



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINE SIQUEIRA FRANCO

A INFLUÊNCIA DOS FATORES AMBIENTAIS NA OCORRÊNCIA DE
CARRAPATOS (ARTHROPODA, ACARI, IXODIDAE) E *RICKETTSIA* EM
ÁREA DE TRANSMISSÃO E ÁREA DE PREDISPOSIÇÃO PARA A FEBRE
MACULOSA BRASILEIRA

Campinas – SP

2018

CAROLINE SIQUEIRA FRANCO

**A INFLUÊNCIA DOS FATORES AMBIENTAIS NA OCORRÊNCIA DE
CARRAPATOS (ARTHROPODA, ACARI, IXODIDAE) E *RICKETTSIA* EM ÁREA DE
TRANSMISSÃO E ÁREA DE PREDISPOSIÇÃO PARA A FEBRE MACULOSA
BRASILEIRA**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como
parte dos requisitos exigidos para obtenção do
Título de Doutora em Biologia Animal, na área
de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e
Parasitologia.*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA CAROLINE SIQUEIRA FRANCO E
ORIENTADA PELO PROF. DR. ARÍCIO XAVIER
LINHARES.



Orientador: Arício Xavier Linhares

Campinas – SP

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): Não se aplica.

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F848i Franco, Caroline Siqueira, 1988-
A influência dos fatores ambientais na ocorrência de carrapatos (Arthropoda, Acari, Ixodidae) e *Rickettsia* em área de transmissão e área de predisposição para a febre maculosa brasileira / Caroline Siqueira Franco. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: Arício Xavier Linhares.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Amblyomma*. 2. *Rickettsia*. 3. Epidemiologia. 4. Saúde pública. I. Linhares, Arício Xavier, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: The influence of environmental factors on the occurrence of ticks (Arthropoda, Acari, Ixodidae) and *Rickettsia* in areas of transmission and predisposition to brazilian spotted fever

Palavras-chave em inglês:

Amblyomma

Rickettsia

Epidemiology

Public health

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia

Titulação: Doutora em Biologia Animal

Banca examinadora:

Arício Xavier Linhares [Orientador]

Patrícia Jacqueline Thyssen

Fernanda Garros Gadelha

Maicon Diego Grella

Thiago de Carvalho Moretti

Data de defesa: 27-04-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

Campinas, 27 de abril de 2018.

COMISSÃO EXAMINADORA

Dr. Arício Xavier Linhares (orientador)

Dra. Patrícia Jacqueline Thyssen

Dra. Fernanda Ramos Gadelha

Dr. Maicon Diego Grella

Dr. Thiago de Carvalho Moretti

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

**Dedico esse trabalho a
todos que fazem ou fizeram
parte de minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Arício Xavier Linhares, por me aceitar como orientada mais uma vez e por me ajudar em cada etapa do doutorado.

À todos os professores que participaram do meu exame de qualificação: Danilo Ciccone Miguel, Silmara Marques Allegretti e Marlene Tiduko Ueta; aos membros do exame prévio: Patrícia Jacqueline Thyssen, Maicon Diego Grella e Thiago de Carvalho Moretti; e aos membros da banca de defesa: Patrícia Jacqueline Thyssen, Fernanda Garros Gadelha, Maicon Diego Grella e Thiago de Carvalho Moretti pelo trabalho que demandaram para aperfeiçoar minha tese.

Às Prefeituras de Campinas e Mogi Mirim por autorizarem a coleta de material nas áreas de estudo.

Ao Dr. Adriano Pinter, pesquisador da SUCEN-SP, por ceder a *Rickettsia parkeri*, fundamental para esse estudo. E pela disposição em sempre ajudar.

À Olga, funcionária da SUCEN (Campinas, SP), por me ensinar a identificar ninfas do gênero *Amblyomma*.

À Raquel Dietshe Monfardini e Gisele Antoniazzi Cardoso, ambas da USP, que embora tenham realizado experimentos no laboratório por um breve período, me ajudaram com as análises moleculares.

Aos amigos do laboratório de Entomologia Integrativa: Maria Lígia Paseto, Thamiris Smania, Ana Luiza Araújo, Edgard Kamimura, Leticia Salvioni Ansaloni, Gustavo Amaral Faria, Thays Rossignoli, Jackeline Lara, Marina Klemm, Aline Marrara e Marcela Medina.

Aos colegas que tive o prazer de conviver no laboratório: Natane Sibon Purgato, Cauê Mira, Vinícius Silva, Fabio Rezende, Juliana Fulan Ribeiro, Ken, Bryan e Rafael. E à Dona Tacilda, sempre presente e disposta a conversar e ajudar.

À minha família por todo apoio e encorajamento durante todos esses anos de estudo e dedicação. Em especial minha irmã Maíce, que me auxiliou muito nas etapas finais, revisando a tese e me dando força. E ao meu namorado, que entendeu minhas ausências quando estava escrevendo a tese e por estar sempre presente, me apoiando.

À CAPES pela bolsa emergencial concedida, mesmo que pelo período de um ano, ajudando na realização deste trabalho.

À todos que de alguma maneira me ajudaram, muito obrigada!

RESUMO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma zoonose cujo agente etiológico é a bactéria *Rickettsia rickettsii*. No Brasil, o principal vetor é o carrapato de corpo duro *Amblyomma sculptum*. A doença é endêmica em algumas regiões e ausente em outras, mesmo que o local abrigue o vetor e hospedeiros vertebrados amplificadores da bactéria. Portanto, o objetivo deste trabalho foi investigar os fatores ambientais que contribuem para a manutenção de espécies de *Rickettsia* presentes em carrapatos coletados em dois municípios do estado de São Paulo, classificados em área de transmissão e de predisposição para a Febre Maculosa Brasileira. A coleta dos carrapatos foi realizada mensalmente, desde janeiro/2015 até dezembro/2016, no “Parque Ecológico Professor Hermógenes de Freitas Leitão” em Campinas, SP, considerada área de transmissão ativa e nas margens do “Rio Mogi Mirim”, e “Lago do Complexo Lavapés”, em Mogi Mirim, SP, classificados como área predisposta. As coletas foram feitas ativamente por técnica de arrasto e manualmente usando gelo seco como atrativo. ANOVAs foram feitas para avaliar possíveis diferenças entre a abundância de carrapatos e outros parâmetros associados. Testes de correlação avaliaram se possíveis variações na abundância dos carrapatos coletados estavam associadas a fatores climáticos, tais como: temperatura, umidade relativa do ar e precipitação. Extração e amplificação de DNA foram executadas em amostras representativas de carrapatos de cada área para detectar a presença de *Rickettsia* do Grupo Febre Maculosa nas mesmas. Foram coletados 420 carrapatos adultos e 1367 ninfas de *Amblyomma sculptum*; 38 adultos e 45 ninfas de *Amblyomma dubitatum* e 442 larvas de *Amblyomma* sp. em Campinas. Em Mogi Mirim foram coletados 63 adultos e 101 ninfas de *Amblyomma sculptum*; 32 adultos e 79 ninfas de *Amblyomma dubitatum*; 261 larvas de *Amblyomma* sp. e 10 larvas de *Rhipicephalus* sp. Embora a abundância total dos carrapatos não tenha diferido significativamente ($F= 2,94$; $p= 0,0878$) entre os municípios, ela foi influenciada por fatores ambientais, tais como temperatura ($r= 0,28951$; $p< 0,0001$) e umidade relativa ($r= 0,29913$; $p< 0,0001$). *Amblyomma sculptum* estava presente em ambas às áreas, de transmissão e na predisposta. No entanto, nenhuma *Rickettsia* foi detectada nas amostras usando métodos moleculares.

Palavras-chave: *Amblyomma*, *Rickettsia*, epidemiologia, saúde pública.

ABSTRACT

The Brazilian Spotted Fever (BSF) is a zoonotic disease whose etiologic agent is the bacterium *Rickettsia rickettsii*. In Brazil, the main vector is the hard tick *Amblyomma sculptum*. The disease is endemic in some areas and absent in others, even when the latter harbors the vector and the amplifier vertebrate hosts of the bacteria. Therefore, the objective of this study was to investigate the environmental factors that contribute to the maintenance of *Rickettsia* species in ticks collected in two municipalities of the State of São Paulo, classified in area of transmission and of predisposition for the Brazilian Spotted Fever. The collection of ticks was carried out monthly from January/2015 to December/2016, at the “Parque Ecológico Professor Hermógenes de Freitas Leitão” in Campinas, SP considered an area of active transmission and at the banks of the “Mogi Mirim River”, and “Lago do Complexo Lavapés” in Mogi Mirim, SP, classified as prone areas. The collections were made actively by the dragging method and manually using dry ice trapping as attractant. ANOVAs were made to evaluate possible differences between the abundance of ticks and other associated parameters. Correlation tests evaluated whether possible variations in the abundance of ticks collected were associated with climatic factors, such as: temperature, relative humidity and precipitation. Extraction and amplification of DNA were performed on representative samples of ticks from each area to detect the presence of *Rickettsia* of the Spotted Fever Group. Four hundred and twenty adult ticks and 1367 nymphs of *Amblyomma sculptum* were collected; 38 adults and 45 nymphs of *Amblyomma dubitatum* and 442 larvae of *Amblyomma* sp. in Campinas. In Mogi Mirim, 63 adults and 101 nymphs of *Amblyomma sculptum* were collected; 32 adults and 79 nymphs of *Amblyomma dubitatum*; 261 larvae of *Amblyomma* sp. and 10 larvae of *Rhipicephalus* sp. Although the total abundance of the ticks did not differ significantly ($F= 2,94$; $p= 0,0878$) between the municipalities, it was influenced by environmental factors, such as temperature ($r= 0,28951$; $p< 0,0001$) and relative humidity ($r= 0,29913$; $p< 0,0001$). *Amblyomma sculptum* was present in both the transmission and predisposition areas. However, no *Rickettsia* was detected in the samples by using molecular methods.

Keywords: *Amblyomma*, *Rickettsia*, epidemiology, public health.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	11
1.1 Carrapatos	11
1.2 Transmissão de patógenos.....	16
1.3 Gênero <i>Rickettsia</i>	17
1.4 Febre Maculosa Brasileira.....	19
1.5 Hospedeiros vertebrados	20
1.6 Área de transmissão e área predisposta para a FMB.....	22
2. Objetivos	24
2.1 Objetivo geral.....	24
2.2 Objetivos específicos.....	24
3. Material e Métodos	25
3.1 Locais de coleta.....	25
3.2 Abundância e sazonalidade de carrapatos vetores	28
3.2.1 Abundância e métodos de coleta.....	28
3.2.2 Identificação dos carrapatos	33
3.3 Dados meteorológicos.....	33
3.4 Análises dos dados	33
3.5 Investigação molecular.....	34
3.5.1 Extração de DNA	34
3.5.2 Amplificação do DNA pela PCR	34
4. Resultados	36
4.1 Abundância e sazonalidade de carrapatos vetores	36
4.2 Dados meteorológicos.....	40
4.3 Investigação molecular.....	42
5. Discussão	43
5.1 Abundância e sazonalidade de carrapatos vetores	43
5.2 Dados meteorológicos.....	47
5.3 Investigação molecular.....	49
6. Conclusões.....	52
Referências Bibliográficas	53
Anexos.....	65

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARRAPATOS

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, Subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixoidae (KOLLER e MATIAS, 2016). A classe Arachnida compreende artrópodes que não possuem antenas, asas, mandíbulas e um segmento corporal definido como cabeça; e apresentam quelíceras, pedipalpos e o corpo dividido em cefalotórax e abdome, sendo que os segmentos abdominais (tagmas) apresentam-se fundidos (SERRA-FREIRE, 2011; KOLLER e MATIAS, 2016). Este grupo exibe morfologia muito diversificada, como aranhas, escorpiões, carrapatos, ácaros de sarna, entre outros, podendo ser encontrados em quase todas as regiões temperadas e tropicais do planeta (GUIMARÃES et al., 2001).

Carrapatos e outros ácaros constituem um grupo muito heterogêneo, apresentando grande diversidade de hábitos e habitats, pois enquanto alguns membros alimentam-se exclusivamente de vegetais, outros são parasitas de vertebrados e invertebrados (GUIMARÃES et al., 2001; SERRA-FREIRE, 2011; BRITES-NETO, 2013). No caso de carrapatos ectoparasitas obrigatórios de vertebrados, a alimentação sanguínea é essencial para completar seu desenvolvimento, com o ciclo de vida apresentando uma fase parasitária de repasto sanguíneo e outra fase de vida livre (período de oviposição e ecdise) (GUIMARÃES et al., 2001).

São reconhecidas cerca de 825 espécies de carrapatos, divididas em três famílias: Ixodidae (625 espécies), Argasidae (195 espécies) e Nuttalliellidae (SUCEN, 2004), sendo esta última representada por apenas uma espécie africana: *Nuttalliella namaqua* (KOLLER e MATIAS, 2016). Segundo Brites-Neto (2013), os representantes dos gêneros *Ixodes*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Cosmiomma*, *Aponomma*, *Margaropus*, *Rhipicentor* e *Hyalomma* são carrapatos pertencentes à família Ixodidae, enquanto os gêneros *Argas*, *Ornithodoros*, *Otobius*, *Antricola*, *Nothoaspis* e *Carios* correspondem à família Argasidae.

Os argasídeos são carrapatos de corpo mole (por não apresentarem escudo dorsal em nenhuma de suas fases de vida), e as peças bucais de ninfas e adultos situam-se ventralmente no interior de uma depressão, chamada camerostoma. Já a espécie de Nuttalliellidae possui um pseudoescudo com a parte mais elevada rígida, e articulações nas pernas lembrando bolas encaixadas entre si (KOLLER e MATIAS, 2016).

A família Ixodidae é representada por carrapatos de corpo duro, que são caracterizados por apresentarem escudo fortemente esclerotizado em todas as fases de desenvolvimento. Nas larvas, ninfas e fêmeas, esta estrutura ocupa um terço do dorso, já nos machos cobre inteiramente seu corpo (GUIMARÃES et al., 2001). Esta família engloba a maioria das espécies de carrapatos do Brasil, dentre elas as de maior importância médico-veterinária (OLIVER, 1989; SUCEN, 2004).

O ciclo biológico dos ixodídeos consiste do ovo (estágio imóvel) e três estágios móveis e hematófagos (larva, ninfa e adulto) (GUIMARÃES et al., 2001). As larvas possuem três pares de pernas; as trocas gasosas são realizadas pelo exoesqueleto, uma vez que não possuem abertura respiratória determinada; além de serem imaturas sexualmente. Após o primeiro repasto sanguíneo, as larvas ingurgitadas sofrem ecdise e se tornam ninfas. As ninfas apresentam quatro pares de pernas, aberturas respiratórias semelhantes às dos adultos e não possuem abertura genital, sendo também imaturas sexualmente. Após alimentação, as ninfas sofrem ecdise originando os adultos, machos e fêmeas (SERRA-FREIRE, 2011).

As fêmeas ingurgitadas iniciam a oviposição dentro de aproximadamente dez dias, quando as condições do meio estão favoráveis. Após a oviposição, que leva entre 10 a 30 dias, a fêmea morre. Ao eclodirem dentro de igual período, as larvas permanecem inativas na vegetação do solo por vários dias enquanto sua cutícula endurece. Posteriormente, encontram um hospedeiro no qual o repasto sanguíneo leva de quatro a seis dias. A larva ingurgitada procura um local no ambiente para digerir o sangue e sofrer ecdise, sendo que o período de pré-muda ninfal dura geralmente 14 dias. Em seguida, a ninfa procura novo hospedeiro, e a alimentação ocorre de quatro a oito dias. Logo em seguida, a ninfa ingurgitada solta-se do hospedeiro para encontrar um local para passar por nova ecdise, que ocorre em torno de 23 a 25 dias, tornando-se adulta. Na sequência, a cópula ocorre geralmente sobre o hospedeiro (KETTLE, 1985; GUIMARÃES et al., 2001; PINTER et al., 2011).

A quantidade de hospedeiros necessários para as diferentes espécies de carrapatos completarem seu ciclo de vida varia. Os gêneros *Boophilus* e *Dermacentor* são classificados como monoxenos ou carrapatos de um único hospedeiro, nos quais as mudas dos estágios de larva para a ninfa e de ninfa para adulto se realizam sobre o mesmo hospedeiro. Os demais gêneros de ixodídeos do Brasil são trioxenos e precisam de três hospedeiros diferentes para completar a fase parasitária, ou seja, cada estágio se alimenta em um hospedeiro. Tal comportamento faz dos carrapatos trioxenos os de maior importância na transmissão de patógenos na natureza, pelo fato de parasitarem diferentes espécies de vertebrados, facilitando o intercâmbio de agentes causadores de doenças entre os hospedeiros (SUCEN, 2004).

Carrapatos dependem do seu hospedeiro para serem transportados, uma vez que são desprovidos de capacidade de locomoção a grandes distâncias (PEREZ et al., 2008; PEREZ, 2013). Porém, algumas espécies de Ixodidae, no estágio adulto, podem se dispersar entre 2 a 10 m do lugar em que são soltos. Já a dispersão de formas imaturas (larvas ou ninfas) se limita a poucos centímetros de distância (PEREZ et al., 2008).

Por isso, a fauna silvestre participa de forma decisiva na atividade de transporte de vetores, promovendo a disseminação e adaptação dos carrapatos a diversos tipos de ambientes. Dentre os animais silvestres, a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1766) tem contribuído enormemente para garantir o sucesso do crescimento populacional de algumas espécies de carrapatos, especialmente aquelas associadas à Febre Maculosa Brasileira (FMB) (PEREZ et al., 2008).

No Brasil, o gênero *Amblyomma*, constituído por 32 espécies, é responsável pela transmissão de diversos patógenos, e possuem representantes parasitas de anfíbios, répteis, aves e mamíferos em todas as regiões geográficas do país. As espécies mais frequentemente discutidas por sua importância veterinária são: *Amblyomma aureolatum* Pallas, 1772; *Amblyomma ovale* Koch, 1844; *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888; *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899; *Amblyomma dissimile* Koch, 1844; *Amblyomma longirostre* Koch, 1844 e *A. rotundatum* Koch, 1844 (SERRA-FREIRE, 2011).

Análises genéticas e morfológicas evidenciaram que *Amblyomma cajennense* representa um complexo com seis espécies: *Amblyomma cajennense sensu stricto* (s.s) Fabricius, 1787; *Amblyomma interandinum* Beati, Nava e Cáceres, 2014; *Amblyomma mixtum*

Koch, 1844; *Amblyomma patinoi* Labruna, Nava e Beati, 2014; *A. sculptum*; e *Amblyomma tonelliae* Nava, Beati e Labruna, 2014. Três delas, *A. interandinum*, *A. patinoi* e *A. tonelliae* são espécies recentemente descritas, enquanto *A. mixtum* e *A. sculptum* são espécies revalidadas. A espécie *A. cajennense* é encontrada na região da Amazônia (Venezuela, Guianas, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins), *A. interandinum* é encontrada na região dos Andes (Peru), *A. mixtum* se estende do Texas (EUA) a oeste do Equador, *A. patinoi* ocorre na Cordilheira Oriental da Colômbia, *A. tonelliae* ocupa regiões no centro-norte da Argentina, Bolívia e Paraguai e, *A. sculptum* distribui-se desde áreas do norte da Argentina, Bolívia, Paraguai, até as áreas brasileiras (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, sul do Paraná, Pernambuco e Piauí, no norte de Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e no centro de Goiás) (NAVA et al., 2014).

Na região sudeste e Central do Brasil a espécie encontrada é *A. sculptum* (antigamente denominada *A. cajennense*). Em condições naturais, *A. sculptum* está associada ao bioma Cerrado (savana brasileira) e Pantanal. Não é encontrada na Mata Atlântica, mas aparece em áreas degradadas de tal bioma, próximas ou não de corpos d'água, nos estados da região sudeste e centro-oeste, mas também na Bahia, Paraná e Santa Catarina (PINTER et al., 2011; SZABÓ et al., 2013; PINTER et al., 2016).

Amblyomma sculptum tem ciclo de vida anual, conduzido pela diapausa de larvas, durante os períodos mais quentes do ano. As larvas saem em busca de hospedeiros no outono, embora a eclosão das larvas possa ocorrer no verão. Este comportamento está associado à diminuição da duração do dia (fotofase) e da temperatura. Os adultos são predominantes na primavera e verão, as larvas no outono e no inverno, e as ninfas no inverno e primavera (SZABÓ et al., 2013). Fêmeas de *A. sculptum* são capazes de entrar no solo, perto de raízes, a uma profundidade de 5 cm quando as condições ambientais são desfavoráveis (temperaturas baixas, redução no fotoperíodo e nos níveis de umidade relativa do ar). Esse comportamento permite que as fêmeas diminuam a desidratação do corpo e garantam sua sobrevivência por longos períodos (OLIVEIRA et al., 2000).

A espécie *A. sculptum* apresenta baixa especificidade por hospedeiros e, portanto, pode alimentar-se em equídeos, caprinos, bovinos, suínos, aves silvestres, cães, gatos, entre outros, inclusive humanos. De um modo geral, a tendência é a de que o hospedeiro seja de

porte maior, à medida que os carrapatos evoluem nas fases de seu ciclo de vida. Esta espécie é a responsável pela transmissão da FMB no interior do estado de São Paulo. A transmissão da bactéria da FMB para os seres humanos se dá, principalmente, pela picada do carrapato infectado na fase ninfal, podendo estar relacionado com baixa especificidade por hospedeiros, e também pelo tamanho diminuto, que dificulta sua visualização, embora existam relatos de transmissão pelas demais fases do seu ciclo de vida. Além disso, há falta de informação a respeito da doença em áreas infestadas (SZABÓ et al., 2013; PINTER et al., 2016).

A distribuição de *Amblyomma aureolatum* está intrinsecamente associada a áreas remanescentes da Floresta Pluvial Atlântica de montanha. Esta espécie é conhecida como carrapato amarelo do cão, sendo responsável pela transmissão da FMB na região Metropolitana de São Paulo (em áreas urbanas que têm divisa com fragmentos de Mata Atlântica). Nas áreas nativas de Mata Atlântica, carnívoros silvestres são hospedeiros naturais da fase adulta do carrapato e, em áreas periurbanas, os cães e gatos desempenham o papel de hospedeiros para o artrópode (PINTER et al., 2016).

Por outro lado, *A. ovale* ocorre em diversas localidades brasileiras e sua distribuição não atinge áreas de floresta com elevações superiores a 600 metros. No estado de São Paulo, este carrapato é encontrado na Mata Atlântica litorânea e regiões de Mata Atlântica do oeste Paulista. As fases imaturas parasitam pequenos roedores silvestres, porém, durante a fase adulta esta espécie parasita carnívoros. Essa espécie é vetor de riquetsia do Grupo Febre Maculosa (GFM) (*Rickettsia* sp. – Cepa Mata Atlântica), cuja virulência é menor quando comparada à *R. rickettsii* Brumpt, 1922. Até o momento, não há registros de óbitos humanos causados por esta cepa (PINTER et al., 2016).

Amblyomma dubitatum é um carrapato silvestre encontrado na América do Sul e, no Brasil, a distribuição geográfica está concentrada no Cerrado e na Mata Atlântica, estabelecendo-se principalmente em áreas de mata ciliar e coleções líquidas lóticicas ou lênticas. Sua distribuição é menos restrita do que seu principal hospedeiro, a capivara, o que sugere diferentes respostas às variáveis ambientais. Existem poucas informações a respeito de seu ciclo de vida, tanto na natureza quanto em condições laboratoriais (ALMEIDA et al., 2001; PINTER et al., 2011; SZABÓ et al., 2013; MATIAS et al., 2015).

A capacidade vetorial de *A. dubitatum* para doenças humanas é indeterminada, mas é comumente associado à *Rickettsia bellii* Philip et al., 1983, uma bactéria não pertencente ao GFM e, até o momento, conhecida por não ser patogênica (SZABÓ et al., 2013). Embora não cause tantas picadas quanto *A. sculptum*, a espécie *A. dubitatum* já foi encontrada em humanos (SZABÓ et al., 2013; MATIAS et al., 2015). Tanto *A. dubitatum* quanto *A. sculptum* possuem hospedeiros semelhantes, distribuição geográfica parcialmente coincidente (distribuindo-se com facilidade em zonas periurbanas, rurais e periféricas de matas) e caracteres morfológicos parecidos (SERRA-FREIRE, 2011).

1.2 TRANSMISSÃO DE PATÓGENOS

Os carrapatos constituem o segundo maior grupo de vetores que transmitem patógenos, incluindo vírus, bactérias e protozoários (SOARES et al., 2000). Os principais fatores que tornam os carrapatos importantes vetores de patógenos a humanos e animais incluem: (1) serem hematófagos, prendendo-se firmemente à pele do hospedeiro, dificultando sua remoção; (2) lento período de alimentação (especialmente em ixodídeos), além da facilidade de dispersão, o que possibilita um tempo maior para a transferência de patógenos aos hospedeiros; (3) grande diversidade de hospedeiros, aumentando a possibilidade de adquirir e transmitir patógenos; (4) alta longevidade (particularmente entre os argasídeos), aumentando a possibilidade de adquirir e transmitir patógenos; (5) transmissão transovariana de alguns patógenos, permitindo infecção para membros da próxima geração; (6) ausência relativa de inimigos naturais; (7) corpo fortemente esclerotizado, tornando-os resistentes às condições adversas (ixodídeos); (8) grande potencial reprodutivo; (9) ocorrência de partenogênese em algumas espécies (GUIMARÃES et al., 2001).

Carrapatos da família Ixodidae são reservatórios e vetores de *Rickettsia* do GFM (RAOULT e ROUX, 1997; MACALUSO et al., 2002; PAROLA et al., 2005), sendo que as espécies de maior importância na transmissão da doença em território brasileiro são: *A. sculptum*, *A. aureolatum* e *A. ovale* (PINTER et al., 2016). *Amblyomma dubitatum* desempenha papel importante na manutenção e amplificação da *R. rickettsii* na natureza (PAROLA et al., 2005; PEREZ et al., 2008; KRAWCZAK et al., 2014). As bactérias são adquiridas através da alimentação em hospedeiros que estão no período de riquetsemia (são

sensíveis ao patógeno; mantêm a bactéria circulando no sangue em níveis suficientes para carrapato se infectar), via transmissão transovariana, transmissão transestadial ou cópula (MACALUSO et al., 2002; PINTER et al., 2016).

Na transmissão transovariana, os ovários e oócitos de carrapatos fêmeas estão infectados. Além desta, a transmissão também pode ocorrer via transestadial, ou seja, quando o ovo está infectado conseqüentemente, todas as fases subseqüentes estarão infectadas (RAOULT e ROUX, 1997; KRAWCZAK et al., 2014).

Em *Amblyomma sculptum* ocorre tanto à transmissão transestadial quanto a transovariana e, portanto, uma vez que o ovo esteja infectado com *R. rickettsii*, os próximos estágios (larvas, ninfas e adultos) também irão apresentar a bactéria. A transmissão transovariana também acontece, já que a bactéria é passada pelo menos para a próxima geração. Após a infecção primária, o carrapato permanece infectado durante toda sua vida (GRECA et al., 2008).

A porcentagem de carrapatos infectados, mesmo em áreas de alta endemicidade, é baixa e varia de um ano para outro. Porém, a infecção pode ser mantida na natureza através da transmissão transovariana. Neste caso, os carrapatos seriam os principais reservatórios e os hospedeiros vertebrados serviriam apenas para a manutenção do seu ciclo biológico (GUIMARÃES et al., 2001). Portanto, além de vetores, os carrapatos são reservatórios de *Rickettsia* na natureza, uma vez que todos os estágios de vida são capazes de permanecer infectados meses ou anos à espera do hospedeiro, garantindo um foco endêmico prolongado (SUCEN, 2004).

1.3 GÊNERO *RICKETTSIA*

As bactérias do GFM fazem parte do gênero *Rickettsia*, família Rickettsiaceae, ordem Rickettsiales. São bacilos gram-negativos que fazem parte das α -proteobactérias, têm a forma de haste, são intracelulares obrigatórias e normalmente não infectam humanos durante seu ciclo natural (PAROLA et al., 2005; PACHECO et al., 2008).

O gênero *Rickettsia* possui 26 espécies com nomes válidos e publicados. Porém, algumas espécies são divididas em subespécies, existindo mais de 70 cepas sem identificação ou incompletamente descritas. A única espécie de *Rickettsia* relatada infectando carrapatos no

Brasil, até 2003, era *R. rickettsii*. Nos últimos 12 anos, o número de espécies de *Rickettsia* associadas a carrapatos aumentou, com relatos de várias cepas, incluindo *Rickettsia parkeri* Parker, 1937, *Rickettsia rhipicephali* (ex Burgdorfer et al., 1978) Weiss e Moulder, 1988, *Rickettsia monteiroi*, *Rickettsia massiliae* Beati e Raoult, 1993, “*Candidatus Rickettsia amblyommi*” e “*Candidatus Rickettsia andeanae* infectando carrapatos na América do Sul (OGRZEWALSKA e PINTER, 2016).

Novas espécies de *Rickettsia* têm sido identificadas em diversos países, em grande parte graças ao maior poder discriminatório dos métodos de biologia molecular (GALVÃO et al., 2005). A reação em cadeia da polimerase (PCR) é útil na detecção e identificação de espécies de *Rickettsia* patogênicas em diferentes amostras, e também pode ser utilizada para determinar o gênero e a espécie do agente (GRECA et al., 2008).

O gênero *Rickettsia* é dividido em quatro grupos: o GFM, o grupo do tifo, o grupo de transição e o grupo ancestral (FORTES et al., 2010). Porém, o gênero tem sido reclassificado em diferentes grupos, incluindo o GFM, o grupo do tifo, o grupo de transição, o grupo *bellii*, o grupo *canadensis* e vários outros grupos basais (PACHECO et al., 2011). No Brasil, pelo menos sete espécies de *Rickettsia* foram relatadas: *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali* e *Rickettsia amblyommi* Stothard e Fuerst, 1995, pertencentes ao GFM, sendo transmitidas através de carrapatos; *Rickettsia felis* Bouyer et al., 2001 pertence ao grupo de transição e *Rickettsia typhi* (Wolbach e Todd 1920) Philip, 1943 faz parte do grupo do tifo, ambas transmitidas por pulgas; e *Rickettsia bellii* do grupo ancestral é transmitida por carrapatos (FORTES et al., 2010; PACHECO et al., 2011).

Outras espécies de *Rickettsia* também foram relatadas no Brasil, como *Rickettsia* sp. - cepa Mata Atlântica, pertencente ao GFM e encontrada no estado de São Paulo, Bahia e Santa Catarina (SPOLIDORIO et al., 2010; BARBIERI et al., 2014), e *R. monteiroi* isolada de *Amblyomma incisum* Neumann, 1906 no sudeste do Brasil, com análises moleculares indicando que *R. monteiroi* pertence ao grupo *canadensis* (PACHECO et al., 2011).

A bactéria *Rickettsia rickettsii* possui menos de 0,5µm de diâmetro, é intracelular obrigatória e possui considerável pleomorfismo, porém nunca apresenta o formato esférico. Além disso, tem tropismo por células endoteliais dos hospedeiros vertebrados, causando

vasculite em diferentes regiões do organismo (ARTHUR, 1961; BURGDORFER e BRINTON, 1988).

1.4 FEBRE MACULOSA BRASILEIRA

Rickettsia rickettsii é a bactéria causadora da Febre Maculosa (FM), circulando entre carrapatos e mamíferos, independente da participação humana. A doença possui casos confirmados nos Estados Unidos, Canadá, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Brasil e Argentina. No Brasil, a FMB apresenta taxas de letalidade de até 40%, e possui grande importância em determinadas áreas (FREITAS et al., 2009; GRECA et al., 2008; ARAÚJO et al., 2015).

Na América do Sul e Central, infecções naturais com *R. rickettsii* foram identificadas em *A. sculptum*, vetor primário da FMB (PAROLA et al., 2005). Esta espécie de carrapato possui baixa especificidade parasitária nos estágios imaturos, parasitando diferentes classes de animais, inclusive humanos (PEREZ et al., 2008). No Brasil, a região sudeste possui o maior número de casos da doença, pois apresenta altas infestações de *A. sculptum*, espécie muito agressiva para humanos, mantidos por um dos seus maiores hospedeiros, a capivara (SZABÓ et al., 2013). A notificação de casos de FMB ocorre com maior frequência em São Paulo, Minas Gerais, Santa Catarina, Rio de Janeiro e Espírito Santo (ARAÚJO et al., 2015).

Na região sudeste, a maior incidência de casos relatados é no estado de São Paulo, onde foram notificados 882 casos de FMB, com 435 óbitos (letalidade de 49%), entre 1985 e 2017 (ARAÚJO et al., 2015; CVE, 2017). A distribuição restrita dos casos para essa região é característica das doenças transmitidas por carrapatos, normalmente focais, uma vez que os carrapatos possuem mobilidade reduzida, mas podem ser transportados por animais vertebrados domésticos, rurais ou silvestres, expandindo a doença (ARAÚJO et al., 2015).

A transmissão da *R. rickettsii* aos humanos ocorre através da picada de carrapatos infectados, não havendo transmissão direta, por ser uma doença infecciosa e não contagiosa (PINTER et al., 2016). Uma maneira menos frequente de transmissão desse patógeno ocorre através de fezes contaminadas que entram em lesões da pele (GRECA et al., 2008).

As espécies de *Rickettsia* permanecem em um estado de latência metabólica como forma de sobrevivência, enquanto estão parasitando um carrapato no ambiente. Quando o carrapato inicia o parasitismo no hospedeiro, o aumento da temperatura corporal e o aporte de substâncias presentes no sangue fazem com que a bactéria inicie o processo de reativação, que leva à restauração de sua virulência (PINTER et al., 2016).

No hospedeiro humano, a bactéria *Rickettsia* se localiza e se multiplica em células endoteliais pequenas e vasos sanguíneos de porte médio. O período de incubação, após a picada do carrapato, varia de dois a 14 dias (média de sete dias). Os sintomas são inespecíficos e incluem: febre alta, dor de cabeça, mialgia, náusea, vômito, anorexia, dor abdominal e diarreia, que podem ser confundidos com os de leptospirose, dengue, hepatite viral, salmonelose e encefalite malárica. Após três dias de febre, aparecem máculas e erupção cutânea, que podem evoluir para pápulas ou petéquias, estas podendo estar ausentes em 9-12% dos pacientes, dificultando e retardando o diagnóstico (PAROLA et al., 2005; ARAÚJO et al., 2015).

Devido a dificuldade no diagnóstico, o desconhecimento por parte da população e à desinformação dos serviços de saúde, o número de mortes pode chegar a 80% dos casos não tratados. A taxa de mortalidade está relacionada ao diagnóstico precoce e início rápido de tratamento apropriado, pois quando o tratamento se inicia nos três primeiros dias, a taxa de mortalidade é em torno de 2% para crianças e de 9% para idosos, acima de 65 anos (ARAÚJO et al., 2015).

1.5 HOSPEDEIROS VERTEBRADOS

Uma espécie de vertebrado é considerada um bom hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* na natureza quando preenche alguns atributos, como: ser abundante na área endêmica para FMB; ser suscetível à infecção por *R. rickettsii*, manter a bactéria circulando em níveis plasmáticos suficientes para que os carrapatos se infectem ao se alimentarem nele e, ter uma alta taxa de renovação populacional, com introdução constante de animais suscetíveis na população (PEREZ et al., 2008).

A capivara é o hospedeiro principal da FMB, sendo o maior roedor vivo, podendo pesar mais de 50 Kg. É semi-aquática e amplamente distribuída na América do Sul, além de

ser uma espécie gregária, em que um grupo familiar típico é constituído de três a quatro machos e fêmeas, sendo um dos machos o líder do grupo. A proibição de caça por lei federal brasileira, o declínio de predadores naturais e a alta capacidade reprodutiva deste roedor contribuem para a sua expansão no habitat e aumento da população (QUEIROGAS et al., 2012).

O aumento da população de capivaras em áreas antropizadas geralmente está associado a altos níveis de infestação por carrapatos de uma ou ambas as espécies, *A. sculptum* e *A. dubitatum*. Capivaras são bastante resistentes e suportam altas cargas de infestação por carrapatos (QUEIROGAS et al., 2012). Além disso, são hospedeiros para todas as fases parasitárias de *A. sculptum*, sendo responsável pela geração de novas linhagens de carrapatos infectados (BRITES-NETO et al., 2013).

Capivaras podem ser infectadas com *R. rickettsii* e não apresentar sintomas clínicos da doença, e o período de riquetsemia dura aproximadamente 10 dias. Porém, para que novos carrapatos se tornem infectados, é necessária introdução contínua de capivaras (geralmente animais juvenis – suscetíveis à infecção) para a manutenção da bactéria (SZABÓ et al., 2013).

Para *Amblyomma dubitatum*, a capivara é o melhor hospedeiro para as formas imaturas, sendo que para o estágio adulto, a capivara é o hospedeiro primário (essencial para o desenvolvimento), já que fêmeas ao parasitarem esse roedor mostram elevada capacidade de ingurgitamento e maior peso das massas de ovos após alimentação (PEREZ et al., 2008; PEREZ, 2013).

As capivaras, os cavalos (*Equus caballus* Linnaeus, 1758) e antas (*Tapirus terrestris* Linnaeus, 1758) são hospedeiros principais (primários) para o estabelecimento de *A. sculptum*. Porém, este carrapato se alimenta em qualquer hospedeiro de médio ou grande porte quando a população de carrapatos é grande, sendo hospedeiros secundários dezenas de espécies de mamíferos e aves. Entre os hospedeiros secundários, está incluído o cão doméstico, que muitas vezes é infestado em áreas rurais do Brasil (HORTA et al., 2004; PEREZ et al., 2008).

Os gambás (*Didelphus* sp.) possuem grande potencial como dispersores e amplificadores para manterem o ciclo de *R. rickettsii* na natureza em carrapatos, devido à alta

capacidade de abrigarem grandes populações de *Amblyomma* sp. (PEREZ et al., 2008). Gambás se infectam com a bactéria sem que haja manifestação da doença, mas desenvolvem riquetsemia suficiente para infectar carrapatos (MORAES-FILHO, 2017). São infestados por estágios imaturos de *A. sculptum* e *A. dubitatum*, e apresentam altos títulos de anticorpos para *R. rickettsii*. Por serem de porte pequeno e terem hábitos crepusculares e noturnos, estes mamíferos transitam por áreas onde capivaras não têm acesso, aumentando a possibilidade de dispersão ou recolonização de carrapatos (PEREZ et al., 2008; HORTA et al., 2010).

1.6 ÁREA DE TRANSMISSÃO E ÁREA PREDISPOSTA PARA A FMB

No estado de São Paulo, a ocorrência de casos de FMB em algumas áreas está associada à presença de capivaras, por serem amplificadoras de *R. rickettsii*. Devido à necessidade de manejo populacional de capivaras para auxiliar no controle da doença, foi proposto uma classificação das áreas para a FMB e divulgação de informações aos municípios (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

A classificação das áreas é feita de acordo com a presença de carrapatos do gênero *Amblyomma* associada à presença de seres humanos, com risco de parasitismo. As áreas são classificadas em: área silenciosa, área sem infestação ou área infestada (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

A área silenciosa é aquela em que não existem informações sobre a ocorrência do vetor, portanto, deve ser estimulada a notificação por parasitismo humano por carrapatos nestas áreas. A área sem infestação é aquela em que não foi encontrado carrapatos (gênero *Amblyomma*) após pesquisa acarológica. É considerada área infestada aquela na qual foi encontrado carrapatos do gênero *Amblyomma*. Uma vez que uma área seja classificada como “área infestada”, uma segunda classificação deve ser realizada: Transmissão, Risco, Predisposta ou Alerta (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

Uma área de transmissão é aquela em que foi identificado o Local Provável de Infecção (LPI) de casos confirmados ou compatíveis de FMB por um período prévio de 10 anos. Nessas áreas não é necessário à realização de sorologia em hospedeiros sentinelas para a classificação da área, tendo em vista a circulação da bactéria na população humana (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016). É considerada área de risco aquela que

possui frequência humana, pesquisa acarológica positiva e presença significativa de hospedeiros sentinelas positivos na sorologia para *Rickettsia* do GFM. A área predisposta é aquela que possui frequência de população humana, pesquisa acarológica positiva para *Amblyomma* sp. e presença de hospedeiros vertebrados amplificadores para *Rickettsia* do GFM. Por fim, a Área de Alerta é aquela com alta frequência humana, pesquisa acarológica positiva e ausência significativa de animais sororreagentes para *Rickettsia* do GFM ou áreas com baixa frequência humana, com pouco risco de infestação por carrapatos (GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2016).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar quais os mecanismos que contribuem para a manutenção da endemicidade da FMB nos municípios de Campinas, SP e Mogi Mirim, SP.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar se a abundância e a composição faunística de carrapatos vetores, ou potenciais vetores, diferem entre área de transmissão da FMB e área predisposta;
- Avaliar se a abundância de carrapatos vetores é influenciada por fatores ambientais, tais como: temperatura, umidade relativa do ar e precipitação;
- Verificar se há diferença na prevalência de *Rickettsia*, do Grupo Febre Maculosa, em carrapatos vetores procedentes de áreas de transmissão e predisposta, e se sim, quais fatores poderiam contribuir para tal achado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LOCAIS DE COLETA

O estudo foi realizado em dois municípios do estado de São Paulo, ambos com presença do hospedeiro vertebrado e do vetor. A região de Campinas é considerada como endêmica para a FMB (ANGERAMI et al., 2012; NASSER et al., 2015), já o município de Mogi Mirim é considerado como área não endêmica. O projeto foi cadastrado e autorizado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO, número 63427-1 e pelo Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN), cadastro n° A2E32FC.

O município de Campinas está localizado no interior de São Paulo, sudeste do Brasil. A cidade tem uma altitude de 680 metros acima do nível do mar e uma área de 796.400 km², contendo biomas do Cerrado e Mata Atlântica (PREFEITURA DE CAMPINAS, 2016). A estimativa populacional é de 1.082.429 habitantes (1.359,60 hab/km²) (IBGE, 2017a).

Segundo a classificação climática de Koeppen, Campinas corresponde ao tipo Cwa, caracterizado pelo clima tropical de altitude, com verão quente e úmido e inverno ameno e quase seco. A precipitação média anual é de 1.380 mm, 75% dela distribuída ao longo do semestre outubro/março. A média anual da temperatura é de 22°C e a umidade relativa do ar (UR) é de 72,1% (SANASA, 2014; CEPAGRI, 2018).

Campinas está localizada na Unidade Hidrográfica de Gerenciamento de Recursos Hídricos UGRHI 05–Piracicaba/Capivari/Jundiaí, sendo atravessada pelos rios Jaguari, Atibaia, Ribeirão Quilombo e Capivari (Figura 1) (SANASA, 2014).



Figura 1. Bacia hidrográfica dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá, onde está localizado o município de Campinas (Fonte: SANASA, 2014).

O município de Mogi Mirim está localizado mais a leste do estado de São Paulo. A cidade tem uma altitude de 640 metros acima do nível do mar e uma área de 497.708 km², contendo biomas do Cerrado e Mata Atlântica. A estimativa populacional é de 92.365 habitantes (173,77 hab/km²) (IBGE, 2017b). Com clima tropical de altitude (Cwa), Mogi Mirim possui temperatura variando entre 15°C e 27,8°C durante o ano, com precipitação anual de 1.353,2 mm (CEPAGRI, 2018).

Mogi Mirim pertence à Unidade Hidrográfica de Gerenciamento de Recursos Hídricos UGRHI 9 – Mogi Guaçu, composta pela bacia do rio Mogi Guaçu e seus afluentes (SAAE, 2014).



Figura 2. Localização da UGRHI 9 e do município de Mogi Mirim, pertencente à bacia do Rio Mogi Guaçu (Fonte: SAAE, 2014).

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, superado apenas pela Amazônia, ocupando uma área de 2.036.448 km², cerca de 22% do território brasileiro. Possui área de transição com outros biomas brasileiros: Amazônia, Caatinga, Pantanal e Mata Atlântica, apresentando alta biodiversidade (MMA, 2016a).

A Mata Atlântica é formada por conjunto de formações florestais e ecossistemas associados, como as restingas, manguezais e campos de altitude. Antigamente, a mata ocupava aproximadamente 1.300.000 km², porém, atualmente, as remanescentes de vegetação nativa foram reduzidas a cerca de 22% de sua cobertura original e encontram-se em diferentes estágios de regeneração. Apenas cerca de 7% estão bem conservados em fragmentos acima de 100 hectares (MMA, 2016b).

3.2 ABUNDÂNCIA E SAZONALIDADE DE CARRAPATOS VETORES

3.2.1 ABUNDÂNCIA E MÉTODOS DE COLETA

Para verificar a abundância dos carrapatos, realizaram-se coletas mensais desde janeiro de 2015 até dezembro de 2016, em locais com presença de capivaras. Duas áreas foram delimitadas para a realização das coletas, sendo uma área de transmissão e uma área predisposta para a FMB, ambas em área urbana.

O Parque Ecológico Professor Hermógenes de Freitas Leitão Filho (22°48'44"S 47°04'19"O), Campinas, SP (Figura 3), está localizado em área de transmissão, e as coletas foram realizadas no mesmo local durante os dois anos. No município de Mogi Mirim, SP as coletas foram realizadas de janeiro a junho de 2015 na Avenida Professor Adib Chaib, margens do Rio Mogi Mirim (22°25'37"S 46°57'04"O) e de julho de 2015 a dezembro de 2016 no Lago do Complexo Lavapés (22°26'43"S 46°58'00"O) (Figura 4), ambos locais situados em área predisposta. A decisão da mudança do local de coleta ocorreu devido à migração das capivaras para o Lago Lavapés. Os métodos utilizados para coleta dos carrapatos foram: armadilha de gelo seco e técnica de arrasto.



Figura 3. Pegadas de capivara no Parque Ecológico Hermógenes de Freitas Leitão Filho, em Campinas, SP.



Figura 4. Área ocupada por capivaras no Lago do Complexo Lavapés, em Mogi Mirim, SP.

Para a coleta de carrapatos através da armadilha atrativa de gelo seco, utiliza-se o dióxido de carbono (CO_2), que funciona como um eficiente atrativo químico para algumas espécies de carrapatos. Esse tipo de armadilha é eficaz para a coleta de carrapatos adultos, moderadamente para o estágio de ninfas e pouco eficaz para as larvas, e podem atrair e capturar carrapatos adultos num raio de até 10 m (SUCEN, 2004).

As armadilhas de gelo seco foram colocadas em quatro pontos próximos uns dos outros, sendo chamados de ponto 1, ponto 2, ponto 3 e ponto 4. Os pontos foram dispostos em linha reta, margeando o corpo d'água. A distância entre os pontos de coleta foi de 15,0 m em Campinas e Mogi Mirim. Aproximadamente 800 gramas de cubos de gelo seco foram colocados em cada ponto de coleta, dispostas em bandeja branca enterrada na altura da superfície do solo (Figura 5). O tempo de permanência das armadilhas nos pontos foi de uma hora, sendo que durante este período os carrapatos que subiam na borda da bandeja eram coletados periodicamente (coleta manual) e armazenados em pote coletor.



Figura 5. Armadilha atrativa de gelo seco durante coleta.

Já para a técnica de arrasto, o método consiste na utilização de uma flanela branca com dimensões de 1 m de comprimento por 1 m de largura, com uma haste de madeira em uma das pontas (Figura 6). Esta técnica é indicada tanto para locais com vegetação do tipo herbácea (gramíneas, leguminosas e outras forrageiras), como para áreas de confinamento de animais (pastos) ou peridomicílio. Deve-se percorrer toda a extensão da área, entre 2 pontos pré-determinados, andando lentamente e parando a cada 4 a 5 metros para verificação e coleta de indivíduos capturados sobre a face da flanela, que é arrastada em contato com a vegetação.

A técnica é satisfatória para a coleta de estágios imaturos (larvas e ninfas), e menos eficiente para adultos (SUCEN, 2004).

O arrasto foi feito entre os pontos 1 e 2 (distância de 15,0 m entre os pontos em Campinas e em Mogi Mirim) e entre os pontos 3 e 4 (distância de 15,0 m entre os pontos em Campinas e Mogi Mirim), sendo percorrida a distância entre os pontos apenas uma vez (Figura 7). A distância entre os pontos 2 e 3 foi de 15,0 m para Campinas e Mogi Mirim, porém, não foi realizado arrasto entre estes pontos.



Figura 6. Coleta de estágios imaturos usando técnica de arrasto (Mogi Mirim, SP).



Figura 7. Área de arrasto entre os pontos 1 e 2 (A) e entre os pontos 3 e 4 (B), ambos em Campinas, SP; área de arrasto entre os pontos 1 e 2 (C) e entre os pontos 3 e 4 (D), ambos em Mogi Mirim, SP.

3.2.2 IDENTIFICAÇÃO DOS CARRAPATOS

Os carrapatos coletados foram mantidos em tubos plásticos do tipo Eppendorf (capacidade de 1,5mL), com álcool etílico a 99,3% em -20°C, sendo etiquetados de acordo com o local de procedência, data e método de coleta. A identificação foi realizada em laboratório, com o auxílio de uma lupa e chave de identificação para adultos (GUIMARÃES et al., 2001) e ninfas (MARTINS et al., 2010). As larvas foram identificadas até gênero, de acordo com o formato do capítulo (gnatossoma) (GUIMARÃES et al., 2001).

3.3 DADOS METEOROLÓGICOS

Foram coletados dados meteorológicos relativos à temperatura em °C (mínima, média e máxima), UR (%) e precipitação pluviométrica (em mm) dos dois municípios de estudo, a fim de verificar se existe correlação com a abundância de carrapatos.

Os dados meteorológicos do município de Campinas foram obtidos do Centro Integrado de Informações Agrometeorológicas (CIIAGRO), durante o período de janeiro de 2015 a dezembro de 2016.

No município de Mogi Mirim, os dados referentes aos meses de janeiro a maio de 2015, foram adquiridos no Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) (estação meteorológica localizada no município de Itapira). E, no período de junho de 2015 a dezembro de 2016, os dados foram obtidos do CIIAGRO. Os dados de 2015 fornecidos pelo CIIAGRO iniciavam no mês de junho, por isso, foi utilizado informações da estação mais próxima, do INMET.

3.4 ANÁLISES DOS DADOS

A abundância (variável resposta – $\text{Log}(N + 1)$), frente aos parâmetros ano, mês, local de coleta, método de coleta, estágio de vida do carrapato e espécie, foi avaliada por ANOVA de 1 fator, considerando a homogeneidade dos valores da abundância como hipótese nula. As médias foram comparadas através do teste a posteriori de Tukey. O nível de significância foi de $\alpha = 0,05$.

Para avaliar se houve correlação entre a abundância nos diferentes anos de coleta com os fatores ambientais (temperatura, umidade relativa do ar e precipitação) foi calculado o Coeficiente de Correlação de Pearson. O nível de significância foi de $\alpha = 0,05$.

Todas as análises estatísticas foram feitas com auxílio do software SAS através dos procedimentos PROC GLM e PROC CORR, respectivamente (SAS INST. INC., 2006).

3.5 INVESTIGAÇÃO MOLECULAR

Para verificar a presença ou ausência de *Rickettsia*, FMB ou GFM, nos carrapatos coletados nos dois municípios de estudo, foram feitos os procedimentos de extração total e subsequente amplificação do DNA. Todas as análises moleculares foram conduzidas no Laboratório de Entomologia Integrativa do Departamento de Biologia Animal, IB, UNICAMP.

3.5.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Como a prevalência de *Rickettsia* sp. nos carrapatos geralmente é baixa (ESTRADA et al., 2006), optou-se por processar as amostras em lotes de 10 indivíduos, no máximo, separados por local de procedência, mês de coleta, estágio evolutivo e espécie.

Carrapatos pertencentes ao mesmo lote foram macerados inteiros até a homogeneização dentro de um microtubo de 1,5 mL, em solução tampão fosfato-salina (PBS), com o auxílio de um pistilo motorizado. A extração do DNA total foi feita usando-se kit comercial – DNease® Blood & Tissue, Qiagen – seguindo o protocolo sugerido pelo fabricante. Ao final do processo, o pellet foi ressuspendido em solução 1xTE, e os tubos armazenados em freezer a -20°C .

3.5.2 AMPLIFICAÇÃO DO DNA PELA PCR

Para amplificação do material genético utilizaram-se pares de primers: (i) HCO e LCO da região citocromo oxidase I (COI) do DNA mitocondrial (DNAm_t) (FOLMER et al., 1994), visando avaliar a integridade do DNA dos carrapatos; (ii) CS-78F e CS-323R do gene *gltA*, codificador da enzima citrato sintase, presente em todas as espécies de *Rickettsia* (LABRUNA et al., 2004); e (iii) 190.70F-A1 e 190.602R-A2, que amplifica parte da

sequência do gene *sca0* e codifica a proteína de membrana (*ompA*), presente em *Rickettsia* do GFM (REGNERY et al., 1991). Como controles positivos das reações foram usados para: COI, DNA extraído de *Tenebrio molitor* (Coleoptera: Tenebrionidae); e para os genes *gltA* e *ompA* o DNA de *Rickettsia parkeri*, gentilmente cedido pelo Dr. Adriano Pinter da Superintendência do Controle de Endemias, SP.

As reações de amplificação foram feitas num volume final de 25µl contendo 10x tampão de PCR, 0,2mM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, 0,5µM de cada iniciador, 1,25 unidades de Taq DNA polymerase (Invitrogen) e 2–4µl de DNA extraído.

Para a região COI, os ciclos de temperatura incluíram um passo inicial de desnaturação de 3 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 1 min a 95°C, um passo de anelamento de 1 min a 47°C e um passo de extensão de 2 min a 72°C. O último ciclo incluiu um passo de alongação de 5 min a 72°C (MADEIRA et al., 2016). Para *gltA*, os ciclos de temperatura foram de desnaturação de 3 min a 95°C seguido por 40 ciclos de 15 s a 95°C, um passo de anelamento de 30 s a 48°C, um passo de extensão de 30 s a 72°C e passo final de alongação de 7 min a 72°C (LABRUNA et al., 2004). Para *ompA*, os ciclos de temperatura foram de desnaturação de 5 min a 95°C seguido por 35 ciclos de 20 s a 95°C, um passo de anelamento de 30 s a 58°C, um passo de extensão de 45 s a 65°C e passo final de alongação de 10 min a 72°C (adaptado de REGNERY et al., 1991).

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% (Sigma, USA) em tampão 1 x TAE (40mM Tris-acetato e 1mM EDTA, pH 8.0) a 80V, após aplicação do agente intercalante GelRed™ que permite visualizar os fragmentos amplificados sob luz ultravioleta. Registros fotográficos dos resultados foram feitos com câmera digital acoplada a um transluminador UVB. O tamanho dos fragmentos amplificados foi estimado por comparação com marcadores padrão de peso molecular, Low DNA Ladder e 100 pb (Invitrogen).

Os amplicons satisfatórios foram armazenados em freezer a -20°C.

4. RESULTADOS

4.1 ABUNDÂNCIA E SAZONALIDADE DE CARRAPATOS VETORES

Foram coletadas e identificadas as seguintes espécies: *A. sculptum* (ninfas e adultos), *A. dubitatum* (ninfas e adultos), *Amblyomma* sp. (larvas) e *Rhipicephalus* sp. (larvas), durante o período de estudo.

Considerando o período de dois anos em que foram coletados os carrapatos, a abundância total não foi significativamente diferente entre Campinas (N= 2.312) e Mogi Mirim (N= 546) (F= 2,94; p= 0,0878). O mesmo resultado fora observado considerando separadamente os anos de 2015 (F= 3,45; p= 0,0653) e 2016 (F= 0,21; p= 0,6473). Já a composição faunística de carrapatos vetores foi distinta (Tabela 1).

A abundância total de carrapatos coletados em Campinas e Mogi Mirim no ano de 2015 foi significativamente maior que em 2016 (F= 19,30; p< 0,0001) (Tabela 1).

O número de carrapatos diferiu nos meses de janeiro, fevereiro e agosto nos dois anos de coleta, quando comparado com os outros meses (F= 2,02; p= 0,0274), independentemente da localidade. No ano de 2015, não houve diferença na abundância de carrapatos entre os meses (F= 0,96; p= 0,4859) (Tabela 2). Já em 2016, o mês de agosto apresentou diferença em relação aos outros meses (F= 2,93; p= 0,0033) (Tabela 2).

Na armadilha de gelo seco, foram coletados 1.519 e 263 carrapatos em Campinas e Mogi Mirim, respectivamente (Tabela 3). Na técnica de arrasto foram coletados 793 carrapatos em Campinas e 283 no município de Mogi Mirim (Tabela 3). Os métodos de coletas não apresentaram diferença quanto à quantidade de carrapatos coletados durante os dois anos (F= 0,37; p= 0,5441), assim como para os anos de 2015 (F= 0,06; p= 0,8055) e 2016 (F= 0,69; p= 0,4088) separadamente.

A abundância entre *A. sculptum* e *A. dubitatum* diferiu em Campinas e Mogi Mirim (F= 17,48; p< 0,0001) (Tabela 1), assim como quando observado o ano de 2015 (F= 12,93; p< 0,0001) e 2016 (F= 7,45; p= 0,0010).

Estágios de vida dos carrapatos apresentaram diferença na abundância entre larva/adulto e entre ninfa/adulto no período de dois anos, nas duas localidades

(F= 31,85; $p < 0,0001$), assim como quando comparados os anos de 2015 (F= 19,79; $p < 0,0001$) e 2016 (F= 9,83; $p = 0,0023$) separadamente (Tabela 4).

Tabela 1. Abundância (N) de carrapatos por localidade, ano, espécie e estágio de vida, coletados entre janeiro de 2015 a dezembro de 2016.

Ano	Localidade	N	<i>Amblyomma</i> sp.	<i>Rhipicephalus</i> sp.	<i>Amblyomma sculptum</i>		<i>Amblyomma dubitatum</i>	
			Larva	Larva	Ninfa	Adulto	Ninfa	Adulto
2015	Campinas	1754	394	0	977	335	22	26
	Mogi Mirim	431	192	10	97	63	49	20
2016	Campinas	558	48	0	390	85	23	12
	Mogi Mirim	115	69	0	4	0	30	12
Totais		2858	703	10	1468	483	124	70

Tabela 2. Abundância mensal de carrapatos por localidade, ano, espécie e estágio de vida, coletados de janeiro de 2015 a dezembro de 2016.

Ano	Mês	Campinas					Mogi Mirim					
		Larva		Ninfa		Adulto	Larva		Ninfa		Adulto	
		<i>Amblyomma</i> sp.	<i>A. sculptum</i>	<i>A. dubitatum</i>	<i>A. sculptum</i>	<i>A. dubitatum</i>	<i>Amblyomma</i> sp.	<i>Rhipicephalus</i> sp.	<i>A. sculptum</i>	<i>A. dubitatum</i>	<i>A. sculptum</i>	<i>A. dubitatum</i>
2015	Janeiro	0	0	0	33	2	29	0	0	2	24	3
	Fevereiro	0	1	2	48	4	12	0	0	1	14	1
	Março	0	0	0	36	2	38	0	1	2	13	1
	Abril	1	39	1	59	0	20	0	0	3	8	0
	Maiο	157	28	5	17	0	0	0	0	6	4	0
	Junho	109	22	0	6	0	52	0	4	2	0	0
	Julho	2	155	7	10	0	0	0	0	3	0	3
	Agosto	2	249	0	8	0	21	10	76	0	0	0
	Setembro	0	273	0	14	1	0	0	14	0	0	0
	Outubro	16	123	3	42	10	0	0	0	0	0	0
	Novembro	39	55	2	38	4	14	0	1	16	0	9
	Dezembro	68	32	2	24	3	6	0	1	14	0	3
2016	Janeiro	0	1	0	21	2	0	0	0	2	0	2
	Fevereiro	3	2	2	9	1	0	0	0	3	0	4
	Março	1	1	0	9	0	5	0	0	1	0	0
	Abril	1	6	3	5	0	0	0	0	0	0	0
	Maiο	2	12	5	3	0	3	0	2	12	0	0
	Junho	0	1	0	1	0	0	0	0	4	0	1
	Julho	4	42	5	0	0	0	0	0	3	0	0
	Agosto	0	128	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Setembro	12	109	1	3	1	0	0	2	1	0	3
	Outubro	25	65	2	8	2	55	0	0	2	0	0
	Novembro	0	23	3	8	3	6	0	0	0	0	2
	Dezembro	0	0	2	18	3	0	0	0	2	0	0
Totais		442	1367	45	420	38	261	10	101	79	63	32

Tabela 3. Abundância de carrapatos, por estágio, coletados por localidade, de acordo com o método de coleta (gelo seco e arrasto), entre janeiro de 2015 a dezembro de 2016.

Espécies coletadas	Campinas		Mogi Mirim	
	Gelo seco	Arrasto	Gelo seco	Arrasto
Adulto <i>Amblyomma sculptum</i>	374	46	50	13
Adulto <i>Amblyomma dubitatum</i>	35	3	32	0
Ninfa <i>Amblyomma sculptum</i>	1032	335	87	14
Ninfa <i>Amblyomma dubitatum</i>	35	10	46	33
Larva <i>Amblyomma</i> sp.	43	399	39	222
Larva <i>Rhipicephalus</i> sp.	0	0	9	1
Totais	1519	793	263	283

Tabela 4. Abundância de carrapatos coletados de acordo com o estágio evolutivo e local de coleta, no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2016.

Local de coleta	Larva	Ninfa	Adulto	Total
Campinas	442	1412	458	2312
Mogi Mirim	271	180	95	546

4.2 DADOS METEOROLÓGICOS

Os dados climáticos mensais relativos à temperatura em °C (Figura 8), umidade relativa do ar (%) e precipitação pluviométrica (mm) (Figura 9) para o município de Campinas e de Mogi Mirim mostraram que houve variação ao longo dos anos de estudo.

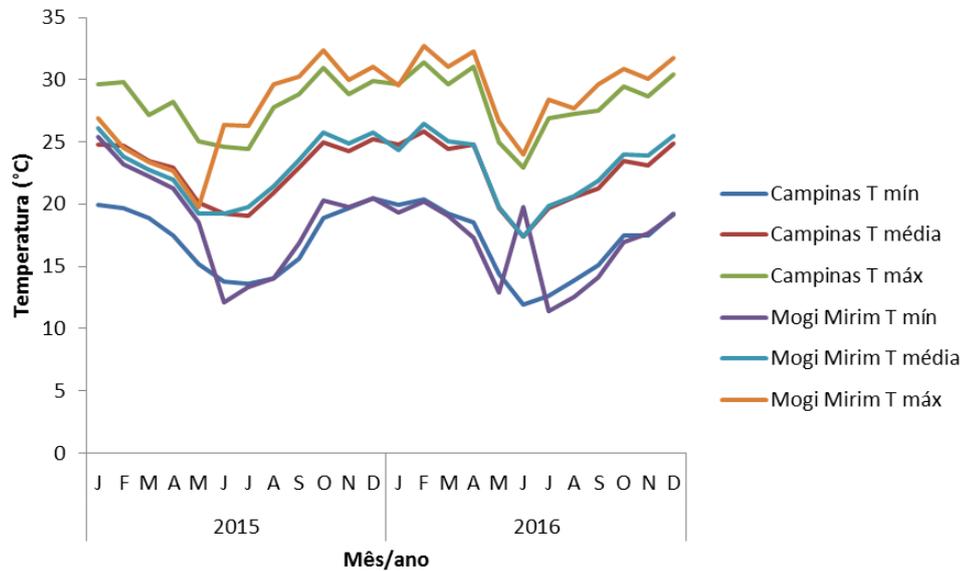


Figura 8. Temperatura máxima, média e mínima, durante o período de janeiro de 2015 a dezembro de 2016, no município de Campinas, SP e Mogi Mirim, SP.

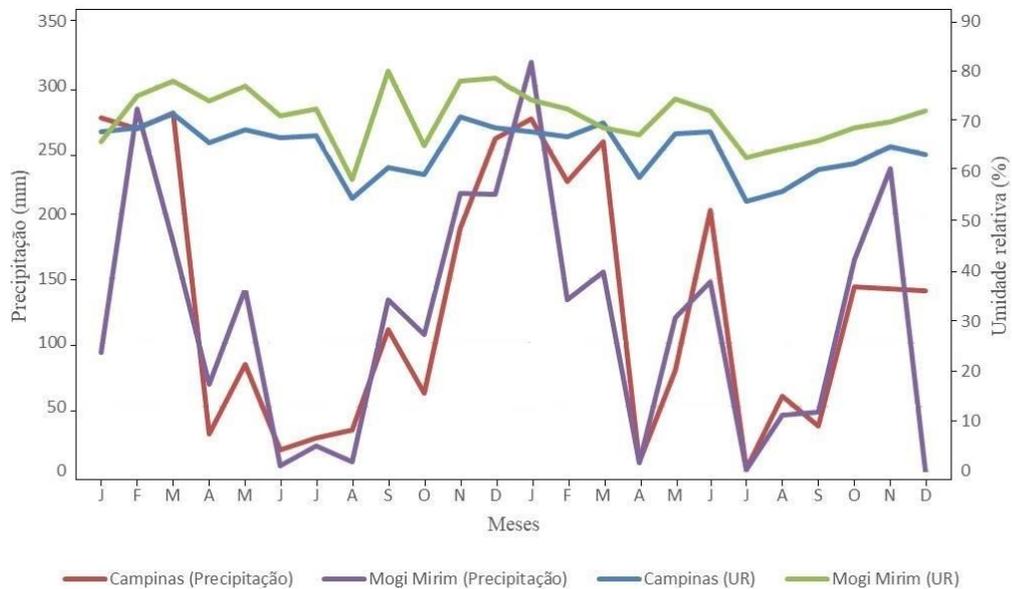


Figura 9. Umidade relativa do ar (%) e precipitação (mm), no município de Campinas, SP e Mogi Mirim, SP, no período de janeiro de 2015 a dezembro de 2016.

A abundância dos carrapatos apresentou correlação positiva pela temperatura ($r= 0,28951$; $p< 0,0001$) e pela umidade relativa ($r= 0,29913$; $p< 0,0001$), quando analisado os dois anos de estudo (2015/2016). No entanto, não houve correlação entre a abundância dos carrapatos e a precipitação pluviométrica ($r= 0,04109$; $p= 0,5352$).

Analisando-se os dois anos de coleta separadamente, verificou-se que em 2015 houve correlação positiva entre a temperatura e a abundância de carrapatos ($r= 0,16584$; $p= 0,0447$), assim como no ano de 2016 ($r= 0,57948$; $p< 0,0001$). Quanto à umidade relativa, houve correlação positiva com a abundância dos carrapatos nos anos de 2015 ($r= 0,18673$; $p= 0,0235$) e 2016 ($r= 0,57714$; $p< 0,0001$). E, não houve correlação entre a precipitação e a abundância dos carrapatos tanto em 2015 ($r= 0,01182$; $p= 0,8922$) quanto em 2016 ($r= 0,11238$; $p= 0,2757$).

4.3 INVESTIGAÇÃO MOLECULAR

Um total de 173 carrapatos, entre ninfas (N= 84) e adultos (N= 79) de *A. sculptum* e adultos de *A. dubitatum* (N= 10), provenientes de populações de Campinas e Mogi Mirim, foram analisados. Amplificou-se com sucesso o DNA de carrapatos e da bactéria *Rickettsia parkeri*. Não houve amplificação de quaisquer outras *Rickettsia*, incluindo as pertencentes ao GFM.

5. DISCUSSÃO

A compreensão dos fatores que determinam se uma área é ou não endêmica para a Febre Maculosa Brasileira é dada através de estudos, como a identificação das Rickettsioses presentes no local, fatores ambientais, vetores e hospedeiros. Os dados obtidos no presente trabalho mostram que um ambiente pode ter a presença do hospedeiro, assim como do vetor, e ainda assim não apresentar a bactéria patogênica circulando ou ainda não a encontrar através de análises moleculares.

5.1 ABUNDÂNCIA E SAZONALIDADE DE CARRAPATOS VETORES

Os carrapatos podem ser encontrados em áreas antropizadas, como foi observado na área endêmica e não endêmica para a FMB. A quantidade de carrapatos coletada nos dois municípios não apresentou diferença estatística, durante os dois anos de coleta ou quando analisados separadamente.

A abundância total dos carrapatos foi maior em 2015, quando comparado com o ano de 2016, o que pode ter ocorrido em decorrência das condições meteorológicas distintas encontradas em cada ano de estudo. Em estudo desenvolvido por Silveira e Fonseca (2013), a abundância dos carrapatos foi menor no primeiro ano de estudo e foi aumentando a cada ano, com total de quatro anos de estudo, porém os autores não avaliaram a correlação entre a abundância e condições meteorológicas. De acordo com Burgdorfer e Brinton (1988), fatores biológicos e ecológicos, assim como condições meteorológicas desfavoráveis, falta de acasalamento e incapacidade de encontrar hospedeiro adequado, limita o número de carrapatos na natureza.

A sazonalidade foi observada de maneira evidente durante os anos de estudo. Independentemente da localidade, o mês de agosto foi o que apresentou o maior número de ninfas (inverno); em contrapartida, nos meses de janeiro e fevereiro (verão) foi encontrado maior quantidade de adultos. No ano de 2015, não houve diferença na abundância dos carrapatos nas duas áreas de coleta. Já no ano de 2016, no município de Campinas, o mês de agosto apresentou maior número de ninfas quando comparado aos outros meses. A espécie

Amblyomma sculptum apresenta padrão anual de uma geração na região sudeste do Brasil, com os três estágios marcadamente distribuídos ao longo do ano, com larvas predominando no outono, ninfas no inverno e adultos na primavera e verão (PEREZ, 2013).

Em estudo feito por Brites-Neto et al. (2013), em áreas de mata ciliar no município de Americana, SP, a distribuição de *A. sculptum* e *A. dubitatum* foi caracterizada pela presença de imaturos e adultos durante todos os meses do período estudado. Foi observado pelos autores que os estágios imaturos de *A. sculptum* e *A. dubitatum* apresentaram distribuição similar durante o período de estudo, com larvas de ambas as espécies sendo mais abundantes no outono e no inverno (abril a julho) e ninfas no final do outono até início da primavera (junho a outubro). Adultos de *A. sculptum* foram coletados em maior número durante a primavera e início do verão (outubro e dezembro). A espécie *A. dubitatum* foi coletada em número relativamente similar ao longo do período de estudo. Portanto, os resultados observados pelos autores sugerem que a dinâmica sazonal de *A. dubitatum* seja semelhante aos de *A. sculptum*, no sudeste brasileiro.

Guedes e Leite (2008), em estudo feito no município Coronel Pacheco, MG, verificaram a existência de picos populacionais dos estágios imaturos de *Amblyomma* sp. no outono e inverno, quando as temperaturas e UR estavam mais baixas. Souza et al. (2006) relataram que ninfas de *Amblyomma* ocorreram o ano todo em área de mata ciliar de uma fazenda localizada em Jaguariúna, SP, com maior abundância de julho a dezembro, período que coincide com o aumento de casos de FMB na região de Jaguariúna e em outras áreas endêmicas de São Paulo e Minas Gerais.

As seguintes espécies foram identificadas, no presente estudo, utilizando-se ambos os métodos de coleta: ninfas e adultos de *A. sculptum* e *A. dubitatum*, e larvas de *Amblyomma* sp. e *Rhipicephalus* sp. No entanto, Guedes e Leite (2008), coletaram larvas de *Amblyomma* sp. com o método de arrasto, já as ninfas de *Amblyomma* sp. e adultos de *A. sculptum* e *A. dubitatum* foram coletados com armadilha de gelo seco.

A abundância dos carrapatos coletados não diferiu entre os métodos de coleta (armadilha de gelo seco e a técnica de arrasto), nos dois municípios de estudo. O mesmo foi observado por Silva (2010), que utilizou os dois métodos para avaliar qual apresentava maior eficiência na coleta de *A. sculptum*. Além disso, os dois métodos de coleta foram eficientes

para coletar todos os estágios de vida, corroborando o estudo de Souza et al. (2006). Portanto, as técnicas de coletas empregadas funcionam de forma complementar, pois ambas simulam um potencial hospedeiro para o carrapato e são eficientes para as espécies que procuram ativamente seus hospedeiros (*A. sculptum* e *A. dubitatum*).

Em Campinas coletaram-se ninfas e adultos de *A. sculptum* e *A. dubitatum*, além de larvas de *Amblyomma* sp., espécies já assinaladas na região por Estrada et al. (2006) e Souza et al. (2006). Em Mogi Mirim, além das espécies citadas acima, foi coletado pequeno número de larvas de *Rhipicephalus* sp., sendo este o primeiro registro para o gênero no município, assim como para as outras espécies coletadas. Os dados apresentados corroboram estudos anteriores, associando a presença de capivaras aos carrapatos *A. sculptum* e *A. dubitatum* no sudeste do Brasil, tanto em áreas endêmicas como não endêmicas para a FMB (PEREZ et al., 2008; PACHECO et al., 2009).

Campinas apresentou maior abundância de *A. sculptum* em relação à Mogi Mirim, já *A. dubitatum* foi mais abundante em Mogi Mirim. Em estudo realizado por Pacheco et al. (2009), em 16 áreas no estado de São Paulo, foram coletados um total de 3.545 indivíduos de *A. sculptum* e 2.666 de *A. dubitatum*. Em Piracicaba coletou-se 2.662 indivíduos de *A. sculptum* e 499 *A. dubitatum*, já em Pedreira foi coletado 555 exemplares de *A. sculptum* e 841 *A. dubitatum*. A diferença na abundância entre as espécies pode estar relacionada ao grau de atividade antrópica, sendo que áreas degradadas favorecem a presença de *A. sculptum* (SZABÓ et al., 2009).

Amblyomma dubitatum mantém seu ciclo principalmente em animais silvestres, por isso, são encontrados em ambientes que propiciem o desenvolvimento destes hospedeiros (PEREZ et al., 2008). É encontrado em maior número nas áreas próximas a corpos d'água, ambiente preferencial das capivaras e mais propício ao estabelecimento dessa espécie (QUEIROGAS et al., 2012). Silveira e Fonseca (2013), a partir de coletas em cinco áreas no Rio de Janeiro, avaliaram a abundância de *A. dubitatum* e *A. sculptum*. A espécie *Amblyomma dubitatum* foi coletada em pequeno número, em borda de fragmento de vegetação, com atividade intensa de capivaras. A ausência de *A. dubitatum* foi observada em local com cobertura vegetal constituída principalmente de gramíneas de porte baixo, onde se registrou a presença constante de capivaras. Neste mesmo local, *A. sculptum* foi coletado em pequeno

número, mesmo em pontos próximos a locais frequentados por capivaras. Por isso, a ocorrência de *A. dubitatum* pode estar relacionada a ambiente com cobertura vegetal, que mantêm maiores níveis de umidade.

No presente estudo, em ambos os locais de coleta, foi observada a presença de capivaras, que foram relacionadas à presença de *A. sculptum* e *A. dubitatum*, corroborando o estudo de Perez et al. (2008), que encontraram altos níveis de infestação de ambas as espécies associadas à esse hospedeiro.

Larvas de *Rhipicephalus* sp. estão intimamente ligadas à presença de cães (SUCEN, 2002), e exemplares deste gênero foram encontrados apenas no município de Mogi Mirim, onde a área de coleta é constantemente frequentada por cachorros. Já na área de coleta em Campinas, onde é proibida a entrada de cachorros, nenhum indivíduo deste gênero foi coletado.

Com relação à abundância dos carrapatos, de acordo com o estágio evolutivo (larvas, ninfas e adultos), o estágio larva diferiu em quantidade quando comparado ao adulto, assim como ninfa também apresentou diferença em relação ao adulto, nos dois anos de coleta. O mesmo foi observado para o ano de 2015 e 2016 separadamente. Em estudo realizado no Rio de Janeiro por Silveira e Fonseca (2013), em um período de quatro anos, foi analisada a abundância dos estágios de vida de *Amblyomma* sp., e verificou-se que as larvas de *Amblyomma* sp. foram expressivamente mais abundantes em todos os anos do estudo, seguidas das ninfas e dos adultos de *A. sculptum*.

A maior abundância de larvas de carrapatos pode ser atribuída à presença de determinados hospedeiros. Um fator que pode alterar a abundância de espécies de carrapatos é a presença ou ausência de animais silvestres, em ambientes utilizados por animais domésticos (SILVEIRA e FONSECA, 2013). Como foi observado por Kessing et al. (2013), no qual a abundância de ninfas e adultos de *Rhipicephalus* sp. foi expressivamente reduzida devido à presença de bovinos. Porém, a abundância de larvas não sofreu interferência, pois foi determinada pela presença de mamíferos de grande porte, provavelmente responsáveis pela importação de fêmeas ingurgitadas para a área de estudo (savana do Quênia), enquanto que em áreas onde estes mamíferos eram ausentes, as larvas e ninfas foram raras.

Conforme observado, as ninfas foram coletadas em grande quantidade em ambas as localidades de estudo, o que deve exigir atenção, já que podem transmitir FMB aos humanos. Segundo Araújo et al. (2015), o período de maior ocorrência de óbitos causados pela FMB, corresponde à primavera e início de verão, período de maior circulação das fases de larvas e ninfas dos carrapatos.

5.2 DADOS METEOROLÓGICOS

Compreender o nicho ecológico de um carrapato é um exercício complexo, devido às muitas variáveis que ocorrem nas diferentes fases do ciclo evolutivo, incluindo a regulação dos padrões dos carrapatos e abundância de hospedeiros. Além disso, a faixa de distribuição geográfica de uma população de carrapatos muda, devido ao clima ou como resultado de atividades humanas (incluindo influências antropogênicas sobre a vegetação, uso do solo ou deslocamento do hospedeiro) (ESTRADA-PEÑA, 2008; EREMEEVA e DASCH, 2015).

No presente estudo, a abundância dos carrapatos foi influenciada pela temperatura e pela umidade relativa do ar, considerando tanto os dois anos de estudo, quanto separadamente. Em estudo realizado por Chacon et al. (2003), em condições experimentais, foi demonstrado que a temperatura de $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e $80 \pm 10\%$ de UR são condições apropriadas para os estágios de vida livre de *A. sculptum*. As larvas e ninfas sofrem mais com efeitos causados por altas temperaturas, do que por baixas temperaturas. As fêmeas dessa espécie também sofrem influência com o aumento da temperatura: fêmeas expostas a 32°C adquiriram menor peso corporal e menor capacidade de conversão de nutrientes em ovos do que fêmeas mantidas nas temperaturas 18 e 27°C .

Veríssimo (2013), em estudo com o carrapato *Boophilus microplus* Canestrini, 1887, observou que a fase fora do hospedeiro pode ser afetada por diversos fatores, sendo a temperatura do ambiente o principal. O aumento da temperatura acelera toda a fase de vida livre do parasita e, sob baixas temperaturas, todos os estágios de vida levam mais tempo para se completar.

De acordo com Strey et al. (1996), em condições ideais (23°C e 85% UR), 50% da mortalidade de carrapatos adultos de *A. sculptum* ocorre em 507,8 e 520 dias. Porém, em condições de baixa umidade (23°C e 35% UR), 50% da mortalidade ocorrem entre 36,7 e 39,3

dias. Baixa umidade relativa do ar e o aumento da temperatura no ambiente contribuem para a dessecação dos carrapatos (ESTRADA-PEÑA et al., 2012). Portanto, a UR é um fator muito importante para o ciclo de vida dos carrapatos, pois as fases de vida livre são prejudicadas pela baixa UR, principalmente no período de embriogênese. A UR mínima compatível com o sucesso da embriogênese seria de 70%, sendo 80% considerado ideal (VERÍSSIMO, 2013).

Durante o desenvolvimento do carrapato, um dos fatores que causam mortalidade é a perda de água, que é influenciada pelo aumento da temperatura e pelas propriedades físicas da cutícula dos artrópodes. Desse modo, durante períodos não parasitários, as condições meteorológicas afetam a sobrevivência do carrapato, principalmente porque a temperatura e precipitação inibem a sobrevivência dos carrapatos e a busca por hospedeiros. Quando buscam novos hospedeiros, os carrapatos sofrem mortalidade constante na natureza, sendo observado que quanto maior a temperatura, também é maior a mortalidade dos carrapatos e quanto menor a temperatura, maior a duração do ciclo de desenvolvimento (ESTRADA-PEÑA et al., 2012).

Condições meteorológicas também influenciam especificamente a duração do período de pré-muda de carrapatos ingurgitados, de modo que o tempo é reduzido quando a temperatura aumenta. Conforme verificado com ixodídeos, carrapatos vulneráveis à dessecação possuem chance de sobrevivência aumentada quanto menor for o tempo para sofrer ecdise (CHILTON et al., 2000). Portanto, a temperatura e UR adequadas são condições importantes para os carrapatos completarem seu ciclo (ARAÚJO et al. 2015).

O aumento de 0,74°C na temperatura global, observado nos últimos 100 anos, resultou na redução dos números de dias mais frios, diminuindo o período de inverno, alternando com períodos de temperaturas mais amenas. Tais mudanças podem impactar diretamente a sobrevivência e desenvolvimento de vetores artrópodes. Na Europa, o impacto das mudanças climáticas é mais pronunciado entre carrapatos e seus hospedeiros. Um exemplo é a espécie *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806 que era endêmica das regiões Mediterrâneas, mas agora podem sobreviver e se desenvolver no sudeste e sudoeste da França (BEUGNET e CHALVET-MONFRAY, 2013).

Apesar de estudos relatarem expansões na distribuição de carrapatos, estes artrópodes também devem desaparecer de alguns lugares quando condições climáticas

(temperatura e UR) tornarem-se inadequadas (LÉGER et al., 2013), pois temperaturas elevadas, juntamente com baixa UR podem ser deletérias para carrapatos, mesmo para aqueles que são fisiologicamente adaptados à ambientes mais secos. Com isso, a distribuição e a densidade de carrapatos podem ser influenciadas pelas mudanças climáticas, bem como o risco de transmissão de patógenos transmitida por carrapatos para humanos (DANTAS-TORRES, 2015). Portanto, o aquecimento climático interfere nas populações de carrapatos, pois limita o seu desenvolvimento e aumenta a mortalidade nas diferentes fases de vida (ESTRADA-PEÑA, 2008).

5.3 INVESTIGAÇÃO MOLECULAR

As amostras analisadas através de PCR não tiveram confirmação de *Rickettsia* para nenhuma espécie de carrapato, independentemente do estágio evolutivo ou da localidade, embora exemplares positivos de *Amblyomma* spp. para *Rickettsia* do GFM já tenham sido registrados na região de Campinas (NASCIMENTO, 2003). O município de Mogi Mirim, área não endêmica para a FMB, apresenta apenas um caso registrado da doença no ano de 2016 (CVE, 2017), sem registro de carrapatos infectados com *Rickettsia* sp.

Guedes et al. (2005), realizaram estudos em área endêmica para a FMB no estado de Minas Gerais, onde foi relatado 1,28% de *A. sculptum* infectados com *R. rickettsii*. No entanto, Sangioni et al. (2005), ao avaliarem a infecção por *Rickettsia* em *A. sculptum* em áreas endêmicas e não endêmicas para a FMB no estado de São Paulo, verificaram que áreas não endêmicas apresentaram resultado negativo para espécies de *Rickettsia*, tanto para carrapatos quanto para hospedeiros vertebrados e humanos. Nas áreas endêmicas, também não foi possível encontrar carrapatos infectados com a bactéria, mesmo existindo a comprovação da infecção por *R. rickettsii* em cavalos e cães por métodos sorológicos.

Brites-Neto et al. (2013), em estudo realizado no município de Americana, SP, área endêmica para a FMB, não encontraram nenhum carrapato infectado com *R. rickettsii*. Vianna et al. (2008), no município de Itabira, MG, área endêmica para a FMB, também não coletaram *A. sculptum* infectados com *Rickettsia*, embora equinos (100%), cachorros (81,3%) e seres humanos (8,2%) tenham apresentado resultados positivos em testes sorológicos.

Encontrar carrapatos infectados por *R. rickettsii*, mesmo em áreas endêmicas para a FM, pode ser difícil. Burgdorfer (1988), que realizou estudo na Carolina do Norte, EUA, região com alta incidência de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (também causada por *R. rickettsii*), encontrou apenas 1 de 2.123 carrapatos da espécie *Dermacentor variabilis* Stay, 1821 infectado.

De acordo com Krawczak et. al. (2014), poucos estudos conseguiram detectar *R. rickettsii* em *A. sculptum*, enquanto muitos outros não detectaram um único carrapato infectado em áreas endêmicas para a FMB, através de métodos moleculares, entre milhares de carrapatos coletados.

Os motivos para os resultados negativos são, possivelmente, a baixa taxa de infecção por *R. rickettsii* e *R. parkeri*, que são comumente relatadas em *A. sculptum*, *A. dubitatum* e *A. aureolatum* (LABRUNA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; PINTER e LABRUNA, 2006; HORTA et al., 2007; MARTINS et al., 2017), assim como o reduzido número de carrapatos avaliados.

Segundo Pinter et al. (2016), o PCR negativo em amostras de *A. aureolatum* não significa que *Rickettsia* sp. não circula em determinada área, pois a taxa de infectividade na população de carrapatos é muito baixa, em torno de 1%. A espécie *Amblyomma sculptum* não é eficiente em manter a infecção por *R. rickettsii*, e por esta razão, encontrar *A. sculptum* infectado com a bactéria é uma tarefa muito difícil (Soares et al., 2012; Krawczak et al., 2014). Ainda assim, *A. sculptum* assume papel importante como vetor de *R. rickettsii*, porque esta espécie é a mais comumente encontrada parasitando humanos no sudeste brasileiro (Krawczak et al., 2014).

Rickettsia rickettsii não é eficientemente mantida através da transmissão transovariana, uma vez que menos de 50% das fêmeas de *A. sculptum* infectadas passam o agente verticalmente, e quando passam menos de 50% da prole se infecta (KRAWCZAK et al., 2014). Quando um carrapato se infecta com uma espécie de *Rickettsia*, este se torna refratário a uma segunda infecção por outra espécie de *Rickettsia*. Portanto, a competição entre diferentes espécies de *Rickettsia* dentro do vetor, onde há primo-infecção por uma espécie, pode dificultar o estabelecimento de uma segunda (ESTRADA et al., 2006; PACHECO et al., 2009; BRITES-NETO, 2013).

Rickettsia rickettsii e outras espécies patogênicas causam efeitos deletérios (letalidade do hospedeiro) nos carrapatos, efeito que previne a contínua transmissão transovariana do agente patogênico, juntamente com as interações competitivas entre diferentes espécies de *Rickettsia* que habitam o microambiente do carrapato. Portanto, efeitos deletérios e interações competitivas podem influenciar a baixa prevalência de carrapatos infectados com *R. rickettsii* na natureza, e assim afetar sua manutenção enzoótica (PAROLA et al., 2005; CARMICHAEL e FUERST, 2010; OGRZEWALSKA et al., 2012; MARTINS, et al., 2017).

Já a espécie de *A. dubitatum*, apesar de ser comum em áreas endêmicas para a FMB, nunca foi encontrada infectada com *R. rickettsii* e, portanto, ainda não se conhece seu papel na epidemiologia da FMB. No entanto, várias populações dessa espécie já foram encontradas infectadas por *R. bellii*, inclusive em áreas endêmicas para a doença (GUEDES et al., 2011). *Rickettsia bellii*, cuja patogenicidade é desconhecida para seres humanos, tem sido relatada infectando inúmeras espécies de carrapatos no Brasil, com frequências variando de 0 a 100%, dependendo da espécie e população de carrapato (PACHECO et al., 2009).

No município de Americana, SP, *A. dubitatum* teve resultado positivo em PCR específico para *R. bellii*, com taxa de infecção de 3,9% em carrapatos adultos (Brites-Neto et al., 2013). Em trabalho realizado por Pacheco et al. (2009), as taxas de infecção por *R. bellii* variaram de 6,1 a 44,9% em *A. dubitatum*. Já Guedes et al. (2011) não detectaram *Rickettsia* em adultos de *A. dubitatum* em Minas Gerais.

A presença de uma espécie de *Rickettsia* do GFM (designada como cepa Anhanduí, correspondente a *R. parkeri*) em *A. dubitatum* foi reportada no município de Campo Grande, MS. Portanto, *A. dubitatum* pode ser vetor de *Rickettsia*, através da co-infestação com *A. sculptum* em capivaras (MATIAS et al., 2015).

6. CONCLUSÕES

As espécies *A. sculptum* (considerado o principal vetor brasileiro) e *A. dubitatum* (importante na manutenção do ciclo da bactéria na natureza) estavam presentes nas duas áreas de coleta. Portanto, existe a possibilidade de transmissão da Febre Maculosa Brasileira em ambos os municípios, uma vez que os carrapatos coletados são importantes na epidemiologia da doença e a abundância de carrapatos coletados não diferiu entre os municípios de Campinas (área de transmissão) e Mogi Mirim (área predisposta).

A abundância dos carrapatos foi influenciada pela temperatura e umidade relativa do ar, durante o período estudado. Já que as condições meteorológicas afetam a sobrevivência de carrapatos durante períodos não parasitários, inibindo sua busca por hospedeiros. Além disso, o aumento da temperatura juntamente com a baixa umidade relativa do ar limita o desenvolvimento de carrapatos e, aumenta a mortalidade em todos os estágios evolutivos. Sendo assim, o clima de uma região pode interferir na abundância de carrapatos em determinado local e, conseqüentemente, na transmissão de doenças associados a eles.

Bactérias do gênero *Rickettsia*, mesmo em áreas endêmicas, têm prevalência baixa em carrapatos vetores e potencialmente vetores, como o observado neste estudo. Fatores como prevalência agregada devem ser investigados no futuro para entender os mecanismos que promovem a infecção de vertebrados.

Portanto, mais estudos serão necessários para melhor entendimento da epidemiologia e ecologia da Febre Maculosa Brasileira, onde poderá ser incluída análise sorológica de animais vertebrados amplificadores da bactéria, assim como investigação em outras espécies de carrapatos que possam estar envolvidos no ciclo natural de *Rickettsia* sp. Dessa forma, compreendendo melhor os fatores que levam uma região a ser endêmica e outras não.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A.T.S.; DAEMO, E.; FACCINI, J.L.H. 2001. Life cycle of female of *Amblyomma cooperi* Nuttal & Warburton, 1908 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 53(3). Versão online: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352001000300008.
- 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. 2012. Features of Brazilian spotted fever in two diferente endemic áreas in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 3:345-347.
- ARAÚJO, R.P.; NAVARRO, M.B.M.A.; CARDOSO, T.A.O. 2015. Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica. *Caderno de Saúde Coletiva*, 23(4):354-361.
- ARTHUR, R.D. 1961. Host preferences and the behavior of feeding and fed ticks, pp. 236-296. *In: Ticks and Disease*. Pergamon Press Ltd, New York, USA.
- BARBIERI, A.R.M.; FILHO, J.M.; NIERI-BASTOS, F.A.; SOUZA JR., J.C.; SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B. 2014. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 5:848-853.
- BEUGNET, F.; CHALVET-MONFRAY, K. 2013. Impact of climate change in the epidemiology of vector-borne diseases in domestic carnivores. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 36:559-566.
- BRITES-NETO, J. 2013. Importância do monitoramento epidemiológico de carrapatos em região endêmica para a Febre Maculosa Brasileira, pp. 18-32. *In: VERISSÍMO, C.J., Controle de carrapatos nas pastagens*. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa.

BRITES-NETO, J.; NIERI-BASTOS, F.A.; BRASIL, J.; DUARTE, K.M.R.; MARTINS, T.F.; VERÍSSIMO, C.J.; BARBIERI, A.R.M.; LABRUNA, M.B. 2013. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in an area endemic for Brazilian spotted fever. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 22(3):367-372.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L.P. 1988. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. *Annals New York Academy of Science*, 61-71.

BURGDORFER, W. 1988. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus, pp. 33-50. In: WALKER, D.H. *Biology of rickettsial diseases*. Vol. 1. Boca Raton (FL)/CRC Inc.

CHACON, S.C.; CORREIA, P.G.; BARBIERI, F.S.; DAEMON, E.; FACCINI, J.L.H. 2003. Efeito de três temperaturas constantes sobre a fase de vida não parasitária de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 12(1):13-20.

CARMICHAEL, J.R.; FUERST, P.A. 2010. Molecular detection of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montanensis*, and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* tick from nature. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, 10(2):111-115.

CEPAGRI – CENTRO DE PESQUISAS METEOROLÓGICAS E CLIMÁTICAS APLICADAS A AGRICULTURA. 2018. Clima dos Municípios Paulistas. Disponível em: <https://orion.cpa.unicamp.br/outras-informacoes/clima-dos-municipios-paulistas.html>. Acesso em 14 de março de 2018.

CVE – CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. 2017. Casos Confirmados Autóctones de FMB de residentes no estado de São Paulo segundo Município de Infecção e Ano de Início de Sintomas período de 2007 a 2017*. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/fmaculosa/fmb0717_lpi.pdf. Acesso em 22 de novembro de 2017.

CIIAGRO – CENTRO INTEGRADO DE INFORMAÇÕES AGROMETEOROLÓGICAS. 2017. Portal Agrometeorológico e Hidrológico do Estado de São Paulo. Disponível em: <http://www.ciiagro.org.br/diario/cperiodo>. Acesso em 20 de fevereiro de 2017.

CHILTON, N.B.; ANDREWS, R.H.; BULL, C.M. 2000. Influence of temperature and relative humidity on the moulting success of *Amblyomma limbatum* and *Aponomma hydrosauri* (Acari: Ixodidae) larvae and nymphs. *International Journal for Parasitology*, 30:973-979.

DANTAS-TORRES, F. 2015. Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 4:452-461.

EREMEEVA, M.E.; DASCH, G.A. 2015. Challenges posed by tick-borne rickettsiae: eco-epidemiology and public health implications. *Frontiers in Public Health*, 3(55):1-17.

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

ESTRADA-PEÑA, A. 2008. Climate, niche, ticks, and models: what they are and how we should interpret them. *Parasitology Research*, 103:S87-S95.

ESTRADA-PEÑA, A.; AYLLÓN, N.; de la FUENTE, J. 2012. Impact of climate trends on tick-borne pathogen transmission. *Frontier in Physiology*, 3:1-12.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5):294-299.

FORTES, F.S.; SILVEIRA, I.; MORAES-FILHO, J.; LEITE, R.V.; BONACIM, J.E.; BIONDO, A.W.; LABRUNA, M.B.; MOLENTO, M.B. 2010. Seroprevalence of *Rickettsia*

bellii and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 19 (4):222-227.

FREITAS, L.H.T.; FACCINI, J.L.H.; LABRUNA, M.B. 2009. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages. *Experimental and Applied Acarology*, 47:321-345.

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

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. 2016. Documento “Diretrizes técnicas para a vigilância e controle da Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo - classificação de áreas e medidas preconizadas”. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/legislacao/files/2016/03/Resolu%C3%A7%C3%A3o-Conjunta-SMA-SUCEN-001-2016-Processo-15257-2011-Aprova%C3%A7%C3%A3o-das-diretrizes-t%C3%A9cnicas-para-vigil%C3%A2ncia-e-controle-da-febre-maculosa-brasileira-no-Estado-de-SP.pdf>. Acesso em 31 de maio de 2016.

GRECA, H.; LANGONI, H.; SOUZA, L.C. 2008. Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 14(1):3-18.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A.; PACHACHO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.B. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(8):841-845.

GUEDES, E.; LEITE, R.C. 2008. 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*, 17:78-82.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PACHECO, R.C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M.B. 2011. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jabotical*, 20(4):308-311.

GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. 2001. *Ectoparasitos de importância veterinária*. Plêiade/FAPESP, São Paulo, 213p.

HORTA, M.C.; LABRUNA, M.B.; SANGIONI, L.A.; VIANNA, M.C.B.; GENNARI, S.M.; GALVÃO, M.A.M.; MAFRA, C.L.; VIDOTTO, O. SCHUMAKER, T.T.S.; WALKER, D.H. 2004. 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*, 71(1):93-97.

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

HORTA, M.; SABATINI, G.S.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; CANAL, R.B.; PACHECO, R.C.; MARTINS, T.F.; MATUSHIMA, E.R.; LABRUNA, M.B. 2010. Experimental infection of the *Opossum Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma dubitatum*. *Vector-borne and zoonotic diseases*, 10(10):959-967.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2017a. Campinas. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/campinas/panorama>. Acesso em 12 de fevereiro de 2018.

IBGE – INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. 2017b. Mogi Mirim. Disponível em: <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/mogi-mirim/panorama>. Acesso em 12 de fevereiro de 2018.

- INMET – INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA. 2017. Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=home/contato>. Acesso em 10 de maio de 2017.
- KESSING, F.; ALLAN, B.F.; TRUMAN, P.Y.; OSTFLD. 2013. Effects of wildlife and cattle on tick abundance in central Kenya. *Ecological Applications*, 23(6):1410-1418.
- KETTLE, D.S. 1985, Ixodida – Ixodidae (hard ticks), pp. 423-448. In: KETTLE, D.S. *Medical and Veterinary Entomology*. John Wiley & Sons, New York, 658p.
- KOLLER, W.W.; MATIAS, J. 2016. Coleta, preservação e identificação de carrapatos. pp. 1-33. In: ANDREOTTI, R.; KOLLER, W.W. *Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo*. Embrapa, Brasília, 217p.
- KRAWCZAK, F.; NIERI-BASTOS, A.F.; NUNES, F.P.; SOARES, J.F.; MORAES-FILHO J.; LABRUNA, M.B. 2014. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. *Parasites Vectors*, 7:1-7.
- LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. 2004. *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*, 42(1):90-98.
- LÉGER, E.; VOURCH'H, G.; VIAL, L.; CHEVILLON, C.; McCOY, K.D. 2013. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, 59:219-244.
- MACALUSO, K.R.; SONENSHINE, D.E.; CERAUL, S.M.; AZAD, A.F. 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *Journal of Medical Entomology*, 39(6):809-813.

MADEIRA, T.; SOUZA, C.M.; CORDEIRO, J.; THYSSEN, P.J. 2016. The use of DNA barcode for identifying species of *Oxysarcodexia* Townsend (Diptera: Sarcophagidae): A preliminary survey. *Acta Tropica, Basel*, 161:73-78.

MARTINS, T.F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. 2010. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 1(2):77-99.

MARTINS, L.A.; GALLETTI, M.F.B.M.; RIBEIRO, J.M.; FUJITA, A.; COSTA, F.B.; LABRUNA, M.B.; DAFFRE, S.; FOGAÇA, A. C. 2017. The distinct transcriptional response of the midgut of *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* ticks to *Rickettsia rickettsii* correlates to their differences in susceptibility to infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 7:1-13.

MATIAS, J.; GARCIA, M.V.; CUNHA, R.C.; AGUIRRE, A.A.R.; BARROS, J.C.; CSORDAS, B.G.; ANDREOTTI, R. 2015. Spotted fever group *Rickettsia* in *Amblyomma dubitatum* tick from the urban area of Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*, 6:107-110.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016a. Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>. Acesso em 01 de dezembro de 2016.

MMA – MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016b. O bioma Cerrado. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>. Acesso em 01 de dezembro de 2016.

MORAES-FILHO, J. 2017. Febre Maculosa Brasileira. *Reviste de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP*, 15(1):38-45.

NASCIMENTO, E.M.M. 2003. Isolamento e detecção molecular de riquetsias do Grupo da Febre Maculosa, a partir de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) e espécimens biológicos humanos, procedentes de áreas endêmicas do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

- NASSER, J.T.; LANA, R.C.; SILVA, C.M.S.; LOURENÇO, R.W.; CUNHA e SILVA, D.C.; DONALÍSIO, M.R. 2015. Urbanização da febre maculosa brasileira em município da região Sudeste: epidemiologia e distribuição espacial. *Revista Brasileira de Parasitologia*, 18(2):299-312.
- NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and tick-borne diseases*, 5:252-276.
- OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D.G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; COSTA, F.B.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. 2012. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology*, 139:1283-1300.
- OGRZEWALSKA, M.; PINTER, A. 2016. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 53(1):1-31.
- OLIVEIRA, P.R.; BORGES, L.M.F.; LOPES, C.M.L.; LEITE, R.C. 2000. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 92:295-301.
- OLIVER JR., J.H. 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20:397-430.
- PACHECO, R.; ROSA, S.; RICHTZENHAIN, L. SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B. 2008. Isolation of *Rickettsia bellii* from *Amblyomma ovale* and *Amblyomma incisum* ticks from southern Brazil. *Revista MVZ Córdoba*, 13(2):1273-1279.

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

PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; SZABÓ, M.P.J. 2011. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brasil. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(15):5207-5211.

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

PEREZ, C.A.; ALMEIDA, A.F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V.H.B.; BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S.; COSTA, J.C.; RAMOS, L.A.; ARRUDA-SANTOS, A.D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C.P.; BARROS-BATTESTI, D.M. 2008. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no estado de São Paulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(4):210-217.

PEREZ, C.A. 2013. História de sucesso no controle de *Amblyomma* sp. em área com ampla circulação de pessoas, pp. 33-45. In: VERISSÍMO, C.J., *Controle de carrapatos nas pastagens*. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa.

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

PINTER, A.; FRANÇA, A.C.; SOUZA, C.E.; SABBO, C.; NASCIMENTO, E.M.M.; SANTOS, F.C.P.; KATZ, G.; LABRUNA, M.B.; HOLCMAN, M.M.; ALVES, M.J.C.P.; HORTA, M.C.; MASCHERETTI, M.; MAYO, R.C.; ANGERAMI, R.N.; BRASIL, R.A.;

LEITE, R.M.; SOUZA, S.S.A.L.; COLOMBO, S.; OLIVEIRA, V.L. M. 2011. Febre Maculosa Brasileira. *Suplemento BEPA*, 8(1):1-32.

PINTER, A.; COSTA, C.S.; HOLCMAN, M.M.; CAMARA, M.; LEITE, R.M. 2016. A Febre Maculosa Brasileira na região metropolitana de São Paulo. *BEPA*, 13(151):3-47.

PREFEITURA DE CAMPINAS. 2016. Dados do município. Disponível em: <http://www.campinas.sp.gov.br/governo/seplama/dados-do-municipio/cidade/>. Acesso em: 02 de maio de 2017.

QUEIROGAS, V.L.; DEL CLARO, K.; NASCIMENTO, A.R.T.; SZABÓ, M.P.J. 2012. Capybaras and ticks in the urban areas of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil: ecological aspects for the epidemiology of tick-borne diseases. *Experimental and Applied Acarology*, 57:75-82.

RAOULT, D.; ROUX, V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4):694-719.

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

SAAE – SERVIÇO AUTÔNOMO DE ÁGUA E ESGOTO DE MOGI MIRIM. 2014. Plano Municipal de saneamento básico – Prefeitura de Mogi Mirim – SAAE Mogi Mirim (2014-2044). 409p.

SANASA – SOCIEDADE DE ABASTECIMENTO DE ÁGUA E SANEAMENTO S/A – CAMPINAS. 2014. Sanasa hoje. Disponível em: http://www.sanasa.com.br/noticias/not_con3.asp?f=I&flag=-PT&par_nrod=1547. Acesso em: 06 de maio de 2016.

SANGIONI, L.A.; HORTA, M.C.; VIANNA, M.C.B.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.; GALVÃO, A.M.; SCHUMAKER, T.T.S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M.B.

2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerging infectious diseases*, 11(2):265-270.

SAS INSTITUTE INCORPORATION. 2006. S.A.S. User's guide: Statistics, Version 6.12. Cary: S.A.S Institute Inc.

SERRA-FREIRE, N.M. 2011. Capítulo 19 – Ácaros (Carrapatos e Outros), pp.379-426 In: MARCONDES, C.B. *Entomologia Médica e Veterinária*. 2^o ed. Editora Atheneu. São Paulo, 526p.

SILVA, A.M. 2010. Comparação entre dois métodos de coleta de *Amblyomma cajennense* (carrapato estrela) em pastagens na região periurbanas no município de Paraty – RJ. *Revista Controle Biológico (BE-300) On-line*, 2(5-8).

SILVEIRA, A.K.; FONSECA, A.H. 2013. Distribuição, diversidade e sazonalidade de carrapatos em ambientes institucionais com diferentes graus de intervenção humana no estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(2):1-12.

SOARES, C.O.; ISHIKAWA, M.M.; FONSECA, A.H.; YOSHINARI, N.H. 2000. Borrelioses, agentes e vetores. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 20(1):1-19.

SOARES, J.F.; SOARES, H.S.; BARBIERI, A.M.; LABRUNA, M.B. 2012. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. *Medical and Veterinary Entomology*, 26:139-151.

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

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; YOSHINARI, N.H. 2010. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 16(3):521-523.

STREY, O.F.; TEEL, P.D.; LONGNECKER, M.T.; NEEDHAM, G.R. 1996. Survival and water-balance characteristics of unfed adult *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, 33(1):63-73.

SUCEN – SUPERINTENDÊNCIA DO CONTROLE DE ENDEMIAS. 2002. *Manual de Vigilância Acarológica*. Secretaria de Estado da Saúde/Superintendência do Controle de Endemias, São Paulo, 60p.

SUCEN – SUPERINTENDÊNCIA DO CONTROLE DE ENDEMIAS. 2004. *Manual de Vigilância Acarológica*. Secretaria de Estado da Saúde/Superintendência do Controle de Endemias, São Paulo, 62p.

SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B., GARCIA M.V.; PINTER, A., CASTAGNOLLI K.C.; PACHECO, R.C.; CASTRO, M.B.; VERONEZ, V.A.; MAGALHÃES, G.M.; VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J.M. 2009. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 103:57–72.

SZABÓ, M.P.J.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. 2013. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 3:1-9.

VERÍSSIMO, C.J. 2013. Fatores que afetam a fase de vida livre de carrapatos, pp. 02-17. In: VERÍSSIMO, C.J., *Controle de carrapatos nas pastagens*. Instituto de Zootecnia, Nova Odessa.

VIANNA, M.C.B.; HORTA, M.C.; SANGIONI, L.A.; CORTEZ, A.; SOARES, R.M.; MAFRA, C.L.; GALVÃO, M.A.M.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.S. 2008. Rickettsial spotted fever in Capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(5):297-301.

ANEXOS



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A2E32FC

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A2E32FC**
 Usuário: **Caroline Siqueira Franco**
 CPF/CNPJ: **368.395.448-50**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Amblyomma sculptum
Amblyomma sculptum
Amblyomma dubitatum
Amblyomma dubitatum
Amblyomma sp.
Amblyomma sp.
Rhipicephalus sp.

Título da Atividade: **A influência dos fatores ambientais na ocorrência de carrapatos (Arthropoda, Acari, Ixodidae) e Rickettsia em área de transmissão e área de predisposição para a Febre Maculosa Brasileira**

Equipe

Caroline Siqueira Franco **Universidade Estadual de Campinas**
Aricio Xavier Linhares **Universidade Estadual de Campinas**

Data do Cadastro: **15/05/2018 10:39:46**
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em 10:56 de 15/05/2018.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**



COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
Universidade Estadual de Campinas
Caixa Postal 6109.13083-970, Campinas, SP, Brasil
Fone (19) 3521-6378. email: cpgib@unicamp.br



DECLARAÇÃO

Em observância ao §5º do Artigo 1º da Informação CCPG-UNICAMP/001/15, referente a Bioética e Biossegurança, declaro que o conteúdo de minha Tese de Doutorado, intitulada **"A influência dos fatores ambientais na ocorrência de carrapatos (Arthropoda; Acari; Ixodidae) e Rickettsia em área de transmissão e área de predisposição para a Febre Maculosa Brasileira"**, desenvolvida no Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal do Instituto de Biologia da Unicamp, não versa sobre pesquisa envolvendo seres humanos, animais ou temas afetos a Biossegurança.

Assinatura: Caroline Siqueira Franco
Nome do(a) aluno(a): Caroline Siqueira Franco

Assinatura: Arício Xavier Linhares
Nome do(a) orientador(a): Arício Xavier Linhares

Data: 27/06/2018

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"A influência dos fatores ambientais na ocorrência de carrapatos (Arthropoda; Acari; Ixodidae) e Rickettsia em área de transmissão e área de predisposição para a Febre Maculosa Brasileira"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27 de junho de 2018

Assinatura : Caroline Siqueira Franco
Nome do(a) autor(a): **Caroline Siqueira Franco**
RG n.º 40928685-0

Assinatura : Axely
Nome do(a) orientador(a): **Arício Xavier Linhares**
RG n.º 4688359-9