão, 1996).

A febre Maculosa Brasileira (FMB) foi primariamente descoberta por Piza em 1929, em uma área de expansão urbana, onde hoje são os bairros paulistanos de Sumaré e Perdizes (Silva e Galvão, 2004). Logo depois, foi descrita em Minas Gerais e no Rio de Janeiro (Dias e Martins, 1939). É uma doença infecciosa febril aguda, de gravidade variável, que vai desde formas leves e atípicas até formas graves, com elevada taxa de letalidade e é transmitida quando o carrapato vetor permanece aderido ao hospedeiro por um período de mínimo de 4 a 6 horas. A doença não é transmitida de pessoa a pessoa e caracteriza-se por início abrupto, febre elevada, cefaleia e mialgia e/ou prostração, com exantema máculo-papular, principalmente nas regiões palmar e plantar, que pode evoluir para petéquias, equimoses e hemorragias (Brasil, 2010).

Casos de Febre Maculosa Brasileira são descritos principalmente nos Estados de Minas Gerais (Dias e Martins, 1937; Magalhães, 1952; Galvão *et al.*, 1999), Rio de Janeiro (Gonçalves *et al.*, 1981), Bahia (Plank *et al.*, 1979), São Paulo (Melles *et al.*, 1992) e Espírito Santo (Sexton *et al.*, 1993). De 2002 a 2006 foram diagnosticados os primeiros casos de febre maculosa nos Estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (SINAN, 2013). Mais recentemente foram notificados casos de Febre Maculosa nos Estados do Mato Grosso e Ceará (SINAN, 2013). No entanto, a confirmação da espécie de *Rickettsia* envolvida nos casos fora da região sudeste, associado a fatores clínicos e epidemiológicos, sugere que pelo menos parte deles não tenha sido causado pela espécie *Rickettsia rickettsii* (Labruna, 2006).

No Brasil os casos de Febre Maculosa se concentram na Região Sudeste, com ênfase para os estados de São Paulo, que apresenta atualmente a maior prevalência da doença, com 68 casos confirmados no ano de 2012, com 54% de taxa de letalidade (Departamento de

Saúde Pública de São Paulo), e o Estado de Minas Gerais, que no período de 2007 a 2013 notificou 31 óbitos por FMB (Brasil, 2014).

Nesse mesmo período, o município de Juiz de Fora teve 13 casos confirmados de FMB, com três óbitos no ano de 2007, dois em 2008 e dois óbitos no ano de 2012. Na tabela 1 estão discriminados os casos segundo a região e bairro (LPI) que ocorreram. Devido a esta casuística, o objetivo deste trabalho foi investigar a ocorrência de riquetsias em áreas de foco de FMB na cidade de Juiz de Fora, para que uma análise mais apurada sobre a circulação da bactéria possa ser feita.

**Tabela 1:** Número de casos confirmados de Febre Maculosa no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil, segundo a região e bairro (LPI), no período de 2007 a 2012.

<b>Região</b>	<b>Bairro de Provável Local de Infecção (LPI)</b>	<b>Número de casos</b>	<b>Ano</b>
Norte	Araújo	1	2012
	Benfica	2	2012
	Cerâmica	1	2012
<b>Total</b>		<b>4</b>	
Nordeste	Granjas Bethânia	1	2007
	Santa Teresinha	2	2007/2012
<b>Total</b>		<b>3</b>	
Leste	Linhares	1	2008
	Progresso	2	2007
	Santa Rita de Cássia	2	2007/2008
<b>Total</b>		<b>5</b>	
Sul	São Geraldo	1	2008
<b>Total</b>		<b>1</b>	
<b>Total Casos</b>		<b>13</b>	

Fonte: Unidade Regional de Saúde de Juiz de Fora

**1.1 Objetivos específicos:**

- Determinar a composição da fauna de ectoparasitos potencialmente vetores de riquetsias nas áreas estudadas;
- Analisar a circulação de riquetsias em potenciais vetores e seus hospedeiros através do diagnóstico molecular;
- Caracterizar, através de sequenciamento genético, as riquetsias detectadas no ambiente biótico das áreas estudadas;
- Avaliar aspectos epidemiológicos de riquetsias circulantes, artrópodos vetores e seus hospedeiros vertebrados.

## 2 Revisão Bibliográfica

### 2.1 Agente Etiológico da Febre Maculosa

A ordem Rickettsiales está formada por duas famílias: Anaplasmataceae, que abriga espécies dos gêneros *Neorickettsia*, *Wolbachia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma* – que ocupam o compartimento intravacuolar; e Rickettsiaceae, que abriga as espécies dos gêneros *Rickettsia* e *Orientia* – que ocupam o compartimento intracitoplasmático nas células hospedeiras infectadas (Dumler *et al.*, 2001).

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias da subdivisão alfa da classe Proteobactéria, as quais são coco-bacilos gram-negativos, em associação obrigatória com as células hospedeiras localizando-se no citoplasma ou núcleo. Riquetsias patogênicas são responsáveis por várias doenças denominadas riquetsioses, caracterizadas como zoonoses, com envolvimento de artrópodes hematófagos no ciclo enzoótico e epidêmico (Bacellar, 1996).

O gênero *Rickettsia* é classificado em três grupos, baseando-se em padrões morfológicos, moleculares, antigênicos e ecológicos: o grupo Ancestral (**GA**) compreende as espécies *Rickettsia canadenses* e *Rickettsia belli*, associadas a carrapatos, sendo a última a mais comum encontrada em pássaros nas Américas; grupo Tifo (**GT**), que compreende as espécies *Rickettsia prowazekii* (agente do tifo exantemático) e *Rickettsia typhi*, (agente do tifo murino) associadas primariamente com piolhos e pulgas; e o grupo da Febre Maculosa (**GFM**), composto por mais de 20 espécies, sendo pelo menos 9 causadores de doenças e são encontradas em diversos locais do planeta: *Rickettsia rickettsii* (agente da Febre das Montanhas Rochosas e FMB), presente nas Américas do Norte e do Sul; *Rickettsia conorii* (agente da Febre Mediterrânea ou Febre Botonosa), encontrada no sul da Europa, Ásia e África; *Rickettsia japonica* (agente da Febre Maculosa Oriental), encontrada no Japão; *Rickettsia honei* encontrada na Oceania; *Rickettsia africae* (agente da Febre da picada do carrapato), encontrada na África; *Rickettsia sibirica* encontrada na Ásia, estando associadas primariamente a carrapatos, sendo as únicas exceções deste grupo *Rickettsia felis* encontrada nos EUA, México, Brasil, França e Alemanha; e *Rickettsia akari* encontrada nos EUA e Ásia, que estão associadas com pulgas e ácaros Gamasida respectivamente. (Raoult e Roux 1997; Ogata *et al.*, 2006)

Nas Américas, *R. rickettsii* é considerado o mais importante agente etiológico da febre maculosa. Na Colômbia (Febre de Tobia), Panamá, México e Costa Rica esta mesma doença recebe o nome de “Fiebre Manchada” (citado por Guedes *et al.*, 2005). Nos vertebrados, incluindo os humanos, *R. rickettsii* se multiplica nas células endoteliais. Apresenta forma de bacilo curto ou de cocobacilo medindo de 0,3 a 1,0 um, com um genoma que varia de 1,1 a 1,6 Mb (Xu e Raoult, 1998). Nos carrapatos, vetores da doença, a bactéria causa infecção disseminada, multiplicando em células dos intestinos, ovários, glândulas salivares, túbulos de Malpighi e hemolinfa (Weiss e Moulder, 1984; Yu e Walker, 2003).

Dentre as espécies de riquetsias do grupo da febre maculosa, três espécies tem sido descritas no Brasil: *R. rickettsii*, *R. parkeri* e *R. felis* (Toledo, 2011). No país, até o ano de 2011, foram confirmados casos humanos de FMB causados por *R. rickettsii* nos estados da Bahia, e nos quatro Estados da Região Sudeste do país. Na Bahia e em Minas Gerais foram relatados casos causados por *R. felis* e em São Paulo casos causados por *R. parkeri* ( Labruna, 2011). O conhecimento sobre a epidemiologia da riquetsiose causada por *R. felis* ainda não é muito bem conhecida no Brasil, bem como a relação desta riquetsia com casos de febre maculosa causadas por outras riquetsias, além disso sua transmissão aos humanos também precisa ser mais estudada (Horta, 2006). A doença está incluída no grupo FM pela análise filogenética do agente (Galvão *et al.*, 2005).

## 2.2 Vetores

Os carrapatos são responsáveis pela manutenção da *R. rickettsii* na natureza em função da transmissão transovariana e transtadial: essa característica permite ao carrapato permanecer infectado durante toda sua vida e durante várias gerações após uma infecção primária (Brasil, 2005).

Os gêneros *Boophilus*, *Dermacentor* e *Rhipicephalus*, são os principais carrapatos encontrados em bovinos, equinos e cães, respectivamente, e nenhum deles assume grande importância como parasita em humanos. Os gêneros *Ixodes* e *Haemaphysalis* estão restritos a aves e mamíferos silvestres, e não há registros de parasitismo humano no Brasil. O gênero *Amblyomma*, é o de maior importância médica. *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma ovale*<sup>1</sup>, são as espécies incriminadas na manutenção enzoótica e na transmissão da FMB para humanos (Dias e Martins, 1939). No Brasil, duas espécies de carrapatos estão associados a transmissão de *R. rickettsii* para humanos e animais: *A. cajennense* e *A. aureolatum* (Pinter e Labruna, 2006).

Os vetores associados à transmissão da doença são principalmente *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus* na América do Norte, *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma triste* na América do Sul, que possui aproximadamente 130 espécies de carrapatos, compreendendo 16% da fauna mundial (Parola *et al.*, 2005; Demma *et al.*, 2005; Venzal *et al.*, 2008). *R. sanguineus* e *A. cajennense* no México (Bustamante e Varela 1947); *A. cajennense* no Panamá (Rodaniche 1953); *A. cajennense* e *R. sanguineus* na Colômbia (Labruna 2006), *A. cajennense* e *A. aureolatum* no Brasil (Guedes *et al.* 2005, Pinter e Labruna 2006). *R. sanguineus* foi descrito como vetor de *R. rickettsii*, em 2009 no Estado do Rio de Janeiro, mostrando que esta espécie pode ter importante papel na transmissão da doença para humanos no país (Cunha *et al.*, 2009). O mesmo foi mostrado no município de Juiz de Fora por Pacheco *et al.* (2011). Em 2004, Moura *et al.*, descreveram *R. rickettsii* infectando *A. dubitatum*, o que pode indicar sua importância em cenários epidemiológicos específicos.

*A. ovale* é apontado como o carrapato com maior potencial de transmissão nos Estados Rio Grande do Sul e Santa Catarina, durante as investigações de casos nesses Estados, esta espécie foi coletada com maior frequência, apresentou maior antropofilia e maior positividade nos focos.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Comunicação pessoal fornecida por Gazêta S. G., em 11 de fevereiro de 2014.

Além disso, foi apontado *A. ovale* como a espécie com maior evidência de transmissão no ciclo epidêmico na Região do maciço de Baturité, Estado do Ceará.<sup>2</sup>

Dada a menor especificidade parasitária das larvas e ninfas, estes são os principais estágios que parasitam os seres humanos. O estágio adulto é mais específico, e, eventualmente quando populações de carrapatos adultos se apresentam muito numerosas, é que este irá parasitar humanos.

No sudeste do Brasil, onde se localizam a maioria dos casos de FMB, a doença ocorre dentro de uma relação ecológica conhecida: altas infestações de *A. cajennense* mantidos por um de seus principais hospedeiros, as capivaras (*Hydrochorus hydrochaeris*) (Szabó *et al.*, 2013).

Observações da ecologia da doença nos anos 90, em área endêmica do Estado de São Paulo, sugerem grande potencial das capivaras de serem reservatórios naturais de *R. rickettsii*. As evidências que sugerem isso são: I) Capivaras são hospedeiros primários de *A. cajennense*; II) Riquetsias do grupo FM foram isoladas de *A. dubitatum* coletados de capivaras soro positivas para *R. rickettsii*, de área endêmica do Estado de São Paulo (Lemos *et al.*, 1996), III) Estudos realizados nos anos 40 mostram que capivaras infestadas experimentalmente por *R. rickettsii* retêm a circulação da bactéria sem sinais clínicos e com nível de riquetsemia suficiente para infectar *A. cajennense* que delas se alimentaram (Travassos e Vallejo 1942; Travassos e Vallejo 1942a ).

Experimentos de laboratório vêm mostrando baixa competência vetorial de larvas de *A. cajennense*, contrastando com a alta competência observada em ninfas infectadas (Soares *et al.*, 2012). Pacheco *et al.* (2009) mostram que *A. cajennense* não é um bom vetor para *R. rickettsii*. Tal característica se justifica pela baixa eficiência para manter a bactéria por sucessivas gerações (Soares *et al.*, 2012).

*R. sanguineus* tem sido apontado como vetor e reservatório da *R. conorii*, agente da Febre Mediterrânea na Europa, África e Ásia (Parola *et al.*, 2005). Desde 1940 no México tem sido demonstrada a importância do *R. sanguineus* na transmissão da Febre Maculosa (Bustamante *et al.*, 1946), mas só em 2002 *R. rickettsii* foi identificada em *R. sanguineus* nos EUA como vetor da doença (Demma *et al.*, 2005).

No Brasil, espécimes de *R. sanguineus* infectados com *R. rickettsii* vem sendo observados em áreas de foco para FMB por técnicas moleculares e cultura de células ( Cunha

---

<sup>2</sup> Comunicação pessoal fornecida por Gazêta S. G., em 11 de fevereiro de 2014.

*et al.*, 2009; Pacheco *et al.*, 2011; Orgzewalska *et al.*, 2012). Porém, casos humanos de FMB causados por *R. sanguineus* ainda não foram demonstrados (Labruna 2005).

No Estado de Minas Gerais, *Ctenocephalides felis*, *Ctenocephalides sp.* e *R. sanguineus* foram relatados carreando riquetsias do GFM (Cardoso *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2002).

Em 2004, Padock *et al.*, comprovaram o primeiro caso de febre maculosa em humano causado por *R. parkeri*, nos EUA. Esta bactéria foi isolada em *A. triste* no Uruguai por Venzal *et al.* (2004). No Brasil, *R. parkeri* já foi isolada de *A. triste* e *A. dubitatum* (Labruna *et al.* 2004; Silveira *et al.*, 2007).

A espécie de riquetsia mais abundante no Brasil, *R. bellii*, já foi isolada de *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. humerale*, *A. scalpturatum*, *A. rotundatum*, *A. oblongogutatum*, *A. ovale*, *Ixodes loricatus* e *Haemaphysalis juxtakochi* (Labruna *et al.*, 2004; Pinter e Labruna, 2006; Labruna *et al.*, 2007) No entanto há evidências de infecção animal ou humana.

Em 2007, *A. triste* foi descrito como vetor de *R. parkeri* em local onde não existe registro de riquetsiose. (Silveira *et al.*, 2007).

### **3 Material e métodos**

#### **3.1 Local de estudo**

O presente estudo foi realizado no município de Juiz de Fora, localizado na Zona da Mata Mineira. De acordo com dados da Estação Climatológica Principal (ECP), da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), o clima é caracterizado por duas estações bem definidas, sendo a estação de maior precipitação pluvial e temperaturas mais elevadas de outubro a abril e a estação de menor precipitação e temperaturas mais frias de maio a setembro.

Foram realizadas coletas de carrapatos em bairros com casos confirmados de FMB, ou em locais que apresentavam características de possível contato de humanos com carrapatos, seja pela presença de capivaras, cavalos ou outros hospedeiros.

Assim, foram selecionados quatro bairros para coletas no ambiente e /ou em hospedeiros: Bairro Araújo (S 21° 41' 26.02"/ W 43° 25' 45.76" ) em um sítio com presença de equinos, cães e eventuais aparecimentos de capivaras, todos estes no mesmo ambiente; Bairro Santa Terezinha (S 21°44'39.9" / W043°21'37.8") em local pertencente a uma instituição de ensino, onde há a circulação de capivaras; Bairro Jockey II (S21° 42' 35.02"/ W43° 24' 34.76") às margens do Rio Paraibuna, onde é possível observar pastagem de bovinos e equinos e a circulação de capivaras e Bairro Manoel Honório (S21°44'45.9" / W43°21'10.4") também das margens do Rio Paraibuna, onde é comum a circulação de grandes grupos de capivaras, e pedestres caminhando com seus respectivos animais de estimação.

### 3.2 Coleta de carrapatos.

As coletas foram feitas em duas épocas do ano, sempre no período da manhã, sendo realizadas duas coletas em cada Bairro: a primeira em meses caracterizados como períodos de seca (agosto e setembro de 2012) e a segunda em meses de característica chuvosa.(novembro e dezembro de 2012 e janeiro de 2013).

Além disso, foram fornecidos pelo veterinário da Prefeitura de Juiz de Fora (PJF), José Geraldo de Castro Júnior, espécimes de carrapatos coletados durante período de investigação no ano de 2007 (janeiro e fevereiro) dos Bairros Linhares, Monte Castelo e Previdenciário e foram realizadas coletas de ectoparasitas sobre cães durante a campanha de vacinação antirrábica, no mês de setembro de 2012, nos Bairros Grama, Barreira do Triunfo, Santa Rita e Progresso.

No ambiente, as coletas foram realizadas utilizando-se a técnica de arraste de flanela para captura de larvas e ninfas (Oliveira *et al.*, 2000) num raio de 100 metros ao redor do ponto de marcação do GPS, e armadilha química para captura de ninfas e adultos (Cançado *et al.*, 2008). Os carrapatos foram recolhidos e acondicionados em álcool isopropílico para posterior identificação e análise molecular. A identificação foi realizada no Laboratório de Microscopia do Programa de Pós Graduação em Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora, com o auxílio de um microscópio estereoscópio, utilizando-se as chaves taxonômicas Barros – Battesti *et al.* (2006) e de Aragão e Fonseca (1961) para adultos e Martins *et al.* (2010) para ninfas.

### 3.3 Análise Molecular

A extração de DNAG dos carrapatos foi realizada no Laboratório de Referência Nacional em Vetores das Riquetsioses (LIRN) IOC- FIOCRUZ, através da técnica de extração por NaCl (Aljanabi e Martinez, 1997) e armazenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Do total (5.832) de espécimes coletados os estágios de ninfa e larvas foram separados em *pools*, e os adultos analisados separadamente, totalizando 275 amostras.

A realização da PCR em tempo real (quantitativa) foi feita no Laboratório de Biologia Molecular do serviço de virologia e Riquetsioses/DIOM, na Fundação Ezequiel Dias, em Belo Horizonte, Minas Gerais. Para realização da PCR em real time, utilizou-se o SYBR® Green. O kit utilizado para amplificação foi o Kapa Syber fast e o equipamento Step one, da Applied Bio sistens. Para realização da PCR quantitativa, as 275 amostras foram separadas em 55 *pools*, cada um deles contendo 5 amostras. Cada um desses pools foi analisado e a cada *pool* que se mostrou positivo as cinco amostras nele contidas foram analisadas separadamente, para detecção de qual amostra exatamente se mostrou positiva. As amostras foram processadas utilizando-se oligonucleotídeos grupo-específicos, para detecção de riquetsias GFM (par de primer para detecção do gene *ompA*), pois era o único primer disponível no período de análises (Tabela 2). Como controle positivo, foi utilizado DNAG de *R. parkeri* e como controle negativo água deionizada.

Após os resultados da PCR quantitativa, selecionou-se as amostras positivas para a realização da técnica de PCR qualitativa para detecção de espécimes positivos para riquetsias do grupo febre maculosa. Os *primers* utilizados foram: o par gênero específico RpCS.877p e RpCS.1258N, que amplifica um fragmento de 381 pares de base (pb) do gene *gltA* que codifica a enzima citrato sintase gênero específico *Rickettsia* spp. O par Rr 190.70p e Rr 190.602p, que amplifica que um fragmento de 532pb do gene *OmpA* que codifica uma proteína externa de membrana de 190KDa. Os *primers* estão indicados na (Tabela 3).

De acordo com Margolis *et al.*(1982) foi estimado o valor prevalência (P) (relação entre o número de indivíduos, ou *pools* de indivíduos, considerados que reagiram aa PCR, bem como o número total analisado) do material.

**Tabela 2:** Primers utilizados para desenvolvimento da PCR para detecção de riquetsias.

Oligonucleotídeos utilizados para amplificação de genes de riquetsias					
Gene	Oligonucleotídeo	Sequência de nucleotídeo (5'>3')	Fragmento (pb)	Referência	Obs
GltA	RpCS.877P^ RpCS.1258N	GGGGGCCTGCTCACGGCGG ATTGCAAAAAGTACAGTGAACA	381	Azad <i>et al.</i> , 1990	
	CS4-239	GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTAT CAGGGTCTTCGTCATTTCTT	834	Labruna <i>et al.</i> , 2004b	codifica <i>Rickettsia</i> spp.(e espécie de origen <i>R.</i> <i>prowaszekii</i> )
htrA	17k-5 17k-3	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA TGCTATCAATTCAACAACCTGCC	549	Labruna <i>et al.</i> , 2004 <sup>a</sup>	codifica <i>Rickettsia</i> sp. (espécie de origen <i>R.</i> <i>rickettsii</i> )
OmpA	Rr 190.70p Rr 190.602p	ATGGCGAATATTCTCCTCAAAA AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	532	Regnery RL <i>et al.</i> ,1991	codifica <i>Rickettsia</i> sp. Grupo Febre maculosa. (espécie de origen <i>R.</i> <i>rickettsii</i> )

**Tabela 3:** Primer utilizado para desenvolvimento da PCR quantitativo para Riquetsia do grupo Febre Maculosa.

Gene	Primer	Sequencia de nucleotídeos 5'>3'	Referência	Tamanho fragmento amplificado
ompA	RR190.588F	GGA GCG AAT GCT GCA CTA AT	Eremeeva <i>et al.</i> , 2003	113
	RR190.701R	GTT CCG TTA ATG GCA GCA TCT		

#### 4 Resultados

Um total de 5832 ectoparasitos foi coletado, abrangendo 11 bairros do Município de Juiz de Fora, no Estado de Minas Gerais.

Na Tabela 4, estão resumidos os resultados obtidos nas coletas de campo, durante o período chuvoso, onde estão discriminados os dados sobre os hospedeiros examinados (espécie e número) e os vetores coletados (espécie, número, estágio de desenvolvimento e sexo) sobre eles ou no meio ambiente, em cada bairro.

**Tabela 4:** Espécies de potenciais vetores de riquetsias coletados no ambiente e em hospedeiros, em bairros investigados para Febre Maculosa Brasileira, no Município de Juiz de Fora, no período de agosto de 2012 a setembro de 2012.

Bairro de Coleta	HOSPEDEIRO (n)	ESPÉCIE	VETOR				TOTAL
			L	N	M	F	
Equino (9)		<i>Amblyomma cajennense</i>	51	349	28	12	<b>440</b>
		<i>Dermacentor nitens</i>	0	45	26	39	<b>110</b>
		<i>Rhipicephalus microplus</i>	176	18	3	4	<b>201</b>
Araújo	Humano (2)	<i>Rhipicephalus microplus</i>	54	3	0	0	<b>57</b>
		<i>Amblyomma cajennense</i>	1149	959	1	0	<b>2109</b>
Santa Terezinha	Livre no ambiente	<i>Dermacentor nitens</i>	0	0	1	0	<b>1</b>
		<i>Amblyomma cajennense</i>	1400	57	1	0	<b>1458</b>
Manoel Honório	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	16	18	0	0	<b>34</b>
Jockey II	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	752	145	0	0	<b>897</b>

(n) número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; M: macho; F: fêmea; N: ninfa e L: larva.

Na Tabela 5, estão resumidos os resultados obtidos nas coletas de campo, durante o período seco, onde estão discriminados os dados sobre os hospedeiros examinados (espécie e número) e os vetores coletados (espécie, número, estágio de desenvolvimento e sexo) sobre eles ou no meio ambiente, em cada bairro.

**Tabela 5:** Espécies de potenciais vetores de riquetsias coletados no ambiente e em hospedeiros, em bairros investigados para Febre Maculosa Brasileira, no Município de Juiz de Fora, no período de Novembro de 2012 a Abril de 2013.

Bairro de Coleta	HOSPEDEIRO	ESPÉCIE	VETOR				TOTAL
			L	N	M	F	
Araújo	Equino(5)	<i>Amblyomma cajennense</i>	22	106	46	32	<b>206</b>
	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	5	104	8	4	<b>121</b>
Santa Terezinha	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	12	69	0	0	<b>81</b>
Manoel Honório	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	0	0	0	<b>0</b>
Jockey II	Livre no ambiente	<i>Amblyomma cajennense</i>	12	3	3	0	<b>18</b>

(n) número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; M: macho; F: fêmea; N: ninfa e L:larva

Na tabela 6 estão resumidos os resultados do material cedido pelo veterinário da PJF.

**Tabela 6:** Espécies de potenciais vetores de riquetsias cedidos pelo centro de controle de zoonoses da PJF.

Bairro de Coleta	HOSPEDEIRO O (n)	ESPÉCIE	VETOR				TOTAL
			L	N	M	F	
Previdenciários	Equino (1)	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	0	0	2	<b>2</b>
		<i>Rhipicephalus microplus</i>	0	0	2	5	<b>7</b>
Monte Castelo	Equino (4)	<i>Amblyomma cajennense</i>	0	7	12	2 6	<b>37</b>
		<i>Dermacentor nitens</i>	0	1	0	1	<b>2</b>

(n) número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; M: macho; F: fêmea; N: ninfa e L:larva

Na Tabela 7, estão resumidos os resultados obtidos nas coletas durante a campanha de vacinação antirrábica, no dia 23 de setembro de 2012, onde estão discriminados os dados sobre os hospedeiros examinados (espécie e número) e os vetores coletados (espécie, número, estágio de desenvolvimento e sexo) sobre eles, em cada bairro.

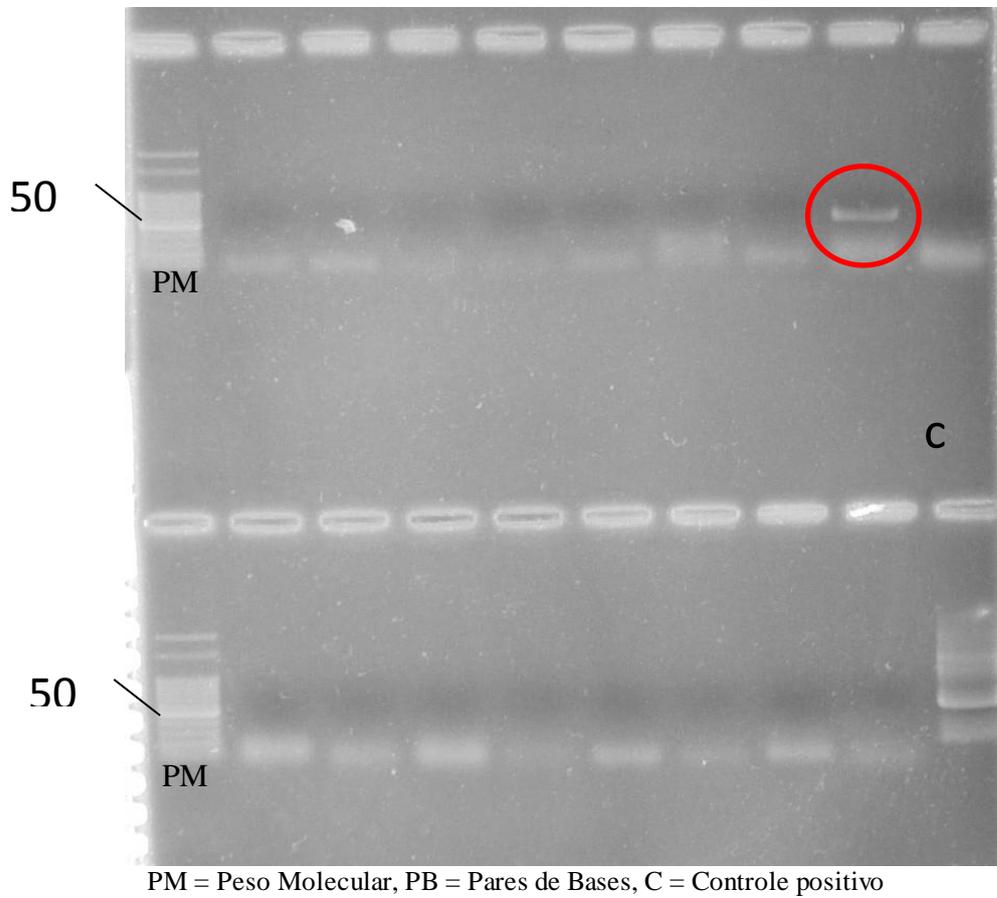
**Tabela 7:** Espécies de potenciais vetores de riquetsias coletados em hospedeiros, em bairros investigados para Febre Maculosa Brasileira, no Município de Juiz de Fora, na campanha de vacinação antirrábica realizada no dia 23 de setembro de 2012.

Bairro de Coleta	HOSPEDEIRO (n)	ESPÉCIE	VETOR				TOTAL
			L	N	M	F	
Progresso	Cão (8)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	2	2	4	<b>8</b>
Linhares	Cão (3)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	0	0	4	<b>4</b>
Santa Rita	Cão (5)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>		33	2	1	<b>36</b>
Gramma	Cão (1)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	0	1	1	<b>2</b>
Barreira do Triunfo	Cão (1)	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	0	0	0	1	<b>1</b>

(n) número de hospedeiros examinados para coleta de vetores; M: macho; F: fêmea; N: ninfa e L:larva.

Na PCR qualitativa foi encontrada uma fêmea de *A. cajennense* positivo para riquetsia GFM, coletada sobre equino no Bairro Monte Castelo (Figura 1).

Na tabela 8 estão discriminados os resultados para a PCR quantitativa. Foram 13 amostras positivas para presença de riquetsias do grupo febre maculosa, representando 4,72% das amostras, apontando quatro Bairros com espécimes de carrapatos positivos: Santa Terezinha e Manoel Honório, onde foram realizadas coletas sazonais, e os espécimes positivos foram coletados livres no ambiente, e Monte Castelo e Previdenciários, Bairros de onde foi cedido material pelo veterinário da PJF, onde todos os espécimes cedidos foram coletados sobre equinos. No Bairro Monte Castelo foram observados espécimes de vetores positivos em dois diferentes hospedeiros, fazendo-se a distinção destes por equino A e B.



**Figura 1:** Gel de amido assinalando (círculo vermelho) a banda formada pela eletroforese do produto amplificado para o gene *ompA* de amostra de fêmea de *Amblyomma cajennense* coletada em equino, no bairro Monte Castelo, durante investigação de caso de Febre Maculosa, em 2007.

**Tabela 8:** Vetores de riquetsias positivos para o gene riquetsial (ompA), coletados em hospedeiros e em vida livre, nos bairros investigados para Febre Maculosa Brasileira, no município de Juiz de Fora, Minas Gerais, no período de agosto de 2012 a abril de 2013.

Amostra	Hospedeiro	Código Amostra	Local de Coleta	Período de Coleta
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino (A)	3980 A	Monte Castelo	Jan/2007
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino (A)	3980 G	Monte Castelo	Jan/2007
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino (A)	3980 L	Monte Castelo	Jan/2007
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino (A)	3980 M	Monte Castelo	Jan/2007
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino (A)	3980 N	Monte Castelo	Jan/2007
Macho <i>A. cajennense</i>	Equino (A)	3980 P	Monte Castelo	Jan/2007
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino (B)	3993 G	Monte Castelo	Jan/2007
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino (B)	3994 A	Monte Castelo	Jan/2007
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino (B)	3994 B	Monte Castelo	Jan/2007
Macho <i>R. microplus</i>	Equino	3979 F	Previdenciários	Fev/2007
Fêmea <i>A. cajennense</i>	Equino	3997 A	Previdenciários	Fev/2007
Pool 8 Ninfas <i>A. cajennense</i>	Ambiente	4073	Santa Terezinha	Ago/2012
Pool 3 Ninfas <i>A. cajennense</i>	Ambiente	4089	Manoel Honório	Ago/2012

Em relação aos dados obtidos, nas coletas realizadas no período de seca, levando em consideração espécimes coletados no ambiente e em hospedeiros, observou-se que no Bairro Araújo de todos os espécimes coletados, 87,35% eram *A. cajennense*, 3,8% *D. nitens* e 8,84% *R. microplus*.

Nos bairros Santa Rita, Manoel Honório e Jockey II, observou-se 100% de *A. cajennense*.

Nas coletas realizadas no período de chuva observou-se 100% de *A. cajennense* nos quatro bairros.

Em relação às coletas realizadas nos bairros Linhares, Progresso, Santa Rita, Barreira do Triunfo e Grama, na campanha de vacinação antirrábica foi observada somente a espécie *R. sanguineus*.

O resultado relativo ao material cedido pelo serviço de controle de zoonoses da PJF foi: 77,7% de *R. microplus* e 22,3% de *A. cajennense* no Bairro Previdenciários e 94,87% de *A. cajennense* e 5,12% de *D. nitens* no Bairro Monte Castelo.

A prevalência de carrapatos positivos nos bairros apresentou-se da seguinte forma: 23% no Monte Castelo, 22,2% no bairro Previdenciários, 8,82% no Manoel Honório e 0,51% em Santa Terezinha.

## 5 Discussão

Em todos os bairros onde foram realizadas coletas no ambiente, estas foram realizadas próximas a rios e lagos, locais favoráveis para ocorrência de carrapatos (Lemos *et al.*, 1997).

No bairro Araújo, foi encontrado baixo número de carrapatos em ambiente próximo a encosta do rio Paraibuna, pois as datas estipuladas para as coletas coincidiram com períodos pós-chuvas, o que pode ter prejudicado o encontro de espécimes em seu estágio de vida livre. Neste mesmo bairro, os resultados encontrados em relação ao número de *R. microplus* sobre equinos podem ser justificados pelo fato de bois e cavalos utilizarem simultaneamente o mesmo pasto.

Nos bairros Manoel Honório e Santa Terezinha, apesar dos pastos sujos e presença constante de capivaras nos locais de coleta que propiciam a infestação por carrapatos, o baixo número de espécimes coletados se mostrou mais acentuado, apesar destes locais possuírem atividade antrópica, que potencializam a presença de carrapatos, nos dias das coletas, ousamos dizer que o baixo número de espécimes coletados foi consequência das chuvas, o solo muito úmido e a alta do volume de água do rio que lavou a encosta pode ter interferido diretamente no processo de coleta de espécimes.

No bairro Jóquey II, na data da coleta havia a presença de funcionários da PJJ realizando a poda da encosta do rio. A atividade de poda é uma das maneiras de profilaxia a infestações de carrapatos, fazendo com que eles sejam expostos a condições adversas, principalmente a desidratação (Brasil, 2004). Devido a esta atividade, o número de espécimes encontrados foi pequeno, resultado corroborado por Labruna (2001), que mostra que ecossistemas com maior ocorrência de carrapatos são aqueles que possuem vegetação suficientemente alta para proteger o solo da radiação solar direta, e com presença de sombreamento.

Os resultados obtidos pela PCR ressaltam a participação de equinos no ciclo enzoótico da doença no bairro Monte Castelo, já que todos os carrapatos que apresentaram positividade para riquetsias do grupo febre maculosa neste bairro foram espécimes coletados sobre equinos.

Os resultados obtidos no bairro Santa Terezinha são preocupantes, já que o local de coleta pertence a uma instituição de ensino e há a circulação de pesquisadores e alunos no local. Segundo Milagres *et al.*, (2013) e Szabó *et al.*, (2001), a presença de cães e outros animais silvestres pode indicar sua participação na manutenção do ciclo enzoótico da doença. No local de coleta pode-se observar a circulação de capivaras, animais incriminados pela

manutenção dos vetores no local, e outros animais silvestres, fazendo assim a manutenção do ciclo enzoótico. Perante os resultados obtidos, mostra-se necessário monitoramento contínuo do local, com a finalidade de observar a circulação de riquetsias e possível perigo de contaminação para a população, já que será um local de visita aberta ao público.

Resultados semelhantes e mais preocupantes se apresentaram no bairro Manoel Honório, cujos exames de PCR apontam presença de carrapatos positivos para riquetsias na vegetação ciliar do rio Paraibuna, local este onde pessoas caminham pela manhã e levam seus animais de estimação para passear. O local apresenta grande capacidade de dispersão destes vetores, já que nele circulam centenas de pessoas todos os dias. A principal característica de manutenção destes vetores no local é a presença constante de capivaras circulando às margens do rio e a presença de carroceiros.

Em relação à prevalência de vetores positivos para riquetsias GFM, os valores evidenciaram mais uma vez a importância de equinos na manutenção do ciclo enzoótico da doença, já que os bairros que apresentaram maiores prevalências (Monte Castelo e Previdenciários) são os locais onde os vetores foram coletados sobre estes hospedeiros.

Comparando estes resultados com trabalhos anteriores, observa-se grande diferença entre os valores de animais positivos para riquetsias do GFM. Assim, em países como os EUA e em outras localidades no Brasil, as taxas de infecção de *R. rickettsii* relatadas entre carrapatos dos gêneros *Dermacentor* e *Amblyomma* em áreas endêmicas variam de 0,005% a 1,3% (Burgdorfer, 1988). Sangioni et al., (2005) não encontrou nenhum carrapato infectado em três áreas endêmicas para FMB no Estado de São Paulo. Em outra área endêmica para FMB, também no Estado de São Paulo, Pinter e Labruna (2006), encontraram uma taxa de 0,89% de *A. aureolatum* infectado por *R. rickettsii*. Guedes et al., (2005) encontraram uma taxa 1,28% de *A. cajennense* infectado por *R. rickettsii*, em área endêmica para FMB no Estado de Minas Gerais. Em 2011, Guedes et al., encontraram uma taxa de 0,5% de *A. cajennense* infectados por *R. rickettsii* em área endêmica do Estado de Minas Gerais. A descrição de taxas entre 0,51% e 23% de carrapatos dos gêneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus* infectados por Riquetsias do GFM no presente estudo ressalta a importância de uma vigilância constante de ambiente no município de Juiz de Fora.

Taxas de infecção por *R. rickettsii* em carrapatos geralmente tem sido muito baixas (Burgdorfer 1988; Guedes et al., 2005). Sangionini et al., (2005) não encontraram nenhum carrapato infectado dos 810 adultos de *A. cajennense* por *R. rickettsii* em área endêmica no Estado de São Paulo. Em estudo realizado em Coronel Pacheco, município vizinho de Juiz de Fora, Guedes et al. (2005) encontraram 1,28% de *A. cajennense* em sua forma de vida livre

infectados por *R. rickettsii*; no presente trabalho foi encontrado 8,82% deste mesmo carrapato na sua fase de vida livre infectado com riquetsia GFM no bairro Manoel Honório.

No presente estudo não foi encontrado nenhum espécime de *R. sanguineus* infectado por *R. rickettsii*, resultado contrastante com Pacheco *et al.*,(2011) que relataram 13,1% de *R. sanguineus* infectados por *R. rickettsii* em estudo realizado no mesmo município, porém esta diferença pode ser justificada pelas diferentes condições de coleta nos dois estudos, já que Pacheco *et al.*, (2011) realizaram seu trabalho dentro de situação específica, no CCZ, em grande quantidade de cães com grandes infestações de *R. sanguineus*.

No Bairro Previdenciários foi encontrado um macho da espécie *R. microplus* positivo para riquetsia GFM, representando 0,2% desta espécie no Bairro. Moura *et al.*(2014) encontraram 3.0% (1/33) de *R. microplus* infectados por *Rickettsia sp.* no Estado do Rio de Janeiro Sabe-se que riquetsias GFM foram observadas na hemolinfa de *R. microplus* coletados em áreas endêmicas para FMB. (Lemos, 2002). Gehrke,(2010) encontrou um valor de 3,97% de *R. microplus* positivos para *Rickettsia sp.* no RJ. Em Roraima, há registro de 1,1% de *R. microplus* infectados por *Rickettsia spp* (Gehrke, 2002). No ano de 2009, no Panamá, de um montante de 10 carrapatos, 50% dos *R. microplus* analisados foram diagnosticados com *Rickettsia spp* (Bermúdez *et al.*, 2009). Os carrapatos desta espécie são reconhecidos vetores de *Anaplasma marginale* que é responsável pela doença da tristeza bovina. É possível que exista alguma associação deste carrapato na manutenção do ciclo de riquetsia; além disso, estes apresentam alta especificidade parasitária e devem participar do ciclo de riquetsias somente entre animais não humanos.

## 6 Conclusão

A pesquisa da bioepidemiologia de vetores e riquetsias permitiu:

- Observar a ocorrência de diferentes espécies de carrapatos infectados por riquetsias do GFM em diferentes locais da cidade. As espécies *Amblyomma cajennense* e *Rhipicephalus microplus* são mostradas no presente estudo como espécies infectadas por riquetsias GFM em Juiz de Fora, com *A. Cajennense* mostrando-se infectado em diferentes bairros;
- Observar que *Amblyomma cajennense* é a espécie mais abundante e de maior prevalência nas regiões estudadas. Sua associação temporal e espacial com equinos aponta para o ciclo enzoótico de riquetsias envolvendo essas espécies. Sua antropofilia leva a um maior potencial de transmissão da doença para humanos, e sua ocorrência nos focos durante investigação apontam para seu potencial papel de vetor no ciclo antropofílico.
- Características inerentes ao município de Juiz de Fora potencializam a circulação de riquetsias na região urbana, bem como a presença de capivaras ao longo da encosta do rio, próximo a local de grande circulação da população; pontos de carroceiros na região próxima ao rio, permitindo o contato dos diferentes hospedeiros com os carrapatos presentes na encosta, aumentam a disseminação deste vetor pelos bairros da cidade.

O conjunto de resultados encontrados no presente estudo indica claramente a necessidade de monitoramento epidemiológico constante no município de Juiz de Fora em relação à FMB, visto o risco potencial de elevação do número de casos da doença.

## Referências Bibliográficas

- ALJANABI S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR- based techniques. *Nucl. Acids. Res.*, v. 25, n. 22, p. 4692-4693, 1997.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.59, n.2, p.115-129,1967.
- AZAD *et al.*, Detection of Rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 590: 557–563. 1990.
- BACELLAR, F.C. (1996) **Rickettsias isoladas em Portugal – contribuição para a identificação e classificação das estirpes**. Dissertação de Doutorado em Biologia. Évora: Universidade de Évora.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. (2006) **Carrapatos de importância Médico-Veterinário da região neotropical**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan,, 223p.
- BERMÚDEZ SE, Eremeeva ME, Karpathy SE, Samudio F, Zambrano ML, Zaldivar Y, Motta JA, Dasch GA. Detection and identification of rickettsial agents in ticks from domestic mammals in eastern Panama. *J Med Entomol*. 2009;46(4):856-61.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. *Biology of Rickettsial Diseases* (ed. by D. H. Walker), pp. 33–50, 1988 CRC Inc., Boca Raton, FL.
- BUSTAMANTE M.E. & VARELA G. Estudos de febre manchada en México: papel del *Rhipicephalus sanguineus* en la transmission de la fiebre manchada en la Republica Mexicana. *Revta Inst. Salubr. Enferm. Trop*. 8:139-141, 1947.
- BUSTAMANTE M.E., VARELA G. & MARIOTTE C.O. 1946. Estudos de febre manchada en México: febre manchada en la Laguna. *Revta Inst. Salubr. Enferm. Trop*. 7:39-49, 1946.
- BRASIL. Sistema Único de Saúde. Secretaria Municipal de Saúde, Campinas. Prefeitura Municipal de Campinas. **Manual de Controle Integrado de Pragas**. Campinas, São Paulo, 2004. 68p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 6. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2005. 816 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças Infecciosas: guia de bolso**/ Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Dep. de Vigilância Epidemiológica -8. Ed.rev. – Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

BRASIL, Ministério da Saúde. Banco de dados do Sistema Único de Saúde-DATASUS. Disponível em <http://www.datasus.gov.br> [Acessado em 30/01/2014]

CANÇADO, P.H.D.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H. *et al.* Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO<sub>2</sub> tick trap. *Parasitol. Res.*, v.103, p.1-7, 2008.

CARDOSO *et al.* Characterization of *Rickettsia* spp. circulating in a silent peri-urban focus for Brazilian spotted fever in Caratinga, Minas Gerais, Brazil. *Cad. Saúde Publ.* 22(3):495-501, 2006.

CUNHA *et al.* First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. *Pesq. Vet. Bras.* 29(2):105-108, fevereiro, 2009.

DEMMA *et al.*, (2005) Rocky Mountain Spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N. Engl. J. Med.* 353;6.

DIAS, E. & MARTINS, A. V. Aspectos do typho exanthemático em Minas Gerais. *Brasil Médico*, 14:431-41, 1937

DIAS, E., and MARTINS A.V. Spotted fever in Brazil. *Am. J. Trop. Med.* 19:103–108, 1939

DUMLER *et al.* Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, v. 51, n. 6, p. 2145 – 2165. 2001

EREMEEVA M. E., DASCH G. A., SILVERMAN D.J. Evaluation of a PCR Assay for Quantitation of *Rickettsia rickettsii* and Closely Related Spotted Fever Group Rickettsiae. *Journal of Clinical Microbiology*, Dec 2003, p.5466-5472.

GALVÃO MAM. **Febre Maculosa em Minas Gerais: Um estudo sobre a distribuição da doença no Estado e seu comportamento em área de foco peri-urbano**, Tese de (Doutorado). Faculdade de Medicina da UFMG. Belo Horizonte, 1996.

GALVÃO *et al.* Serologic evidence of spotted fever group *Rickettsia* in Novo Cruzeiro Municipality - Minas Gerais State - Brazil. In: *Rickettsial Diseases at the Turn of the Third Millennium* (D. Raoult & P. Brouqui, ed.), pp. 240-243, 1999 Marseille: Elsevier.

GALVÃO *et al.* Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. *Rev. Saúde Pública*, v. 39, n. 5, p. 850-856, 2005.

GONÇALVES *et al.* Rickettsioses: A propósito de quatro casos diagnosticados no Rio de Janeiro de febre maculosa brasileira. *Folha Médica*, 82:127-134, 1981.

GUEDES *et al.* Detection of *Rickettsia rickettsia* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever- endemic area in the state of Minas Gerais. *Mem.Inst.OswaldoCruz* 100, 841–845, 2005.

GUEDES et al., *Rickettsia* infecting *Amblyomma* ticks in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, v. 20, n. 4, p. 308-311, 2011.

GERHKE, F.S. **Estudo da prevalência de *Borrelia* spp, *Ehrlichia* spp e *Rickettsia* spp em carrapatos coletados no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental.** [dissertação (Mestrado em Ciências)]. São Paulo (Brasil): Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2002.

GERHKE, F.S. **Detecção e caracterização molecular de riquetsias em humanos, potenciais vetores e animais domésticos da Região Sudeste do Brasil.** Tese. São Paulo (Brasil). Instituto de Ciência Biomédica da Universidade de São Paulo. 122 pp. 2010

HARDEN V.A. Rocky Mountain spotted fever: history of a twentieth century disease. Baltimore: Johns Hopkins; 1990

HORTA, M. C. **Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo.** 2006. 106 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

LABRUNA *et al.* Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. Vet. Parasitol., 97: 1-14,2001.

LABRUNA *et al.* *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J. Clin. Microbiol.**, v.42, n.1, p. 90-98, 2004

LABRUNA *et al.* *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **J Clin Microbiol**, 42: 90–98. 2004 a.

LABRUNA MB *et al.* Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **J. Med. Entomol.**, 41: 533-537. 2004 b.

LABRUNA *et al.* Ticks (Acari:Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Syst Appl. Acarol.* 10, 17–32, 2005a

LABRUNA, M.B. Cultivo celular de Riquetsias no Brasil.(2006) In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino Americano de Rickettsiose, Ribeirão Preto-SP. ANAIS... Ribeirão Preto:2006, pág.132-3.

LABRUNA M.B. *et al.* Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7(2):249-255, 2007.

LABRUNA, M.B. *et al.* Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Rev.MVZ Córdoba* 16(2):2435-2457,2011.

- LEMOS E.R.S *et al.*, Primary isolation os spotted fever group rickettsiae from *A.cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:273-275, 1996.
- LEMOS E.R.S Diseases in Brazil. **Virus Reviews and Research**, 7:7-16, 2002.
- MAGALHÃES, O. (1952)- Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo do tifo exantemático. Rio de Janeiro, Imprensa Nacional, (*Monografias do Instituto Oswaldo Cruz*, No 6).
- MANCINI, D. A. P. A ocorrência de riquetsioses do grupo *Rickettsia rickettsii*. *Revista de Saúde Publica*, 17:493-499, 1983.
- MARGOLIS L. *et al.* The use of ecological terms in parasitology (report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *J Parasitology* 68: 131–133,1982.
- MARTINS T. F. *et al.* Nymphs oh the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions and identification key. *Ticks and Tick-borne diseases*, V1 p.75-99,2010.
- MELLES, H. H.; COLOMBO, S. & SILVA, M. V. Spotted fever: Isolation of *Rickettsia* from a skin biopsy sample. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34:37-41, 1992.
- MILAGRES BS. *et al.* Spotted fever group *Rickettsia* in small rodents from areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the eastern region of Minas Gerais State, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 88(5):937-9, 2013.
- MOURA *et al.* *Rickettsia* and vector biodiversity of spotted fever focus, Atlantic rain forest biome, Brazil. **Emerg Infect Dis** [Internet]. 2014 Mar [date cited]. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2003.131013>
- OLIVEIRA, P.R. *et al.* Population dynamics of free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v.92, n.4, p. 295- 301,2000.
- OLIVEIRA, R. *et al.* *Rickettsia felis* in *Ctenocephalides* spp. fleas, Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v. 8, n. 3, p. 317-319, 2002.
- OGATA H. *et al.* Genome Sequence of *Rickettsia bellii* Illuminates the Role of Amoebae in Gene Exchanges between Intracellular Pathogens. *PLoS Genet* 2006; 2: 733-744.
- OGRZEWALSKA,M. *et al.* (2012). Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology* 139, 1283–1300, 2012.
- PACHECO,R.C. *et al.* Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 42, 351–353, 2009.

- PACHECO *et al.* Rickettsial infection of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Med.Vet.Entomol.* 25, 148–155, 2011.
- PADDOCK *et al.* *Rickettsia parkeri*: A newly reconized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin. Infect. Dis.*, v. 38, n. 6, p. 805-811, 2004.
- PAROLA P., PADDOCK C.D., RAOULT D. Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts *Clin. Microbiol. Rev.* 2005, 18(4):719, 2005.
- PLANK, S. J.; TEIXEIRA, R. S.; MILANESI, M. L. Febre Maculosa em Salvador: descrição de um caso. *Rev. Med. Bahia*, v.25, p. 330-334, 1979.
- PINTER, A., & LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia felis* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann.N.Y. Acad.Sci.* 1078, 523–530, 2006.
- RAOLT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.*, v. 10, n. 4, p. 694–719, 1997.
- REGNERY R.L, SPRUILLI C.L, PLIKAYTIS B.D. Genotypic identification of Rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *J. Bacteriol.* 173: 1576-1589. 1991.
- RICKETTS H.T. A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever. *JAMA.* 52:379-80, 1909.
- RODANICHE E.C. Natural infection of the tick *Amblyomma cajennense* with *Rickettsia rickettsii* in Panama. *Am J Trop Med Hyg* 2:696-699, 1953.
- SANGIONI *et al.* 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infec Dis* 11:265-270.
- SILVA e GALVÃO, Epidemiologia das riquetsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* vol. 13, suplemento 1, 2004.
- SILVEIRA, I.; *et al.* *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.13, n.7, p.1111 – 1113. 2007.
- SOARES, J.F. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted-fever. *Med. Vet. Entomol.* 26, 139–151, 2012.
- SINAN- Sistema de informação e agravo de notificação. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/fmaculosa/bases/febremaculosabrnet.def> acesso em 10/12/2013
- SEXTON *et al.* Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 49,

222-226,1993.

SZABÓ *et al.* Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 969, n. 25, p. 290-293, 2001.

SZABÓ *et al.* Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rain forest of Southeastern Brazil. *Ann.Trop. Med.Parasit.* 103, 57–72,2009.

SZABÓ *et al* Ecology, biology and distribution of spotted fever tick vector in Brazil. *Frontiers in cellular and infection microbiology*. Vol:3 artigo 27, 2013.

TOLEDO *et al.* Infection by Spotted Fever Rickettsiae in People, Dogs, Horses and Ticks in Londrina, Parana State, Brazil. *Zoonoses and Public Health* 58 , 416–423, 2011.

TRAVASSOS, J., and A. VALLEJO Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) a`s inoculaç,ões experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de deposita´rios transitórios do vírus na natureza. *Mem. Inst. Butanta* n 15:73–86, 1942.

TRAVASSOS, J., and A. VALLEJO Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. *Mem. Inst. Butanta* n 15:87–90, 1942a.

VENZAL JM. *et al.* *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerg Infec Dis* 2004; 10:1493-1495.

VENZAL JM. *et al.* *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): Hosts and seasonality of the vector of *Rickettsia parkeri* in Uruguay. *Vet. Parasitol.* 155:104-109, 2008.

WEISS, E.; MOULDER, J. W. The rickettsias and chlamydias. **Bergey's manual of systematic bacteriology**, v. 1, p. 687-739, 1984.

Yu XJ, Walker DH, The Order Rickettsiales. Dworkin Med. *The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiology Community*. Third edition. New York: Springer-Verlag, 2003.

XU WB, RAOULT D. Taxonomic relationships among spotted fever group rickettsiae as revealed by antigenic analysis with monoclonal antibodies. *J Clin Microbiol.* 36(4):887–96, 1998.

## ANEXO A

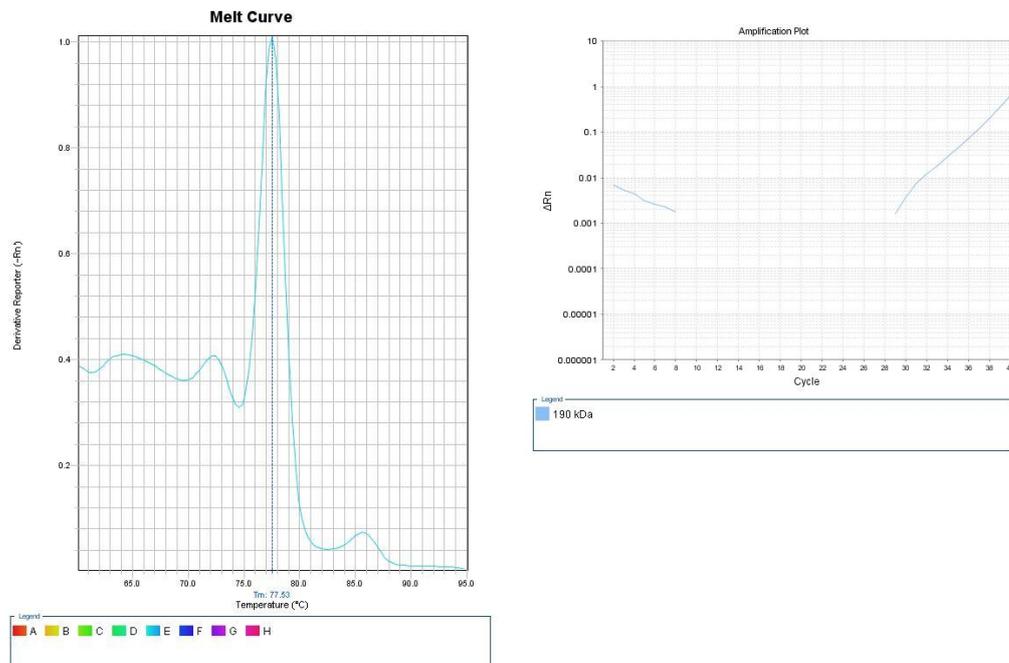


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 A (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

## ANEXO B

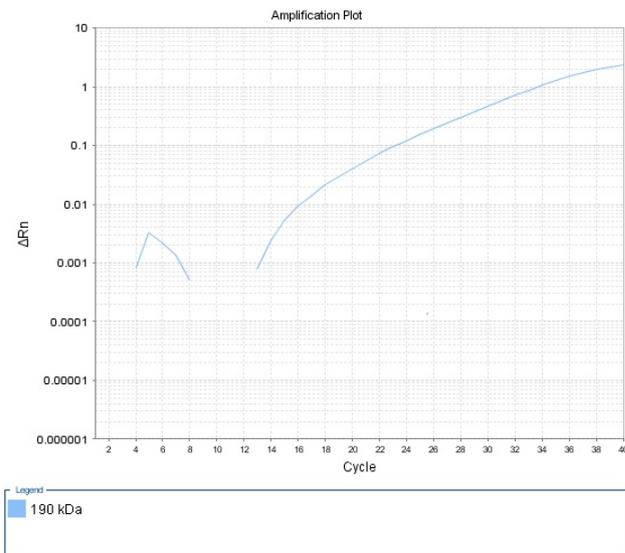


Gráfico de amplificação resultante da análise da amostra 3980 G (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

\*Não foi possível salvar a imagem da curva de Melt por problemas no computador do laboratório no dia da análise.

## ANEXO C

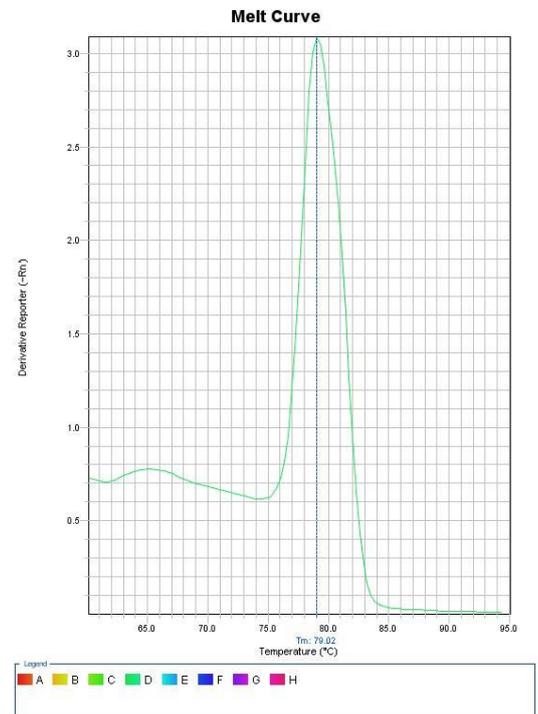
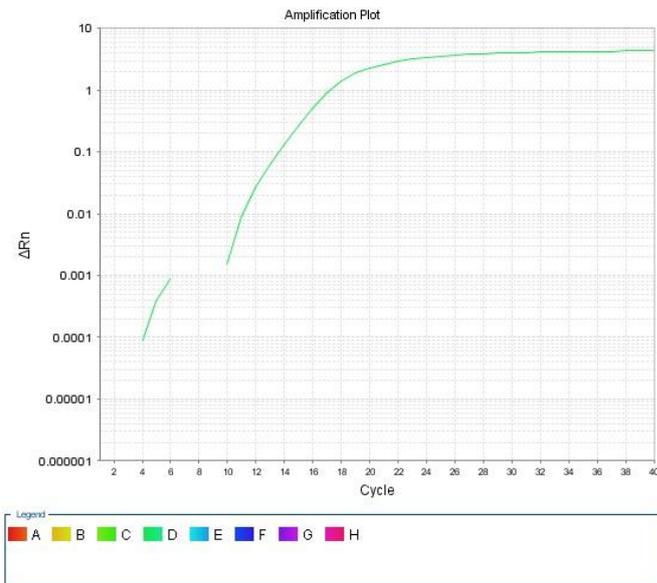


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 L (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

## ANEXO D

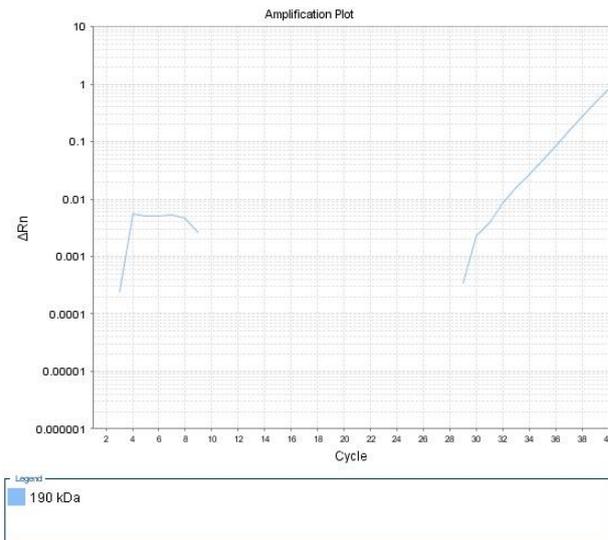


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 M (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

\*Não foi possível salvar a imagem da curva de Melt por problemas no computador do laboratório no dia da análise.

## ANEXO E

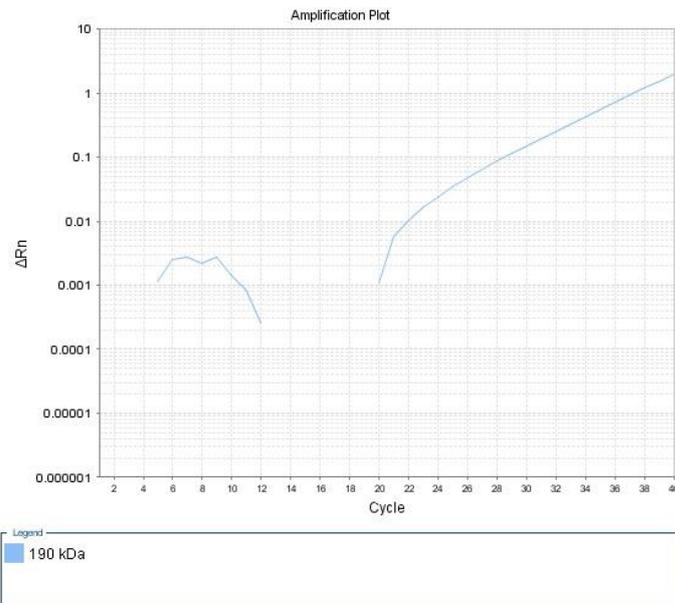


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 N (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

\*Não foi possível salvar a imagem da curva de Melt por problemas no computador do laboratório no dia da análise.

## ANEXO F

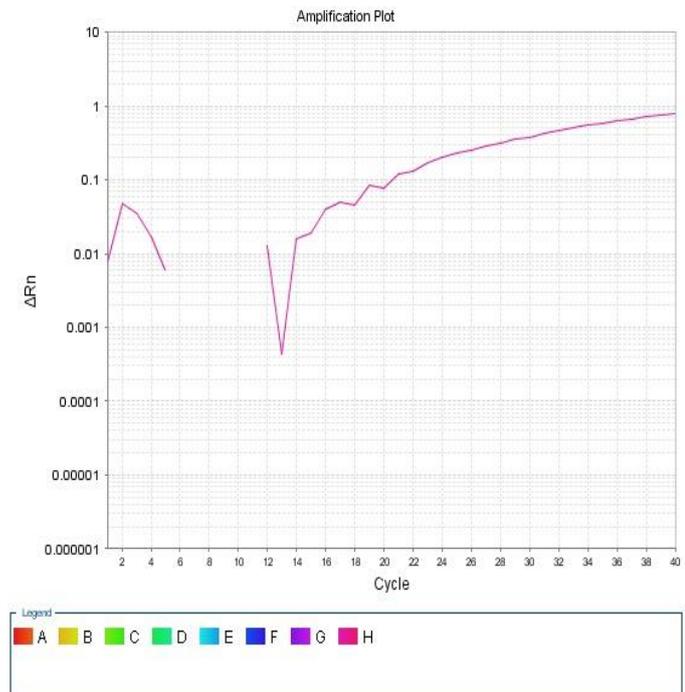
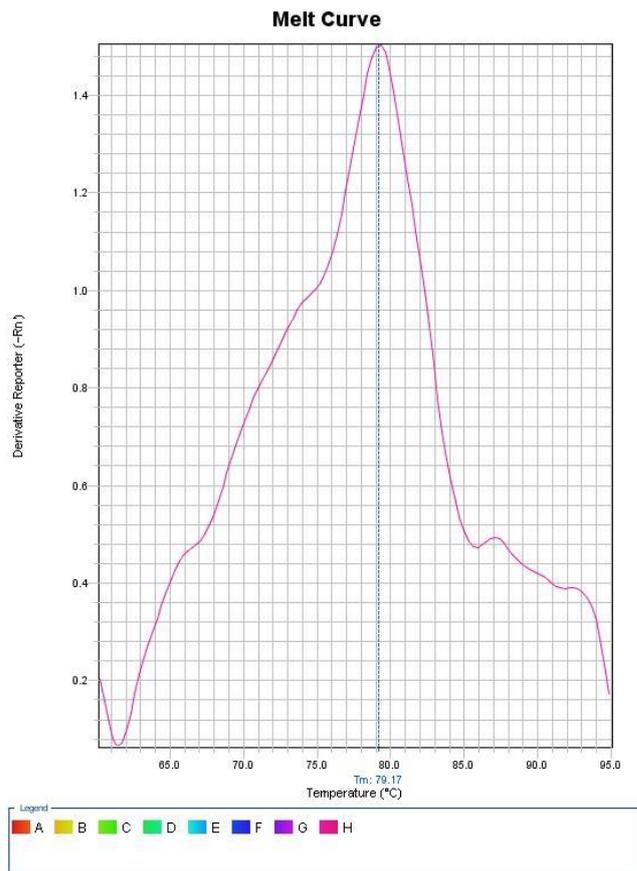


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3980 P (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA.

## ANEXO G

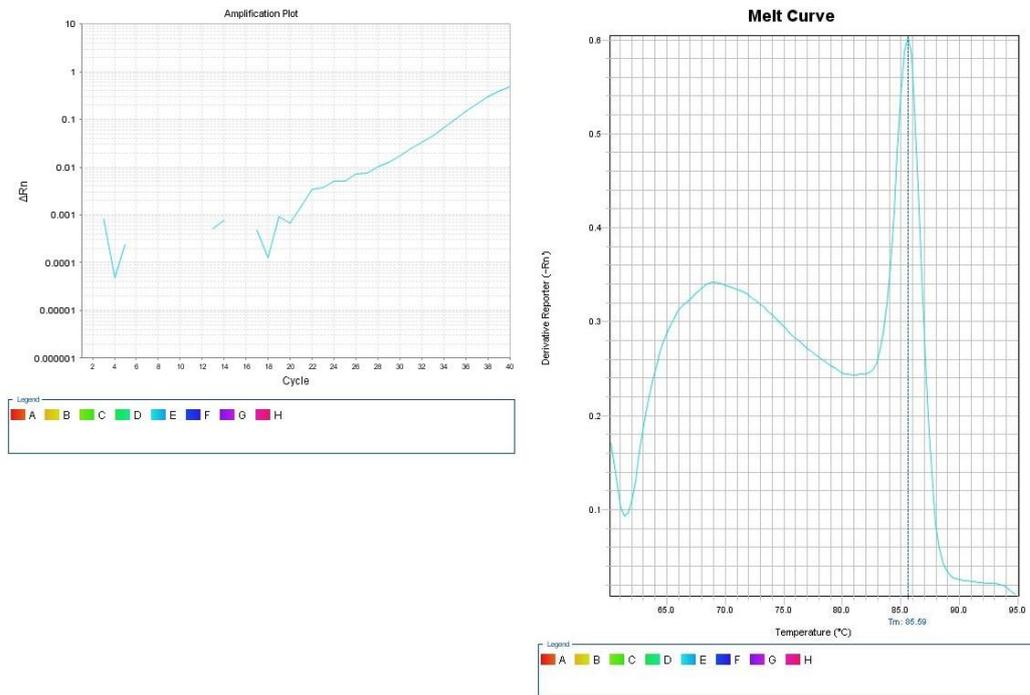


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3993 G (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

## ANEXO H

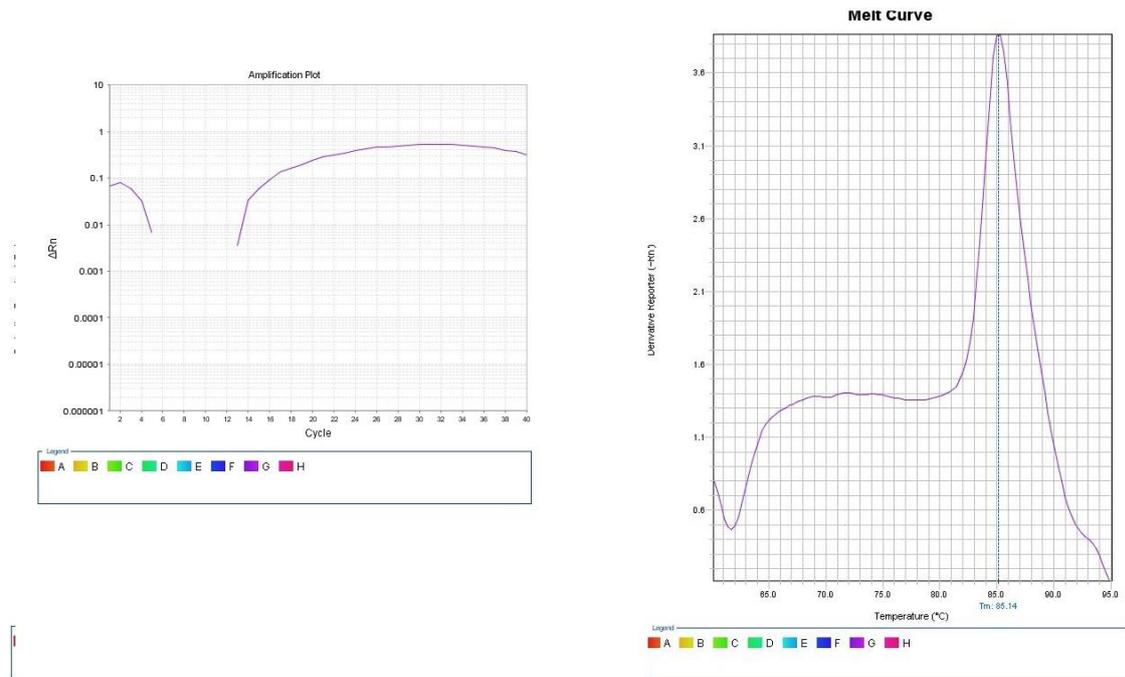


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3994 A (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

## ANEXO I

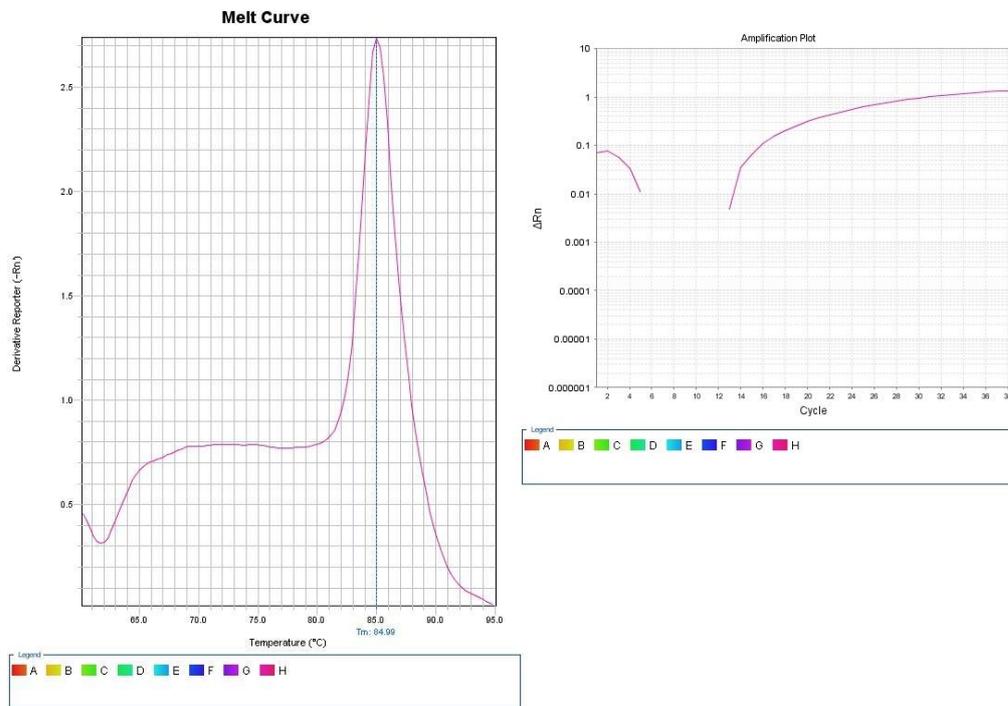


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3994 B (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

## ANEXO J

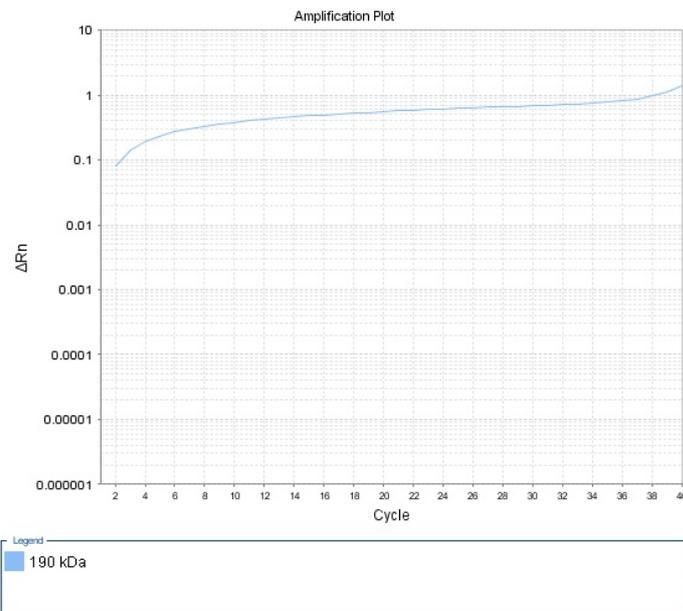


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3979 F (macho de *R. microplus*) por Real Time para detecção do gene OmpA.

\*Não foi possível salvar a imagem da curva de Melt por problemas no computador do laboratório no dia da análise.

## ANEXO K

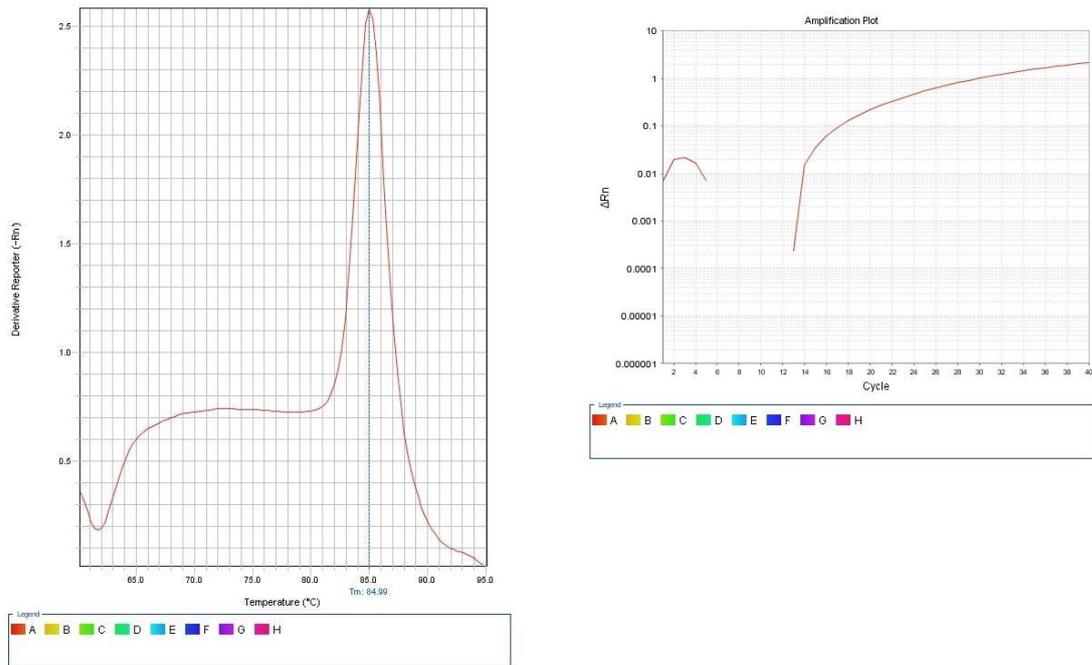


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 3997 A (fêmea de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

## ANEXO L

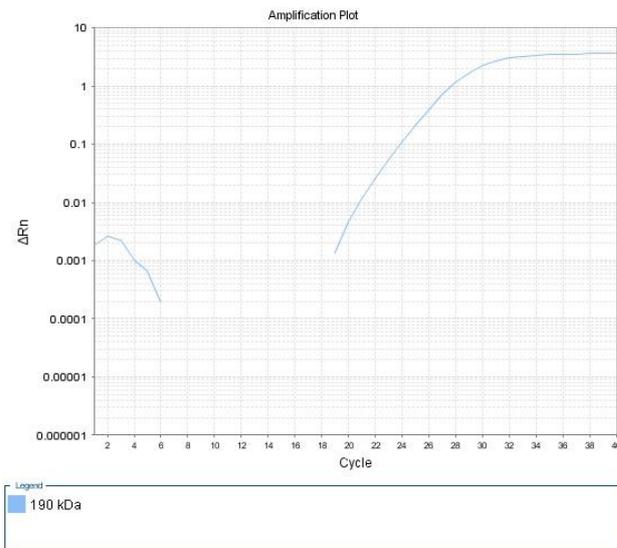


Gráfico de amplificação resultante da análise da amostra 4073 (pool de oito Ninfas de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA

\*Não foi possível salvar a imagem da curva de Melt por problemas no computador do laboratório no dia da análise.

## ANEXO M

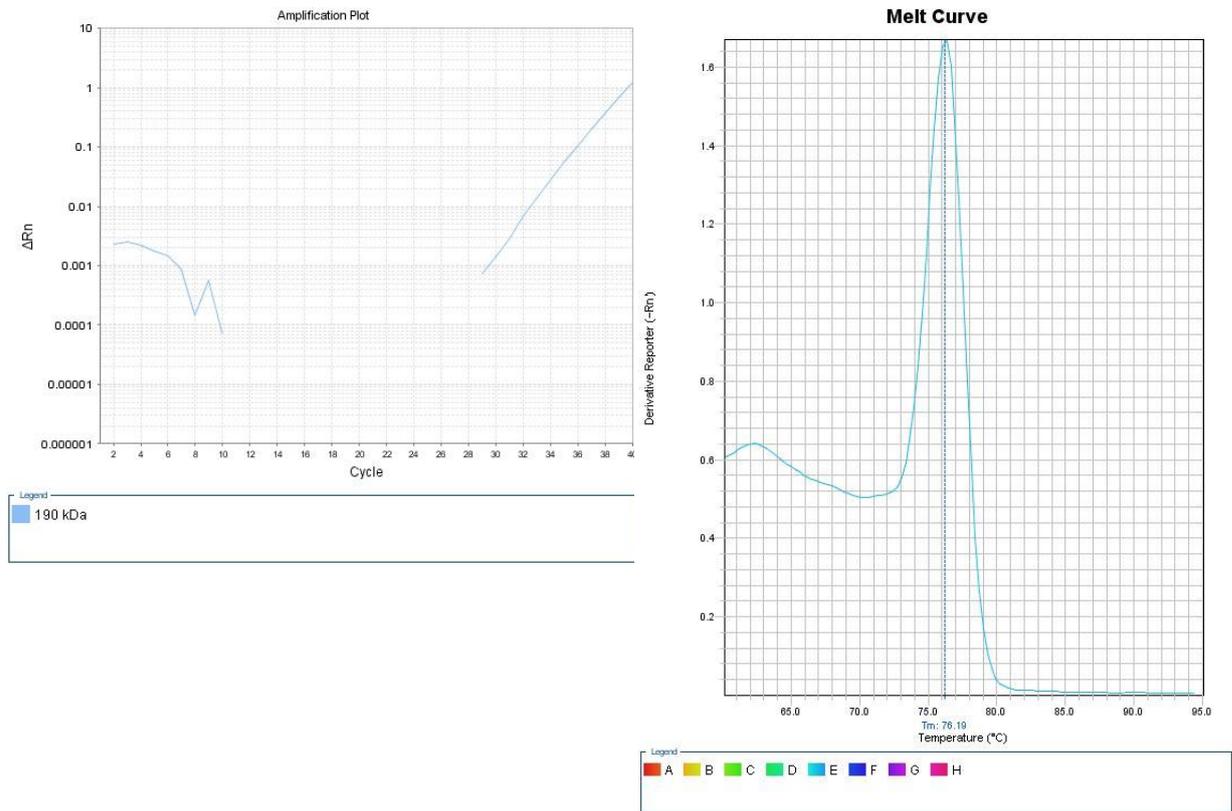


Gráfico de amplificação e curva de Melt resultantes da análise da amostra 4089 (pool de três Ninfas de *A. cajennense*) por Real Time para detecção do gene OmpA