



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

PESQUISA DE RIQUETSIAS EM CAPIVARAS
(*HYDROCHOERUS HYDROCHAERIS*) DE VIDA LIVRE
DO DISTRITO FEDERAL

ANA PAULA NUNES DE QUADROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA

2020



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E VETERINÁRIA

PESQUISA DE RIQUETSIAS EM CAPIVARAS
(*HYDROCHOERUS HYDROCHAERIS*) DE VIDA LIVRE
DO DISTRITO FEDERAL

ANA PAULA NUNES DE QUADROS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

Orientadora: Prof. Dra. Giane Regina Paludo

PUBLICAÇÃO: 219/2020

BRASÍLIA

2020

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**PESQUISA DE RIQUETSIAS EM CAPIVARAS (*HYDROCHOERUS*
HYDROCHAERIS) DE VIDA LIVRE DO DISTRITO FEDERAL**

ANA PAULA NUNES DE QUADROS

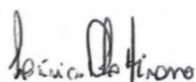
**DISSERTAÇÃO DE Mestrado
SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-
GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS ANIMAIS,
COMO PARTE DOS REQUISITOS
NECESSÁRIOS A OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS ANIMAIS**

APROVADA POR:



GIANE REGINA PALUDO (Doutora; PPGCA/UNB)

ORIENTADORA



LÍRIA QUEIROZ LUZ HIRANO (Doutora; PPSA/UNB)

EXAMINADOR EXTERNO



MARCIO BOTELHO DE CASTRO (Doutor; PPGCA/UNB)

EXAMINADOR INTERNO

Brasília, 20 de fevereiro de 2020

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

QUADROS, A. P. N. **Pesquisa de Riquetsias em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Dissertação de mestrado, 74p., 2020.

Documento formal autorizando reprodução dessa dissertação para empréstimo ou comercialização exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e seu orientador reservam para si os outros direitos autorais de publicação. Nenhuma parte dessa Dissertação de Mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou de seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

QUADROS, A. P. N. **Pesquisa de Riquetsias em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Dissertação de mestrado, 74p., 2020.

Dissertação (Mestrado em ciências animais) Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2019.

1. Febre Maculosa. 2. Família *Caviidae*. 3. Vetores artrópodes. 4. Rickettsioses.

“Viva aceso, olhando e conhecendo o mundo que o rodeia, aprendendo como um índio.
Seja um índio na sabedoria.”

Darcy Ribeiro

À minha tia Tânia, por ter me ensinado a
simplicidade de amar.

AGRADECIMENTOS

Meus mais sinceros agradecimentos aos meus orientadores, professora Giane e professor Paulo. Pela confiança, compreensão, paciência e por tudo que me ensinaram e me ensinam todos os dias.

A todos que fizeram parte da minha equipe de manejo e pesquisa: George, Camila, Luiz, Jéssica, Marisa, Thamiris, José Moreira, Rafael, Letícia, Júlia e Jussara. Sem eles esse trabalho jamais teria sido possível.

Ao pessoal do Jardim Zoológico de Brasília, em especial à Marisa e à Ana Raquel, por todo apoio para a construção dos bretes e por ceder o local para a realização da pesquisa.

Ao pessoal do Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UnB. À Marcela, pela paciência e tempo disposto a acompanhar e ensinar as técnicas de Biologia Molecular. À técnica Thaís e às residentes Luma, Thaís, Stephanie, Talita e Janaína, por toda a ajuda e apoio durante os experimentos realizados no laboratório.

Ao pessoal da Medicina Preventiva da USP, em especial à mestranda Lina e ao professor Labruna, por todo o apoio para a realização dos ensaios sorológicos e colaboração para a realização das técnicas de extração de DNA de carrapatos.

A todas as capivaras, que disponibilizaram parte do seu material biológico para a realização desse estudo.

À minha família, aos meus pais Vânia e Paulo, à minha irmã Izadora e à minha avó Estelina, por todo o amor, carinho, apoio e compreensão durante toda a minha trajetória até aqui.

Aos meus amigos, Camila, Ane, Beatriz, Jéssica, Amanda, Alessandra, Bryam e Flávia, por todo o amor, carinho, companheirismo e apoio dedicados desde o início da graduação.

SUMÁRIO

Resumo.....	iii
Abstract	iv
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	vii
Lista de Símbolos e Abreviações.....	viii
CAPÍTULO 1.....	10
1. Introdução.....	11
1.1. Objetivos Gerais.....	12
1.2. Objetivos Específicos	12
2. Revisão de Literatura.....	13
2.1. Capivaras (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>).....	13
2.2. Gênero <i>Rickettsia</i>	14
2.2.1. Transmissão das Rickettsioses	17
2.2.2. Fisiopatologia e Sinais Clínicos.....	19
2.2.3. Diagnóstico e Alterações Laboratoriais.....	20
3. Referências Bibliográficas.....	22
CAPÍTULO 2	29
Resumo.....	30
Abstract.....	31
1. Introdução.....	32
2. Materiais e Métodos.....	33
3. Resultados.....	40
4. Discussão.....	46
5. Conclusão.....	50
Referências Bibliográficas.....	51

ANEXOS.....	55
Anexo A – Casos confirmados de Febre Maculosa no Brasil.....	55
Anexo B – Óbitos confirmados por febre maculosa no Brasil.....	56
Anexo C - Diretrizes do IBAMA para controle de capivaras e FMB.....	57
Anexo D - Declaração de aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética.....	65
Anexo E - Protocolo de extração de DNA dos carrapatos pelo método de Isotiocianato de Guanidina e fenol clorofórmio.....	66

RESUMO

Nas áreas recreativas do Distrito federal têm-se observado o aumento de grupos de capivaras de vida livre. A presença desses animais pode estar diretamente associada a infestações de carrapatos, que podem atuar como vetores artrópodes para bactérias patogênicas com potencial zoonótico, como a *Rickettsia rickettsii*. O presente trabalho realizou a colheita de amostras de sangue total e carrapatos de 57 capivaras da região, com o intuito de pesquisar bactérias do gênero *Rickettsia* spp. a partir de métodos de diagnóstico molecular (PCR) e sorológicos (RIFI). Nenhuma das amostras de DNA extraídas de sangue total das capivaras foi positiva na PCR utilizando os oligonucleotídeos CS-62/CS-462. Entre as 55 amostras de soro testadas por RIFI, 53 (96,3%) apresentaram soro-reação para *Rickettsia* spp. Entre essas, 22 (40%) demonstraram o antígeno de *R. bellii* como provável antígeno envolvido em reação homóloga (PAERH) e dois (3,6%) demonstraram o antígeno de *R. parkeri*. Foram amostrados 558 carrapatos identificados como *Amblyomma sculptum* e 387 como *Amblyomma dubitatum*, além de nove larvas (*Amblyomma* spp.). Dentre esses carrapatos, 231 foram submetidos à PCR, resultando em uma ninfa e uma fêmea adulta de *A. dubitatum* positivas para os patógenos do gênero. Os resultados sugerem uma maior expressão da *R. bellii* nas populações de capivaras da região, o que pode estar suprimindo a manifestação de outras bactérias do gênero *Rickettsia* spp., e caracterizando a região como área não endêmica para febre maculosa brasileira (FMB). A taxa de infecção dos carrapatos é mínima (0,86%).

Palavras chave: 1. Febre Maculosa. 2. Família *Caviidae*. 3. Vetores artrópodes. 4. Rickettsioses.

ABSTRACT

An increase in groups of wild capybaras have been seen in recreational areas in Federal District. The presence of these animals may be directly associated with tick infestations, which can act as arthropod vectors for pathogenic bacteria with zoonotic potential, such as *Rickettsia rickettsii*. The present study collected samples of whole blood and ticks from 57 capybaras in the region, in order to investigate bacteria of the genus *Rickettsia* spp. using molecular diagnostic (PCR) and serological methods (IFAT). None of the DNA samples extracted from capybaras whole blood were positive in the PCR test using the CS-62/CS-462 oligonucleotides. Among the 55 serum samples tested by IFAT, 53 (96.3%) had a serum reaction for *Rickettsia* spp. Among these, 22 (40%) demonstrated the *R. bellii* antigen as a probable antigen involved in a homologous reaction (PAEHR) and two (3.6%) demonstrated the *R. parkeri* antigen. From the analysis 558 ticks were identified as *Amblyomma sculptum* and 387 as *Amblyomma dubitatum*, in addition to nine larvae (*Amblyomma* spp.). Among these ticks, 231 underwent PCR, resulting in a nymph and an adult female of *A. dubitatum* positive for the pathogens of the genus. The results suggest a greater representation of *R. bellii* in the populations of capybara of the region, which may be suppressing the manifestation of other bacterias of the genus *Rickettsia* spp., and characterizing the region as a non-endemic area for Brazilian spotted fever (FMB). The rate of infection of ticks is minimal (0.86%).

Key words: 1. Spotted fever. 2. Family *Caviidae*. 3. Arthropod Vectors. 4. Rickettsiosis.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1:

Figura 1. Distribuição dos óbitos causados por *Rickettsia rickettsii* no período 2005 a 2010 no Brasil. Fonte: ARAÚJO *et al.*, 2016.....16

Figura 2. Ciclo de transmissão e sintomas Febre Maculosa Brasileira (FMB). Fonte: G1 e Ministério de Saúde, 2019.....18

Capítulo 2:

Figura 1. Georreferenciamento dos pontos de coleta localizados na Fundação Zoológico de Brasília Ponto A: Lat:15° 50' 48" S, Long: 047° 56' 27" W; Ponto B: Lat:15° 51' 03" S, Lon: 047° 56' 17" W e Ponto C: Lat:15° 51' 00" S, Long: 047° 55' 57" W. Disponível em: <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020.....37

Figura 2. Georreferenciamento do ponto de coleta do Campo Experimental Fazenda Sucupira. Lat:15° 55' 31" S, Lon:048° 02' 59" W. Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020.....38

Figura 3. Georreferenciamento do ponto de coleta da região do Lago Paranoá. Lat:15° 47' 30" S, Long: 047° 47' 49" W. Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020.....38

Figura 4. Capivaras contidas em brete a partir de condicionamento por meio de ceva.....39

Figura 5. Colheita de amostras de sangue em capivara por punção da veia femoral.....39

Figura 6. Resultados em porcentagem das análises de imunoensaio das amostras sorológicas de capivaras para antígenos de *Rickettsia* spp. de acordo com o possível antígeno envolvido em reação homologa (PAERH).....40

Figura 7. Relação em porcentagem da quantidade de carrapatos identificados por espécie, sexo e estágio de desenvolvimento.....44

Figura 8. Resultados de PCR em gel de agarose a 2% para *Rickettsia* spp. em DNA extraído de carrapatos, utilizando os oligonucleotídeos CS-62/CS-462. Todas as amostras foram testadas em duplicata.....**45**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Informações relacionadas aos oligonucleotídeos utilizados durante os processos de validação das extrações de DNA e pesquisa de <i>Rickettsia</i> spp.....	36
Tabela 2. Resultados das análises de imunoenensaio das amostras sorológicas de capivaras para antígenos de <i>Rickettsia</i> spp.....	41
Tabela 3. Valores obtidos em eritrograma, plaquetas e valores absolutos de leucograma de capivaras (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>) de vida livre do Distrito Federal.....	42
Tabela 4. Valores obtidos na bioquímica sérica de capivaras (<i>Hydrochoerus hydrochaeris</i>) de vida livre do Distrito Federal.....	42
Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos em plaquetas, série eritrocitária e leucocitária de acordo com soro-reação e PAERH nos ensaios sorológicos.....	43
Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos em exames bioquímicos de acordo com soro-reação e PAERH nos ensaios sorológicos.....	43
Tabela 7. Quantidade de carrapatos total nas capivaras e utilizados nos ensaios de PCR de acordo com estágio, sexo e classificação taxonômica.....	44

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

CEUA – Comitê de Ética de Uso Animal

CHCM – Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dNTP – Trifosfato de Desoxirribonucleosídeos

EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

FA – Fosfatase Alcalina

FAV - Faculdade de Agronomia e Veterinária

FMB – Febre Maculosa Brasileira

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase

GFM – Grupo da Febre Maculosa

GGT – Gamma-glutamyltransferase

GT – Grupo do Tifo

IBAMA/MMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis

mM – Milimol

PAERH – Possível Antígeno Envolvido em Reação Homóloga

pb – Pares de base

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

pMol – Picomol

PPT – Proteínas Plasmáticas Totais

RIFI – Reação de Imunofluorescência Indireta

RNA – Ácido Ribonucleico

VCM – Volume Corpuscular Médio

VG – Volume Globular

°C – Graus Celsius de Temperatura

μL – Microlitros

μMol – Micromol

% - Porcentagem



CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

BRASÍLIA

2020

Introdução

As capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são roedores silvestres típicos da América Latina e apresentam distribuição geográfica por todos os estados brasileiros (MACDONALD *et al.*, 1984; AROUCA *et al.*, 2000; MEIRELES *et al.*, 2007; SINKOC *et al.*, 2009). As populações da espécie têm apresentado amplo crescimento nos ambientes urbanos, principalmente devido à sua excelente capacidade adaptativa aliada a crescente urbanização e consequente destruição das matas nativas. Este crescimento populacional em áreas antropizadas também está associado à ausência de predadores naturais e a livre oferta de alimento (MEIRELES *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2013).

Assim como as antas (*Tapirus terrestris*), as capivaras são consideradas hospedeiros primários de carrapatos da espécie *Amblyomma sculptum* (HORTA *et al.*, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004^c; PACHECO *et al.*, 2007). Dessa forma, os grupos de capivaras de vida livre podem propiciar o aumento dos níveis de infestação ambiental por artrópodes que, por sua vez, podem atuar como vetores para bactérias patogênicas com potencial zoonótico, como a *Rickettsia rickettsii*. Esses indícios, relacionados ao aumento das populações da espécie em áreas antropizadas, aumenta a importância do monitoramento sanitário para a manutenção da saúde pública (MEIRELES *et al.*, 2007; PACHECO *et al.*, 2007).

Em contrapartida, as capivaras também circulam livremente em áreas preservadas, onde podem contribuir para a disseminação de ectoparasitas e doenças infecciosas para outras espécies de animais selvagens. Na perspectiva conservacionista, o estabelecimento de doenças infecciosas corrobora o declínio e extinção local de várias espécies de vida livre. Por conseguinte, informações sanitárias das regiões são necessárias para a seleção e definição de estratégias mais eficazes de conservação e reestruturação da fauna (WOODROFFE *et al.*, 2012; ANDRÉ, 2018).

Tendo em vista todos esses fatores, o presente trabalho visou capturar capivaras de vida livre, da região do Distrito Federal, com o intuito de coletar amostras biológicas como tecido sanguíneo e ectoparasitas, e possibilitar a pesquisa de agentes patogênicos do gênero *Rickettsia* (família Rickettsiaceae) por meio de métodos de diagnóstico moleculares e imunodiagnóstico. O trabalho também possibilitou a avaliação de alterações laboratoriais em possíveis capivaras infectadas.

1.1. Objetivos Gerais

Investigar, a partir de técnicas de diagnóstico molecular e sorológica, a ocorrência de patógenos do gênero *Rickettsia*, em capivaras de vida livre da região do Distrito Federal e seus respectivos ectoparasitas e, correlacionar com possíveis alterações laboratoriais decorrentes destas infecções.

1.2. Objetivos Específicos

- Determinar a ocorrência e identificar espécies de patógenos do gênero *Rickettsia* – família Rickettsiaceae, presentes nos animais em estudo a partir de métodos moleculares como a reação de polimerização em cadeia (PCR).
- Determinar a ocorrência e identificar espécies do gênero *Rickettsia*, presentes nos animais em estudo a partir de métodos sorológicos de imunodiagnóstico, como a técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) para a possível detecção de anticorpos contra bactérias do gênero em questão;
- Identificar as espécies de carrapatos presentes nos animais e determinar a ocorrência de bactérias do gênero *Rickettsia* nesses artrópodes a partir de métodos moleculares (PCR);
- Verificar alterações hematológicas e bioquímicas ocasionadas nas capivaras por infecções de bactérias do gênero em estudo.

2. Revisão de Literatura

2.1. Capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*)

A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) é considerada o maior roedor do mundo e apresenta distribuição em toda a América Latina. É uma espécie semiaquática e utiliza rios e áreas alagadas para reprodução, termorregulação e evitar predadores. É dotada de características anatômicas que possibilitam maior capacidade natatória como orifícios nasais grandes e adaptados, e membranas interdigitais. A presença de água é determinante para a existência da espécie no ambiente (MACDONALD *et al.*, 1984; CRUZ *et al.*, 1998; MADELLA *et al.*, 2006; MEIRELES *et al.*, 2007; SINKOC *et al.*, 2009; ALMEIDA *et al.*, 2013).

Essa espécie apresenta uma organização social complexa e bem definida, são animais gregários e vivem em grupos familiares, com um macho adulto dominante, alguns machos submissos e várias fêmeas e filhotes (FERRAZ & VERDADE 2001; COSTA *et al.*, 2002; PAULA *et al.*, 2002). Também são descritos adultos solitários, geralmente machos excluídos, animais doentes e mais velhos, considerados animais satélites (MACDONALD *et al.*, 1984; COSTA *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2013). O tamanho e composição dos grupos variam de acordo com o ambiente e disponibilidade de água e de alimento. Em áreas antropizadas podem chegar a mais de 40 indivíduos adultos, enquanto em locais menos alterados, o contingente do grupo pode variar numa média de três a 14 animais (FERRAZ & VERDADE 2001; COSTA *et al.*, 2002; PEREIRA 2007).

Capivaras são animais monogástricos, herbívoros generalistas que realizam fermentação cecal. Costumam se alimentar de vegetações características das regiões inundadas em que vivem. Apesar de serem consideravelmente seletivas na escolha dos alimentos, esses animais também apresentam uma boa capacidade de adaptação alimentar (ANDRADE *et al.*, 1998; ALMEIDA *et al.*, 2013). O processo de desmatamento, a ausência de predadores naturais e a oferta abundante de alimentos acarreta um evidente aumento das populações de capivaras em áreas urbanas (MEIRELES *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2013).

As capivaras podem se reproduzir ao longo de todo o ano (FERRAZ & VERDADE 2001; PEREIRA 2007). Em um estudo realizado em São Paulo, Vargas *et al.* (2007) observaram que a maior parte dos picos de acasalamento ocorre no período de chuvas e consideraram que esse fator provavelmente se deve à alta disponibilidade de plantas forrageiras, o que possibilita melhor nutrição e conseqüente aumento das taxas de ovulação nas fêmeas. Em geral, as fêmeas apresentam alta eficiência reprodutiva, com uma taxa de fertilidade média de cinco filhotes por

fêmea ao ano (FERRAZ & VERDADE 2001; BARBOSA 2007). O período de gestação costuma variar entre 147 e 156 dias (KANASHIRO; 2006).

Em algumas regiões, as capivaras podem ser consideradas hospedeiros primários de carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum* e *A. dubitatum*. Esses artrópodes são potenciais vetores de bactérias do gênero *Rickettsia*, como a *Rickettsia rickettsi*, causadora da febre maculosa, doença que pode acometer não somente as capivaras e outras espécies de animais silvestres, como também a população humana (PACHECO *et al.*, 2007).

Além da febre maculosa, as capivaras também podem ser acometidas por outras patologias com potencial zoonótico, a exemplo da raiva, leptospirose, leishmaniose e tripanossomíase, assim como enterobacterioses e doenças fúngicas (CHIACCHIO *et al.*, 2014). As evidências dessas infecções nesses animais e o aumento das populações da espécie em áreas antropizadas podem ser consideradas como uma questão de saúde pública (MEIRELES *et al.*, 2007).

A capivara também apresenta excelente potencial zootécnico, podendo ser explorada economicamente para a produção de couro e carne com alto valor proteico (ANDRADE *et al.*, 1998; CRUZ *et al.*, 1998; SINKOC *et al.*, 2009). Dessa forma, o manejo adequado dos animais em cativeiro é essencial para melhorar o potencial econômico nas criações comerciais (AROUCA *et al.*, 2000).

2.2. Gênero *Rickettsia*

A ordem das Rickettsiales compreende as famílias Holosporaceae, Anaplasmataceae e Rickettsiaceae. A família Anaplasmataceae representa os gêneros *Erlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia* e *Wolbachia*, enquanto a família Rickettsiaceae inclui os gêneros *Rickettsia* e *Orientia* (ANDRÉ, 2018). Essas famílias incluem a maior parte dos patógenos infectantes de mamíferos, apresentam distribuição global e potencial zoonótico, portanto, conferem grande importância na Medicina Veterinária e Humana (DARBY *et al.*, 2007; SOUSA *et al.*, 2017; ANDRÉ, 2018).

Os agentes patogênicos da ordem das Rickettsiales são bactérias com características Gram-negativas, parasitas intracelulares obrigatórios, pequenos, que residem em fagossomos e apresentam ciclo de infecção que envolve interações complexas entre vetores invertebrados e parasitas vertebrados (SOUSA *et al.*, 2017; ANDRÉ, 2018; COSTA *et al.*, 2019). Esses patógenos podem desempenhar mecanismos de ataque, penetração e invasão do sistema imune tanto em artrópodes, quanto em mamíferos hospedeiros (DARBY *et al.*, 2007).

Algumas bactérias patogênicas do gênero *Rickettsia* podem apresentar potencial zoonótico e são subdivididas em dois grupos: 1. Grupo do tifo (GT), composto pelas bactérias *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, que podem ser transmitidas por pulgas e mosquitos; 2. Grupo da febre maculosa (GFM), que inclui as bactérias transmitidas por carrapatos, como a *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* (HORTA *et al.*, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004^c; PERLMAN *et al.*, 2006; LABRUNA *et al.*, 2007^{a,c}; PACHECO *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2007). No Brasil, é relatada a ocorrência de quatro espécies de *Rickettsia* pertencentes ao GFM. A *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommatis* e *R. rhipicephali*. Cabe salientar que as duas últimas não apresentam características potencialmente patogênicas em animais (MEIRA, 2013). A *Rickettsia bellii* também é uma espécie do gênero associada a carrapatos bastante reportada no país. Essa espécie não apresenta características patogênicas e não é classificada como pertencente ao GT nem ao GFM (HORTA *et al.*, 2004; SANGIONI *et al.*, 2005; SAKAI *et al.*, 2014; BRITES-NETO *et al.*, 2018^b).

A *Rickettsia rickettsii* é considerada a bactéria mais patogênica do GFM, e é causadora da febre maculosa, denominada no Brasil como Febre Maculosa Brasileira (FMB). A FMB é uma antroopozonose de gravidade variável e os seres humanos são considerados hospedeiros acidentais. No Brasil, as taxas de mortalidade dessa doença variam entre 20% a 30% e, em casos não tratados, a letalidade pode chegar a 80%. A sintomatologia inespecífica e patogenia pouco conhecida dificulta o diagnóstico precoce e inviabiliza o estabelecimento da terapêutica adequada (LABRUNA *et al.*, 2004^c; BRITES-NETO & BRASIL, 2014; MACHADO *et al.*, 2018).

Segundo Araújo *et al.* (2016), entre 2001 e 2008, o Ministério da Saúde havia registrado 601 casos de febre maculosa no Brasil, com 24,8% de letalidade e prevalência na região Sudeste. Entre esses, 267 foram em São Paulo e 104 em Minas Gerais. Ainda de acordo com os mesmos autores, entre 2005 e 2010, foram registrados 75 óbitos por FMB no Brasil, distribuídos entre as regiões Sudeste, com 97,3% dos casos, e Sul, com 2,7% (Figura 1). No entanto, dados atualizados pelo Ministério da Saúde em 2019 (Anexo A) demonstram que no último ano foram confirmados 37 casos da doença no Brasil, sendo 20 na região Sul do país (13 no Paraná e sete em Santa Catarina), 14 na região Sudeste (11 em São Paulo, dois em Minas Gerais e um no Rio de Janeiro) e um caso nas regiões Norte (Acre), Nordeste (Pernambuco) e Centro-Oeste (Mato Grosso). Entre esses casos, houveram dois óbitos (5,4%), sendo um em São Paulo e um em Minas Gerais (Anexo B).

A *Rickettsia parkeri* foi descrita recentemente e vêm sendo considerada outra espécie causadora da febre maculosa, sendo o principal agente da doença encontrado no Uruguai. Essa

espécie é caracterizada por manifestações clínicas mais leves e moderadas em comparação às causadas pela *R. rickettsii*. Apesar de serem descritas evidências sorológicas de bactérias da espécie em animais domésticos e casos diagnosticados em carrapatos, ainda não foram reportados casos de infecção patogênica por *R. parkeri* em humanos no Brasil (HORTA *et al.*, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004^c; PADDOCK, 2004; PACHECO *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2007).

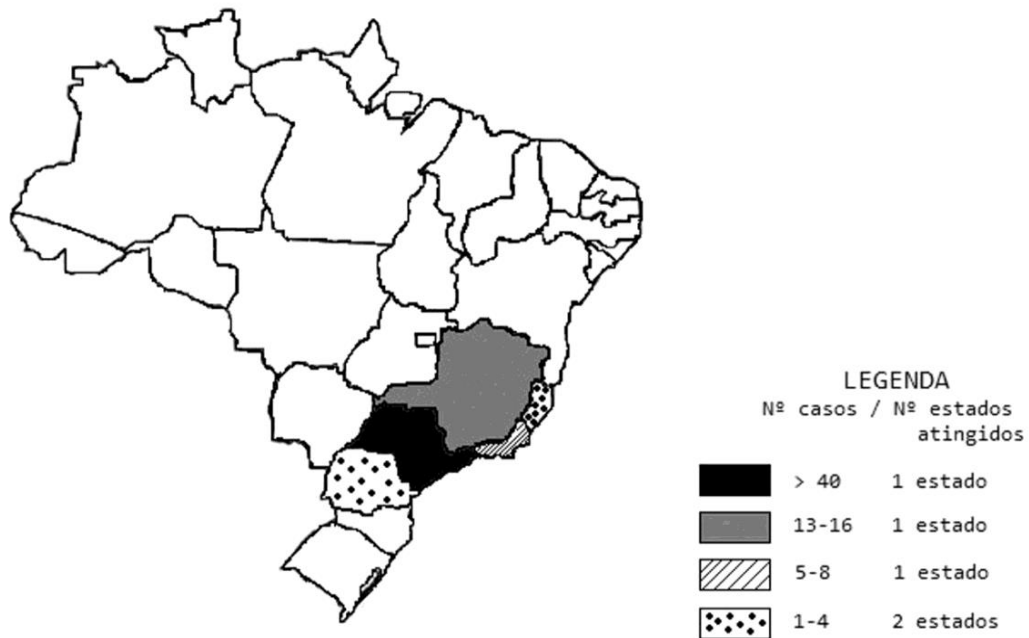


Figura 1. Distribuição dos óbitos causados por *Rickettsia rickettsii* no período 2005 a 2010 no Brasil.

Fonte: ARAÚJO *et al.* (2016)

2.2.1. Transmissão das Rickettsioses

As bactérias do grupo da febre maculosa são mantidas estáveis em populações de carrapatos (DARBY *et al.*, 2007). A espécie *A. sculptum* está diretamente associada à disseminação da *R. rickettsii*, sendo considerado o principal vetor da bactéria no Brasil (BRITES-NETO *et al.*, 2018^a; COSTA *et al.*, 2019).

Estudos já demonstraram que, em diversas espécies de carrapatos, bactérias do gênero *Rickettsia* apresentam capacidade de transmissão transovariana (para ovos e larvas) e transtadial (do estágio de larva, para ninfa e adulto) (SAKAI *et al.*, 2014). No entanto, devido ao fato dessa bactéria apresentar patogenicidade para os carrapatos, a taxa de infecção nesses artrópodes em condições naturais é considerada baixa (<1%) (SOUZA *et al.*, 2009). Portanto, o papel do hospedeiro amplificador na ecologia das bactérias rickettsiais é fundamental.

A incidência de doenças transmitidas por carrapatos em humanos e animais vêm crescendo nos últimos anos. Esse aumento pode estar relacionado à redução de áreas preservadas e a maior proximidade desses locais a áreas urbanas, possibilitando o contato entre animais silvestres, e seus respectivos ectoparasitas, com animais domésticos e humanos (ANDRÉ, 2018).

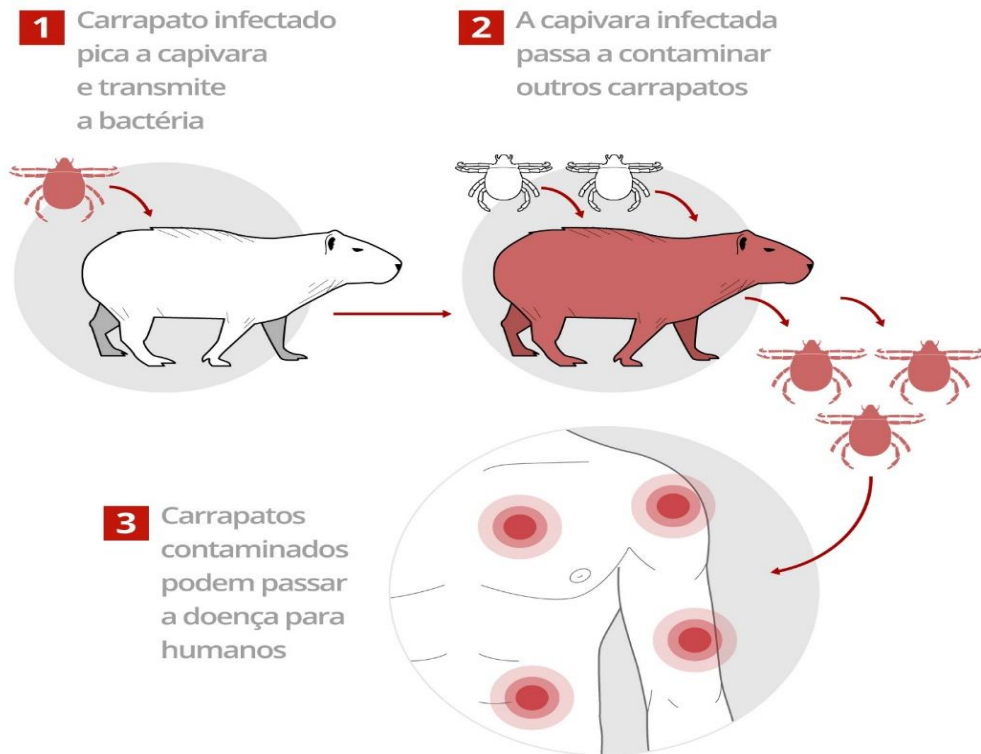
As capivaras atuam como hospedeiro primário de carrapatos das espécies *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma dubitatum*, e geralmente apresentam coinfeção das duas. Ambas também podem eventualmente parasitar humanos e outras espécies de animais, o que contribui para a circulação de possíveis rickettsioses em diferentes populações de espécies, incluindo os seres humanos (LABRUNA *et al.*, 2007^b; BRITES-NETO *et al.*, 2018^b).

As antas (*Tapirus terrestres*) e as capivaras (*Hydrochoerus hydrocaeris*) são consideradas hospedeiros primários para *A. sculptum* (HORTA *et al.*, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004^c; PACHECO *et al.*, 2007). No Brasil, as capivaras vêm sendo associadas como os principais hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para carrapatos dessa espécie (HORTA *et al.*, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004^c; PACHECO *et al.*, 2007; SOUZA *et al.*, 2009).

A caracterização das capivaras como reservatórios naturais para a *R. rickettsii* se deve a alguns fatores como: (1) O fato desses animais propiciarem altos níveis de infestações ambientais por carrapatos da espécie *A. sculptum*; (2) As áreas endêmicas para FMB no estado de São Paulo coincidem com áreas onde há aumento explosivo de populações de capivaras de vida livre (Figura 2) (LABRUNA *et al.*, 2004^c; SOUZA *et al.*, 2009; BRITES-NETO & BRASIL, 2014; COSTA *et al.*, 2019).

Ciclo de transmissão da febre maculosa

Doença é causada por bactéria do gênero *Rickettsia*



SINTOMAS:

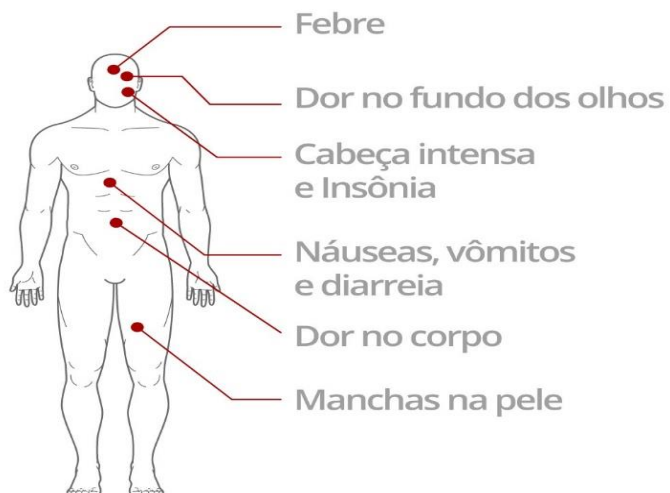


Figura 2. Ciclo de transmissão e sintomas Febre Maculosa Brasileira (FMB).
Fonte: G1 e Ministério de Saúde. (2019)

O aumento dos casos de FMB no Brasil, associados à presença de capivaras, levou o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) a estabelecer diretrizes para o controle populacional da espécie em áreas urbanas (Anexo C). Além do controle da capivara, as diretrizes também englobam ações de controle sanitário de animais domésticos como cães e equinos, os quais também são responsáveis pela difusão de carrapatos do gênero *Amblyomma* (IBAMA, 2008).

Além das capivaras, no Brasil já foram relatados o diagnóstico de *R.rickettsii* em gambás, equinos, coelhos, cães e outros animais silvestres. Sabe-se que a maior proximidade com os vetores artrópodes torna os cães mais susceptíveis a patógenos do que os seres-humanos (JOANNITTI *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016).

No Brasil, os casos de FMB também estão associados a regiões onde ocorre maior abundância de animais, potenciais hospedeiros para carrapatos, e às estações de verão e inverno, nas quais há maior circulação de carrapatos em fase larval e fase de ninfa. Devido ao menor tamanho, que dificulta a visualização, e maior necessidade de repasto sanguíneo, o homem é atacado com maior frequência por carrapatos nesses estágios (SUCEN-SP & JOANNITTI *et al.*, 2014; ARAÚJO *et al.*, 2016).

2.2.2. Fisiopatologia e Sinais Clínicos

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* é uma doença infecciosa aguda que apresenta gravidade variável. É caracterizada por dois a 14 dias de período de incubação e os sinais clínicos em humanos podem incluir febre contínua, calafrios, cefaleia, mialgia, artralgia nos tornozelos e punhos, mal-estar, distúrbios hemostáticos, petéquias e erupções cutâneas máculo-papulares (PAROLA *et al.*, 2005; BRITES-NETO & BRASIL, 2014; SOUSA *et al.*, 2017).

A transmissão da *R. rickettsii* ocorre por meio da saliva do carrapato infectado e é necessário que esse artrópode permaneça aderido no hospedeiro por um período de 4 a 6 horas para que haja a ativação do patógeno (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Logo após o primeiro contato com o mamífero hospedeiro, a *R. rickettsii* invade as células endoteliais, se multiplica no citoplasma e eventualmente no núcleo celular (DARBY *et al.*, 2007). A replicação no endotélio vascular acarreta a instalação de vasculite, e conseqüentemente na ativação do sistema hemostático, levando a trombose e aumento da permeabilidade vascular (MELLES *et al.*, 1992). Após a invasão endotelial, a *R. rickettsii* pode invadir e infectar, desde as células adjacentes

até o endotélio de tecidos da musculatura lisa, podendo infectar pulmões, fígado, rins, coração, baço, pâncreas, tubo digestivo e cérebro. Alguns casos podem incluir sinais clínicos como insuficiência renal aguda, insuficiência respiratória e sintomas neurológicos (WALKER *et al.*, 1992; PAROLA *et al.*, 2005; ANDRÉ 2018).

A partir do quarto dia de incubação, podem surgir exantemas, que se instalam como máculas róseas de bordos indefinidos e se distribuem por todo o corpo, nos membros, punhos, tornozelos, palma das mãos, planta dos pés e face (MELLES *et al.*, 1992). Em estágios mais avançados, o exantema pode evoluir subitamente para necrose nas orelhas e extremidades dos dedos (FONSECA & MARTINS, 2007).

Em testes com cobaias infectadas experimentalmente por *Rickettsia rickettsii* foram observados, além dos sintomas de febre, edema, sufusão, necrose escrotal e necrose auricular (COSTA *et al.*, 2019).

2.2.3. Diagnóstico e Alterações Laboratoriais

O agente etiológico específico das enfermidades causadas pelas Rickettsiales geralmente é diagnosticado por métodos moleculares, de imunodiagnóstico, imunohistoquímica e pesquisa de mórulas em esfregaço sanguíneo ou cortes histológicos (GREENE, 2012; ANDRÉ 2018). As alterações laboratoriais observadas em casos de animais acometidos por doenças rickettsiais costumam ser inespecíficas, como leucopenia suave, anemia e trombocitopenia. Também podem ser constatados casos de hipoalbuminemia, hiponatremia, e alterações em enzimas renais e hepáticas (PAROLA *et al.*, 2005).

Apesar do baixo custo e fácil execução, o diagnóstico por visualização direta das inclusões intracitoplasmáticas, ou mórulas, em técnicas de citologia aspirativa, esfregaço sanguíneo ou lâminas histológicas pode ser um tanto impreciso. Essas inclusões podem ser indistinguíveis morfológicamente, impossibilitando a identificação exata do agente. Além disso, devido a flutuação da parasitemia em animais infectados, nem sempre é possível a detecção das mórulas (GREENE, 2012).

Os testes de imunodiagnóstico são bastante utilizados, pois podem detectar anticorpos contra os agentes da ordem e possibilitar a avaliação do contato prévio do animal ao patógeno, em caso de soro conversão. A técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) pode ser eficiente na detecção de anticorpos contra agentes rickettsiais e vem sendo utilizada para o diagnóstico em humanos, espécies domésticas e silvestres (HORTA *et al.*, 2004; SANGIONI *et al.*, 2005; LABRUNA *et al.*, 2007^{a,c}; PACHECO *et al.*, 2007; COSTA *et al.*, 2019; MIAO LU *et al.*,

2019). Em humanos, os ensaios de RIFI são feitos a partir da suspeita clínica, e 30 dias depois, e utilizados como método confirmatório da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Apesar da alta sensibilidade, esse método apresenta baixa especificidade devido à grande possibilidade de reação cruzada. Portanto, afirmar com exatidão qual o antígeno envolvido na reação é inviável, mas pode ser avaliada a provável espécie envolvida de acordo com as diluições do soro suspeito (COSTA *et al.*, 2019).

Técnicas de imunohistoquímica também possibilitam a visualização de *Rickettsias* em amostras fixadas de tecido obtidos a partir de necropsia ou biopsia de tecido cutâneo lesionado. No entanto, apesar de detectar agentes rickettsiais, essas técnicas não são espécie específicas, sendo necessária a utilização de técnicas de PCR para confirmação do agente (PAROLA *et al.*, 2005).

Técnicas de isolamento e cultura bacteriana a partir de coágulos de sangue, fragmentos de tecidos ou de carrapatos, também podem ser realizados para a identificação da espécie bacteriana envolvida. No entanto, essa metodologia apresenta baixa sensibilidade e requer um período mínimo de cinco dias para confirmação da suspeita clínica (MELLES *et al.*, 1999).

A técnica de reação de polimerase em cadeia (PCR) possibilita detectar o DNA do agente em amostras biológicas. Essa técnica é altamente específica e vem sendo bastante utilizada para a detecção de bactérias do gênero *Rickettsia* em carrapatos, amostras de tecidos e amostras fecais. Devido ao curto período de Rickettsemia (até 5 dias) e a predileção das *Rickettsias* pelas células epiteliais, a PCR não é considerada um método eficiente para a detecção de bactérias do gênero *Rickettsia* em tecido sanguíneo (MELLES *et al.*, 1999; LABRUNA *et al.*, 2004^{a,b,c}; SANGIONI *et al.*, 2005; CICUTTIN *et al.* 2017; SOUSA *et al.*, 2017; CRIADO-FORNELIO *et al.*, 2018; COSTA *et al.*, 2019; JAARSMA *et al.*, 2019; MIAO LU *et al.*, 2019).

3. Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A. M. R.; ARZUA, M.; TRINDADE, P. W. S.; JUNIOR, A. S. **Capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) (Mammalia: Rodentia) em áreas verdes do município de Curitiba (PR).** Estudos de Biologia, v.35, p. 9-16, jan/jun, 2013.

ANDRADE, P. C. M.; LAVORENTI, A.; NOGUEIRA FILHO, S. L. G. **Efeitos do tamanho da área, da dieta e da idade inicial de confinamento sobre capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris hydrochaeris* L. 1766) em crescimento.** Revista Brasileira de Zootecnia., v. 27, n.2, p. 292-299, 1998.

ANDRÉ, M. R. **Diversity of *Anaplasma* and *Ehrlichia/Neohelrichia* Angents in Terrestrial Wild Carnivores Worldwide: Implications for Human and Domestic Animal Health and Wildlife Conservation.** Frontiers In Veterinary Science. v.5, art.293, 2018.

ARAÚJO, R. P. D., NAVARRO, M. B. M. D. A., & CARDOSO, T. A. D. O. **Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica.** Cadernos Saúde Coletiva, v.24, p.339-346, 2016.

AROUCA, M. E.; MIRANDA, L. B.; LOPES, R. S.; TAKAHIRA, R. K.; KOHAYAGAWA, A.; CIARLINI, P. C.; OBA, E. **Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) criadas em cativeiro no município de Botucatu, SP.** Ciência Rural, Santa Maria, v. 30, n. 5, p. 813-817, 2000.

BARBOSA, L.P.; RODRIGUES, M. V.; NEVES, M. M.; MORAIS, D. B.; MELO, B. E. S.; BALARINI, M. K.; COELHO, C. D. P.; MENDONÇA, C. **Caracterização da colpocitologia em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*).** Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal, v.8, n.4, p.258-266, out/dez, 2007.

BRITES-NETO, J.; BRASIL, J. **Monitoramento epidemiológico de carrapatos em área de risco para Febre Maculosa Brasileira, Americana – SP.** Informe Epidemiológico, BEPA; v.11, p.7-15, 2014.^b

BRITES-NETO, J.; BRASIL, J.; TAKEDA, G. A. C. G.; GUILLEN, A. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A. **Diferenciação morfométrica entre larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899.** Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 70, n. 5, p. 1521–1528, 2018.^a

CHIACCHIO, R.; SETIM PRIOSTE, F. E.; THIJL VANSTREELS, R. E.; KNÖB, T.; KOLBER, M.; MIYASHIRO, S. I.; MATUSHIMA, E. R. **Health evaluation and survey of zoonotic pathogens in free-ranging capybaras (*Hydrochoerus Hydrochaeris*)**. Journal of Wildlife Diseases, v. 50, n. 3, p. 496–504, 2014.

CICUTTIN, G. L.; DE SALVO, M.N; NAVA, S. **Two novel *Ehrlichia* strains detected in *Amblyomma tigrinum* ticks associated to dogs in peri-urban areas of Argentina**. Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases, v.53, p.404-44, 2017.

COSTA, D. S.; PAULA, T. A. R.; FONSECA, C. C.; NEVES, M.T.D. **Reprodução de capivaras**. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia, UNIPAR, v.5, n.1, p.111-118, 2002.

COSTA, F. B.; GERARDI, M.; BINDER, L. C.; BENATTI, H. R.; SERPA, M. C. A.; LOPES, B.; LUZ, H. R.; FERRAZ, M. P. M. B.; LABRUNA, M. B. ***Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infecting *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) Ticks and Capybaras in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area of Brazil**. Journal of Medical Entomology, Vol.00, No. XX, p.1-4, Oxford University Press 2019.

CRIADO-FORNELIO, A.; MARTÍN-PÉREZ, T.; VERDÚ-EXPÓSITO, C.; REINOSO-ORTIZ, S. A.; PÉREZ-SERRANO, J. **Molecular epidemiology of parasitic protozoa and *Erllichia canis* in wildlife in Madrid (central Spain)**. Parasitology Research, Springer Nature, 2018.

CRUZ, M. L.; LUNA, S. P. L.; MOURA, C. A.; CASTRO, G. B.; TEIXEIRA NETO, F. J.; NISHIDA, S. M. **Técnicas Anestésicas Injetáveis em Capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linné)**. Ciência Rural, Santa Maria, v. 28, n.3, p. 411-415, 1998.

DARBY, A., CHO, N., FUXELIUS, H., WESTBERG, J. AND ANDERSSON, S. **Intracellular pathogens go extreme: genome evolution in the Rickettsiales**. Trends in Genetics, v. 23, p.511-520, 2007.

FERRAZ, K. P. M. B.; VERDADE, L. M. **Ecologia comportamental da capivara: bases biológicas para o manejo da espécie**. Laboratório de Ecologia Animal, Piracicaba, São Paulo, 2001.

FONSECA, L. M. G.; MARTINS, A. V. **Febre Maculosa: Revisão de literatura – Artigo de revisão**. Saúde & Ambiente em Revista, v. 2, n.1, p. 01-20, 2007.

GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 4th ed., p.227 - 269. Elsevier, 2012.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIODOTTO, O.; TERESINHA, T. S. S.; WALKER, D. H. **Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brasil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia***. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 71, p. 93-97, 2004.

IBAMA/MMA. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Diretrizes de combate à febre maculosa**, p. 1–8, 2008.

JAARSMA, R. I.; SPROG, H.; TAKUMI, K.; KAZIMIROVA, M.; SILAGHI, C.; MYSTERUD, A.; RUDOLF, I.; BECK, R.; FÖLDVÁRI, G.; TOMASSONA, L.; GROENEVELT, M.; EVERTS, E.; RIJKS, J. M.; ECKE, F.; HÖRNFELDT, B.; MODRÝ, D.; MAJEROVÁ, K.; VOTÝPKA, J. and ESTRADA-PEÑA, A. ***Anaplasma phagocytophilum* evolves in geographical and biotic niches of vertebrates and ticks**. Parasites & Vectors, v.12, 2019.

JOANNITTI, L. H. L., SILVA, N. R. D., D'AURIA, S. R. N., CAMARGO, M. C. G. D. O., VICTORIA, C., BABBONI, S. D., ... & MODOLO, J. R.. **Estimativa de positividade da febre maculosa em cães para a vigilância e o seu monitoramento no município de Botucatu, SP**. Veterinária e Zootecnia, p.451-461, 2014.

KANASHIRO, C. **Estudo morfológico da placenta de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*): terço inicial**. Dissertação de mestrado – Universidade de São Paulo, 2006.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. **Prevalence of *Rickettsia* Infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil**. Vector-borne and zoonotic diseases, v. 7, nº 2, 2007.^a

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C.; SZABÓ, M. P. J. **HUMAN PARASITISM BY THE CAPYBARA TICK, AMBLYOMMA DUBITATUM (ACARI: IXODIDAE)**. Entomological News, v. 118, n. 1, p. 77–80, 2007.^b

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, J. L.; SZABÓ, M. P. J. **Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemophysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil.** Applied and Environmental Microbiology, v.73, n°3, p. 869-873, Feb, 2007.^c

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L. M.; CAMARGO, E. P.; POPOV, V.; WALKER, D. H. ***Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil.** Entomological Society of America, v. 41, n° 6, 2004. ^b

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. ***Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from na area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian Spotted fever is endemic.** Journal of Clinical Microbiology, p. 90-98, Jan. 2004. ^c

MACDONALD, D. W.; KRANTZ, K.; APLIN, R. T. **Behavioural, anatomical and chemical aspects of scent marking amongst Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Rodentia: Caviomorpha).** Journal of Zoology, v.202, p.341-360, 1984.

MACHADO, I. B.; BITENCOURTH, K.; CARDOSO, K. M.; OLIVEIRA, S. V.; SANTALUCIA, M.; MARQUES, S. F. F.; AMORIM, M.; GAZÊTA, G. S. **Diversity of rickettsiae and potential vectors of spotted fever in an area of epidemiological interest in the Cerrado biome, midwestern Brazil.** Medical and Veterinary Entomology, v. 32, n. 4, p. 481-489, 2018.

MADELLA, D. A.; NETO, E. J. R.; FELISBERTO, M. E.; SOUZA, C. E. S. **Valores hematológicos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) (Rodentia: Hydrochoeridae) de vida livre na região de Campinas- SP.** Ciência Rural, Santa Maria, v.36, n.4, p.1321-1324, jul/ago, 2006.

MEIRELES, M. V.; SOARES, R. M.; BONELLO, F.; GENNARI, S. M. **Natural infection with zoonotic subtype of *Cryptosporidium parvum* in Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Brazil.** Veterinary parasitology, v.147, p. 166-170, 2007.

MELLES, H. B.; COLOMBO, S.; LEMOS, E. R. S. **Isolamento de Rickettsia em cultura de células vero Isolation of Rickettsia in vero cell culture.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 32, p. 469-473. 1999.

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

MEIRA, A. M. De. **Febre maculosa : dinâmica da doença , hospedeiros e vetores.** ESALQ/USP, 2013.

MIAO LU, FENG LI, YOUNG LIAO, JIN-JIN SHEN, JIAN-MIN XU, YIN-ZHONG CHEN, JIAN-HUA LI, HOLMES. E. C. and YONG-ZHEN ZHANG. **Epidemiology and Diversity of Rickettsiales Bacteria in Humans and Animals in Jiangsu and Jiangxi provinces, China.** Nature-Scientific reports, v.9, 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde Doenças Infecciosas e Parasitárias. **Doenças Infecciosas e Parasitárias: guia de bolso.** v.8, ed. Brasília: MS; 2010.

PACHECO, C. R.; HORTA, C. M.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. **Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*.** Biomédica, v.27, p.364-71, 2007.

PADDOCK, C. D. ***Rickettsia parkeri*: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the united states.** Infectious Diseases in Clinical Practice, v. 12, n. 4, p. 261–262, 2004.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D. RAOULT, D. **Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts.** Clinical Microbiology Reviews, p. 719-756, Oct, 2005.

PAULA, T. A. R.; COSTA, D. S.; MATTA, S. L. P. **Avaliação histológica quantitativa do testículo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) adultas.** Bioscience Journal, v.18, n.1, p.121-136, junho, 2002.

PEREIRA, H. F. A.; ESTON, S. R. M. **Biologia e manejo de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) no parque estadual Alberto Lofgren, São Paulo, Brasil.** Rev. Inst. Flor., São Paulo, v.19, n.1, p.55-64, jun, 2007.

PERLMAN, S. J.; HUNTER, M. S.; ZCHORI-FEIN, E. **The emerging diversity of Rickettsia**. Proceedings of the Royal Society:Biological Sciences, v.273, p. 2097-2106, April, 2006.

RODRIGUES M. V.; PAULA T. A. R.; FERREIRA, L. B. C.; ÁVILA, E. C.; SILVA, L. C.; SOUZA, V. B. **Comportamento de um grupo de capivaras em área urbanizada**. Acta Veterinaria Brasilica, v.7, n.3, p.212-217, 2013.

SAKAI, R. K.; COSTA, F. B.; UENO, T. E. H.; RAMIREZ, D. G.; SOARES, J. F.; FONSECA, A. H.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Experimental infection with Rickettsia rickettsii in an Amblyomma dubitatum tick colony, naturally infected by Rickettsia bellii**. Ticks and Tick-borne Diseases, v. 5, n. 6, p. 917–923, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.003>>

SANGIONI, L., HORTA, M., VIANNA, M., GENNARI, S., SOARES, R., GALVÃO, M., SCHUMAKER, T., FERREIRA, F., VIDOTTO, O. AND LABRUNA, M. **Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity**. Emerging Infectious Diseases, v.11, p.265-270, 2005.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C; LABRUNA, M. B. **Rickettsia parkeri in Brazil**. Emerging Infectious Diseases, v. 13, nº 7, July, 2007.

SINKOC, A. L.; BRUM, J. G. W.; MULLER, G. **Gastrintestinal Helmiths of Capybara (Hydrochoerus hydrochaeris, Linnaeus, 1766) in cattle breeding farm in the área of the ecological reserve of Taim, Rio Grande**. Brazilian Archives of Biology and Technology, v.52. n. 2, p. 327-333, Mar/Apr, 2009.

SOUSA, K. C. M; CALCHI, A. C.; HERRERA, H. M.; DUMLER, J. S.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z. and ANDRÉ, M. R. **Anaplasmatocae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil**. Epidemiology & Infection, v.145, p.3424-3427. Cambridge University Press, 2017.

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

SUCEN-SP. **Superintendência de Controle de Endemias de São Paulo**. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/sucen-superintendencia-de-controle-de-endemias/programas/febremaculosa> > Acessado em 25 de Jan de 2020.

VARGAS, F. C.; VARGAS, S. C.; MORO, M. E. G.; SILVA, V.; CARRER, C. R. O. **Monitoramento populacional de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus, 1776) em Pirassununga, SP, Brasil**. Ciência Rural, Santa Maria, v.37, n.4, p.1104-1108, jul/ago, 2007.

WALKER, D. H.; LIU, Q. H.; YU, X.L.; LI, H.; TAYLOR, C.; FENG, H. M. **Antigenic diversity of *Rickettsia conorii***. American Journal Medicine and Higiene, v. 47, p. 78-86, 1992.

WOODROFFE, R.; PRAGER, K. C.; MUNSON, L.; CONRAD, P.A.; DUBOVI, E. J.; MAZET, J. A. K. **Contact with Domestic Dogs Increases Pathogen Exposure in Endangered African Wild Dogs (*Lycaon pictus*)**. Plos one, vol. 7, 2012.



CAPÍTULO 2

PESQUISA DE RIQUETSIAS EM CAPIVARAS (*HYDROCHOERUS HYDROCHAERIS*) DE VIDA LIVRE DO DISTRITO-FEDERAL

BRASÍLIA

2020

RESUMO

Nas áreas recreativas do Distrito federal têm-se observado o aumento de grupos de capivaras de vida livre. A presença desses animais pode estar diretamente associada a infestações de carrapatos, que podem atuar como vetores artrópodes para bactérias patogênicas com potencial zoonótico, como a *Rickettsia rickettsii*. O presente trabalho realizou a colheita de amostras de sangue total e carrapatos de 57 capivaras da região, com o intuito de pesquisar bactérias do gênero *Rickettsia* spp. a partir de métodos de diagnóstico molecular (PCR) e sorológicos (RIFI). Nenhuma das amostras de DNA extraídos de sangue total das capivaras foi positiva na PCR utilizando os oligonucleotídeos CS-62/CS-462. Entre as 55 amostras de soro testadas por RIFI, 53 (96,3%) apresentaram soro-reação para *Rickettsia* spp. Entre essas, 22 (40%) demonstraram o antígeno de *R. bellii* como provável antígeno envolvido em reação homóloga (PAERH) e dois (3,6%) demonstraram o antígeno de *R. parkeri*. Foram amostrados 558 carrapatos identificados como *Amblyomma sculptum* e 387 como *Amblyomma dubitatum*, além de nove larvas (*Amblyomma* spp.). Dentre esses carrapatos, 231 foram submetidos à PCR, resultando em uma ninfa e uma fêmea adulta de *A. dubitatum* positivas para os patógenos do gênero. Os resultados sugerem uma maior expressão da *R. bellii* nas populações de capivaras da região, o que pode estar suprimindo a manifestação de outras bactérias do gênero *Rickettsia* spp., e caracterizando a região como área não endêmica para febre maculosa brasileira (FMB). A taxa de infecção dos carrapatos é mínima (0,86%).

Palavras chave: 1. Febre Maculosa. 2. Família *Caviidae*. 3. Vetores artrópodes. 4. Rickettsioses.

ABSTRACT

An increase in groups of wild capybaras have been seen in recreational areas in Federal District. The presence of these animals may be directly associated with tick infestations, which can act as arthropod vectors for pathogenic bacteria with zoonotic potential, such as *Rickettsia rickettsii*. The present study collected samples of whole blood and ticks from 57 capybaras in the region, in order to investigate bacteria of the genus *Rickettsia* spp. using molecular diagnostic (PCR) and serological methods (IFAT). None of the DNA samples extracted from capybaras whole blood were positive in the PCR test using the CS-62/CS-462 oligonucleotides. Among the 55 serum samples tested by IFAT, 53 (96.3%) had a serum reaction for *Rickettsia* spp. Among these, 22 (40%) demonstrated the *R. bellii* antigen as a probable antigen involved in a homologous reaction (PAEHR) and two (3.6%) demonstrated the *R. parkeri* antigen. From the analysis 558 ticks were identified as *Amblyomma sculptum* and 387 as *Amblyomma dubitatum*, in addition to nine larvae (*Amblyomma* spp.). Among these ticks, 231 underwent PCR, resulting in a nymph and an adult female of *A. dubitatum* positive for the pathogens of the genus. The results suggest a greater representation of *R. bellii* in the populations of capybara of the region, which may be suppressing the manifestation of other bacterias of the genus *Rickettsia* spp., and characterizing the region as a non-endemic area for Brazilian spotted fever (FMB). The rate of infection of ticks is minimal (0.86%).

Key words: 1. Spotted fever. 2. Family *Caviidae*. 3. Arthropod Vectors. 4. Rickettsiosis.

1. Introdução

A presença de grupos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) têm aumentado em várias áreas recreativas do Distrito Federal, como o Jardim Zoológico de Brasília e as margens do lago Paranoá. Comumente são relatados no meio jornalístico casos de infestações de carrapatos em pessoas que frequentam esses locais da região (DFTV, 2017; MEDEIROS, 2018). A manutenção das populações de carrapatos pode estar diretamente associada as capivaras, que são consideradas hospedeiros primários desses artrópodes (HORTA *et al.*, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004).

Patógenos da família *Rickettsiaceae* (ordem das Rickettsiales), são bactérias gram-negativas, intracelulares obrigatórios, cuja transmissão envolve interação com vetores artrópodes (DARBY *et al.*, 2007). Nessa família, o grupo da febre maculosa (GFM) inclui bactérias patogênicas com potencial zoonótico como a *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, que podem ser causadoras da Febre Maculosa Brasileira (FMB) e da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (PACHECO *et al.*, 2007).

No Brasil, as capivaras vêm sendo caracterizadas como reservatórios naturais para *R. rickettsii* (COSTA *et al.*, 2019). Áreas endêmicas para febre maculosa no estado de São Paulo coincidem com áreas onde há um aumento explosivo de capivaras de vida livre (SOUSA *et al.*, 2017). Dessa forma, o monitoramento sanitário das populações de capivaras é imprescindível para o controle e manutenção da saúde pública.

De acordo com o Ministério da Saúde, entre os anos de 2000 e 2019, só foram notificados três casos e nenhum óbito por febre maculosa no Distrito Federal, o que configura a região como área não endêmica para a doença. No entanto, ainda não foram publicados estudos de pesquisa de patógenos do gênero *Rickettsia* em capivaras e carrapatos da região.

Tendo em vista todos esses fatores, o presente trabalho teve por objetivos realizar colheita de amostras de sangue total e carrapatos de capivaras de vida livre da região do Distrito Federal, com o intuito de pesquisar patógenos do gênero *Rickettsia* a partir de métodos de diagnóstico moleculares e sorológicos.

2. Materiais e Métodos

Captura e colheita de amostras biológicas

O manejo dos animais foi realizado de acordo com a licença do SISBIO de número 43798-1, e com a aprovação do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade de Brasília registrado com o protocolo de nº 20/2019 (Anexo D).

Foram capturadas capivaras provenientes das áreas alagadas da Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Figura 1); do Campo Experimental Fazenda Sucupira, pertencente à Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Figura 2), e do lago Paranoá (Figura 3). Os animais foram condicionados por meio de ceva, com fornecimento de frutas, grãos e folhagens, a entrar em bretes onde eram submetidos à sedação e contenção física para o manejo de colheita de amostras biológicas (Figura 4).

O protocolo de contenção química foi realizado por via intramuscular com o uso de dardos anestésicos, a partir da associação de xilazina (0,5 mg/kg) e cetamina (2,0 mg/kg). Após as colheitas, era aplicada uma dose de ioimbina (0,1 mg/kg), antagonista seletiva de receptores alfa adrenérgicos, com o intuito de reverter a ação da xilazina aplicada e reduzir o tempo de recuperação anestésica. Para minimizar o risco de acidentes, os animais foram manejados individualmente, monitorados e liberados somente após a total recuperação de qualquer efeito provocado pelo fármaco dissociativo.

As amostras de sangue foram colhidas por punção da veia cefálica ou femoral (Figura 5), acondicionadas em tubos secos e com anticoagulante (EDTA) e mantidas resfriadas entre 04 e 08 °C até o transporte para o laboratório. Amostras de sangue total com EDTA e soro sanguíneo foram congeladas a -20°C para posterior extração do DNA para PCR e realização de imunoenaios.

Foram retirados carrapatos diretamente do tecido cutâneo das capivaras por um período cronometrado de cinco minutos por animal. Os carrapatos foram armazenados em álcool isopropílico, para assepsia e conservação, até a identificação das espécies e extração de DNA.

Hematologia e Exames Bioquímicos

Os hemogramas e exames bioquímicos foram realizados no Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Brasília – UnB, em até no máximo duas horas após o manejo de colheita.

Para a realização do hemograma, o número de eritrócitos (/ μ L) e leucócitos (/ μ L) foi determinado por contagem manual em hemocitômetro (câmara de Neubauer). As amostras de

sangue total foram diluídas em líquido de Hayem na proporção de 1:200 para a contagem de eritrócitos e, para os leucócitos, foi utilizado como diluente o líquido de Turk, na proporção de 1:20. A concentração de hemoglobina foi medida no espectrofotômetro semi-automático Bioplus 200, após diluição da amostra em líquido de Drabkin, respeitando um tempo de cinco minutos antecedente à leitura para a completa lise dos eritrócitos (WEISER, 2012).

O volume globular (VG) foi determinado pela técnica de microhematócrito, a partir da centrifugação a 10.000 rpm, em tubo capilar preenchido com sangue total durante cinco minutos, e posterior leitura em tabela graduada. A quantidade de proteínas plasmáticas totais (PPT) foi determinada, utilizando o mesmo tubo capilar, a partir da técnica de refratometria. Os valores do volume corpuscular médio (VCM) e concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por cálculo padrão. Foram preparados esfregaços de sangue total, corados com panótico rápido (*Laborclin®*), para a realização do diferencial leucocitário, observação morfológica das células sanguíneas, pesquisa de hemoparasitas e estimativa manual de plaquetas. A estimativa de plaquetas foi realizada a partir do número total de plaquetas visualizadas em 10 campos na objetiva de imersão (100x) e cálculo da fórmula $x = 2.000 \cdot y$, onde y é o número obtido da contagem das plaquetas (NOSANCHUK *et al.*, 1978; WEISER, 2012).

O soro sanguíneo foi obtido por meio de centrifugação das amostras sem EDTA, e utilizado para a determinação das concentrações séricas das proteínas totais, albumina, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gamma-glutamyltransferase (GGT), ureia, creatinina e fosfatase alcalina (FA), com a utilização de *kits* bioquímicos específicos e leitura em um analisador bioquímico automático Cobas – C111 (Roche).

Ensaio moleculares

Os exames de reação de polimerase em cadeia (PCR) foram realizados no laboratório de Microbiologia e Patologia Molecular da Faculdade de Medicina Veterinária (FAV) da Universidade de Brasília - UnB.

O DNA das amostras de sangue foi extraído com a utilização do *Kit Illustra Blood Genomicprep (GE Health Care®)* de acordo com as orientações do fabricante. As amostras de DNA extraído foram posteriormente armazenadas a -20°C até o momento da realização da reação em cadeia da polimerase (PCR).

O DNA dos carrapatos foi extraído por meio do protocolo proposto por SANGIONI *et al.*, (2005) (Anexo E) com a utilização de isotiocianato de guanidina e fenol clorofórmio, e posteriormente armazenado à -20°C até a realização dos ensaios de PCR.

Todas amostras de DNA extraído de sangue total foram submetidas à PCR para confirmação do gene que codifica a enzima GAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), para a avaliação da integridade do DNA extraído e ausência de inibidores da PCR, utilizando os oligonucleotídeos apresentados na tabela 1 (BIRKENHEUER *et al.*, 2017). Para cada amostra foi preparada uma mistura de 25 µL contendo: 1,0 µmol/ µL de cada oligonucleotídeo (10pmol); tampão 1 X da *Taq* polimerase (*Invitrogen*®); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (*Invitrogen*®); 1 U de *Taq* polimerase (*Invitrogen*®); e cerca de 2,0 ng de DNA extraído. Os ensaios de PCR foram realizados seguindo o seguinte protocolo no termociclador: 1 ciclo de desnaturação inicial (5 min, 95 °C); seguido por 40 ciclos de desnaturação (1 min, 95 °C), anelamento (1 min, 53°C) e extensão (1 min, 72°C) e; um ciclo de extensão final (5 min, 72°C).

Todas amostras extraídas de carrapatos foram submetidas à PCR para confirmação do gene mitocondrial 16S rRNA específico para carrapatos, a partir da utilização dos oligonucleotídeos TK-F/TK-R, demonstrados na tabela 1 (HALOS *et al.*, 2004). Nesse caso, para cada amostra foi preparada uma mistura de 25 µL contendo: 1,0 µmol/ µL de cada oligonucleotídeo (10pmol); tampão 1 X da *Taq* polimerase (*Invitrogen*®); 1,0 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (*Invitrogen*®); 1 U de *Taq* polimerase (*Invitrogen*®); e 2,0 ng de DNA extraído. Esses ensaios de PCR foram realizados seguindo o protocolo proposto pelo mesmo autor: 1 ciclo de desnaturação (8 min, 94°C); seguido por 10 ciclos de desnaturação (1 min, 92°C), anelamento (1 min, 48°C) e extensão (1 min 30s, 72°C). E 32 ciclos de desnaturação (1 min, 92°C), anelamento (1 min, 54°C), extensão (1 min 30s, 72°C) e; um passo final de extensão (10 min, 72°C).

Após os ensaios de PCR para confirmação da qualidade das extrações, todas as amostras de DNA, tanto oriundas de tecido sanguíneo quanto dos artrópodes, foram submetidas à testes moleculares por ensaios de PCR em duplicata utilizando os oligonucleotídeos CS-62/CS-462 para a pesquisa de *Rickettsia* spp. também descritos na tabela 1 (LABRUNA *et al.*, 2004). Para cada amostra foi preparada uma mistura de 25 µL contendo: 1,0 µmol/ µL de cada oligonucleotídeo (10pmol); tampão 1 X da *Taq* polimerase (*Invitrogen*®); 0,75 mM de MgCl₂; 0,2 mM de dNTP (*Invitrogen*®); 1 U de *Taq* polimerase (*Invitrogen*®); e 2,0 ng de DNA extraído. Esses ensaios de PCR foram realizados seguindo o seguinte protocolo no termociclador: 1 ciclo de desnaturação (5 min, 94 °C); seguido por 40 ciclos de desnaturação

(1 min, 94 °C), anelamento (1 min, 56°C) e extensão (1 min, 72°C) e; um ciclo de extensão final (5 min, 72°C).

Tabela 1. Informações relacionadas aos oligonucleotídeos utilizados durante os processos de validação das extrações de DNA e pesquisa de *Rickettsia* spp.

Gene	Sequência dos Oligonucleotídeos ('5-3')	Especificidade	PB	Referências
m16SrRNA	TK-F 5' CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC GG 3' TK-R 5' ACG CTG TTA TCC CTA GAG 3'	Carrapatos	320	(HALOS <i>et al.</i> , 2004)
gltA	CS-62 5' GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT 3' CS-462 5' CTT CCT TAA AAT TCA ATA AAT CAG GAT G 3'	<i>Rickettsia</i> spp.	401	(LABRUNA <i>et al.</i> , 2004)
mRNA	GAPDH-F 5' CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T 3' GAPDH-R 5' CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC 3'	Mamíferos	400	(BIRKENHEUER <i>et al.</i> , 2017).

Todas as reações de PCR foram realizadas no termociclador *Biorad MyCycler™ Thermal Cycler* (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corados em brometo de etídio (*Vetec Sigma-Aldrich®*, St Louis, MO) e visualizados em transiluminador ultravioleta (*UV transiluminator®*, UVP LLC, Upland, 32 CA).

As amostras positivas na PCR foram purificadas, com a utilização do *Kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel©), de acordo com as recomendações do fabricante, e enviadas para sequenciamento genético. O sequenciamento foi realizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da UNESP em Jaboticabal, por método de Sanger, em sequenciador automático com 96 capilares *ABI 3730 XL DNA Analyzer* (Applied Biosystems, Foster City, California (CA)).

Ensaio sorológicos

Os ensaios sorológicos consistiram na realização de imunofluorescência indireta (RIFI) foram realizados no Departamento de Medicina Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo - USP.

As amostras de soro sanguíneo das capivaras foram separadas por centrifugação e armazenadas à - 20°C até a realização dos ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI). Para os ensaios, foram utilizadas lâminas fixadas com o antígeno de cinco espécies de *Rickettsia*, sendo elas (1) *Rickettsia rickettsii*, (2) *R. bellii*, (3) *R. parkeri*, (4) *R. amblyommatis* e (5) *R.*

rhipicephali. Além das amostras de soro das capivaras do estudo, em cada lâmina foram impregnados um controle negativo e um positivo a partir de amostras reativas e não reativas de capivaras previamente testadas. As lâminas foram incubadas com isotiocianato de fluoresceína ligado à anti-IgG de capivara, o qual foi produzido no Centro de Controle de Zoonoses do estado de São Paulo. Foram determinadas as reações finais de titulação em cada uma das espécies de *Rickettsia* testadas para cada uma das amostras de soro. O antígeno para a espécie testada que demonstrou títulos de anticorpos quatro vezes maior que a titulação dos demais antígenos foi considerado o possível antígeno envolvido em reação homóloga. O ponto de corte para as diluições foi de 1:64.

Identificação dos carrapatos

Os carrapatos foram identificados por espécie, sexo e estágio de desenvolvimento, separados em larvas, ninfas, machos adultos e fêmeas adultas. A espécie foi classificada de acordo com a literatura (BATTESTI *et al.*, 2006). As larvas foram todas consideradas como *Amblyomma* spp.

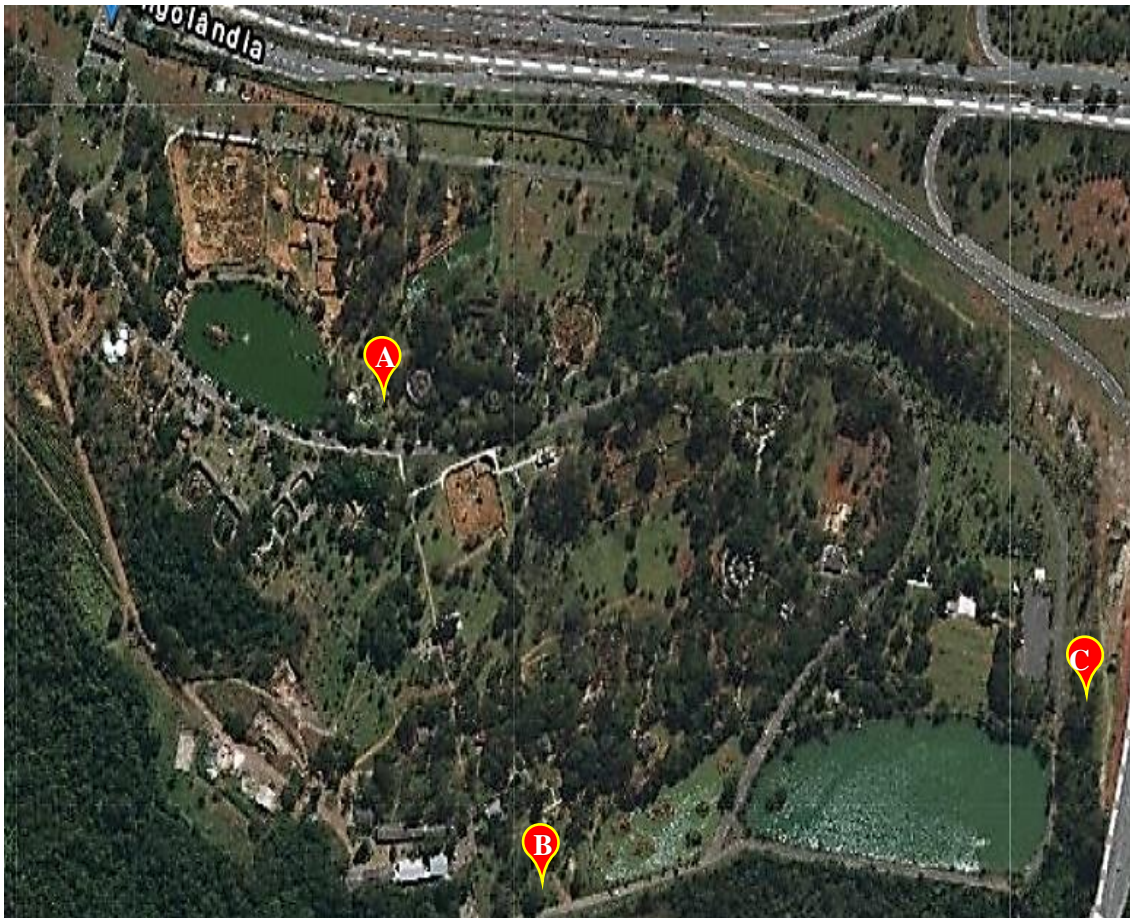


Figura 1. Georreferenciamento dos pontos de coleta localizados na Fundação Zoológica de Brasília Ponto A: Lat:15° 50' 48" S, Long: 047° 56' 27" W; Ponto B: Lat:15° 51' 03" S, Lon: 047° 56' 17" W e Ponto C: Lat:15° 51' 00" S, Long: 047° 55' 57" W. Disponível em: <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020

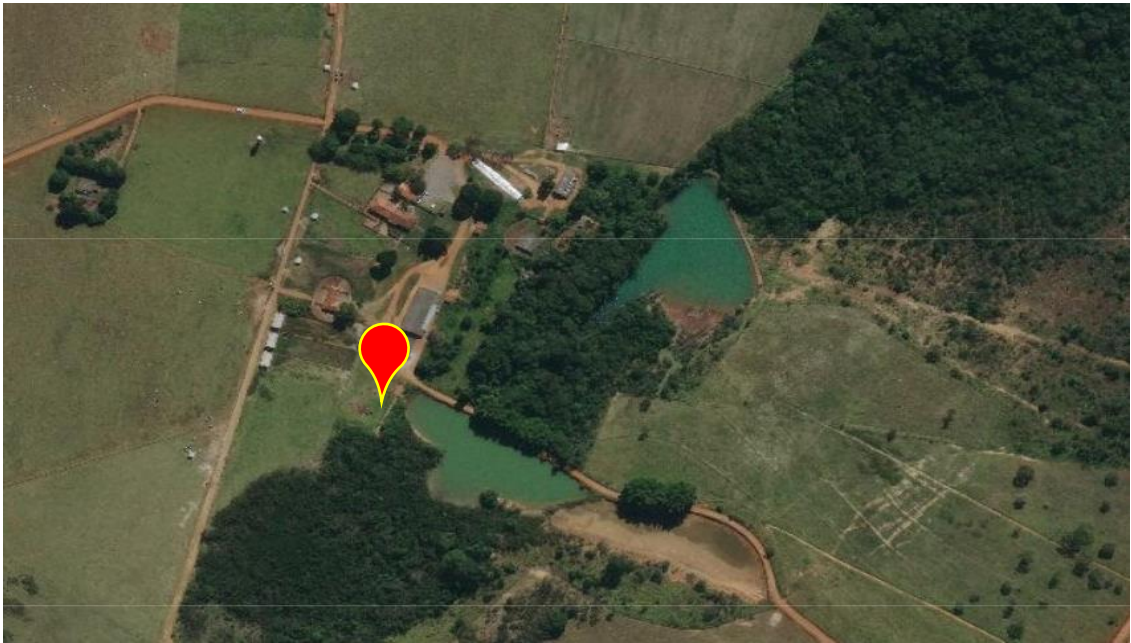


Figura 2. Georreferenciamento do ponto de coleta do Campo Experimental Fazenda Sucupira. Lat:15° 55' 31" S, Lon:048° 02' 59" W. Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020



Figura 3. Georreferenciamento do ponto de coleta da região do Lago Paranoá. Lat:15° 47' 30" S, Long: 047° 47' 49" W. Disponível em <https://earthexplorer.usgs.gov/>. Acessado em 28/01/2020



Figura 4. Capivaras contidas em brete a partir de condicionamento por meio de ceva.



Figura 5. Colheita de amostras de sangue em capivara por punção da veia femoral.

3. Resultados

Foram capturadas 57 capivaras de vida livre para a colheita das amostras biológicas, sendo 15 machos (13 adultos e dois jovens) e 42 fêmeas (35 adultas e sete jovens).

Considerando as regiões amostradas, foram capturadas na região do lago Paranoá, 15 fêmeas adultas, na Fazenda Sucupira, duas fêmeas adultas e no Jardim Zoológico, 40 animais (15 machos e 25 fêmeas).

Os ensaios de PCR, utilizando os oligonucleotídeos CS-62 e CS-462, para a pesquisa de bactérias do gênero *Rickettsia*, não amplificaram nenhum fragmento de DNA nas 57 amostras de DNA genômico extraídas do tecido sanguíneo das capivaras. Portanto, foi descartada a possibilidade de Rickettsemia nos animais amostrados.

Entre as amostras de soro colhidas, duas foram insuficientes para a realização dos imunoenaios. Das 55 amostras testadas em ensaio de imunofluorescência indireta (RIFI), 53 (96,3%) apresentaram soro-reação para *Rickettsia* spp. Vinte e duas amostras (40%) demonstraram o antígeno de *R. bellii* como provável antígeno envolvido em reação homóloga (PAERH), com titulação no mínimo quatro vezes superior aos antígenos das demais espécies testadas. Duas amostras (3,6%) demonstraram o antígeno de *R. parkeri* como PAERH (Figura 6/ Tabela 2).

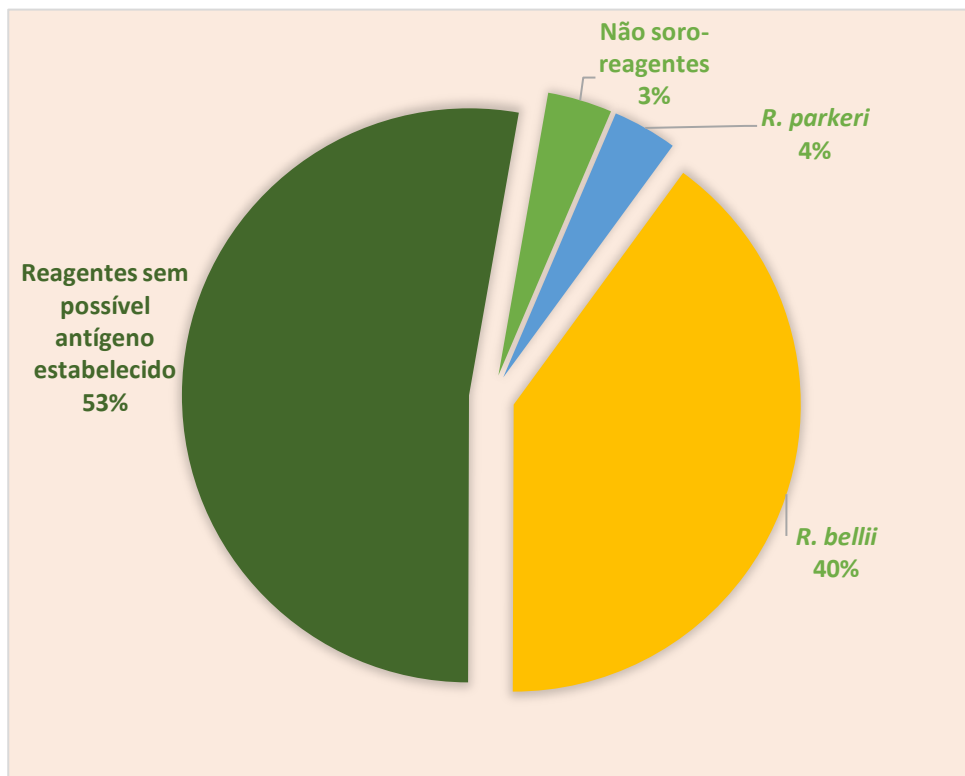


Figura 6. Resultados, em porcentagem, das análises de imunoenensaio das amostras sorológicas de capivaras para antígenos de *Rickettsia* spp. de acordo com o possível antígeno envolvido em reação homóloga (PAERH).

Tabela 2. Resultados das análises de imunoenensaio das amostras sorológicas de capivaras para antígenos de *Rickettsia* spp.

Capivara			Ponto final de titulação para as respectivas <i>Rickettsia</i> spp.					PAERH
Nº	Idade	Sexo	<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. amblyommatis</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. bellii</i>	
1	Adulto	Fêmea	<64	128	<64	64	128	?
2	Adulto	Fêmea	256	256	256	512	256	?
3	Adulto	Fêmea	<64	64	<64	64	256	<i>R. bellii</i>
4	Adulto	Fêmea	<64	64	<64	64	256	<i>R. bellii</i>
5	Adulto	Fêmea	128	128	128	256	512	?
6	Adulto	Fêmea	<64	128	64	128	256	?
7	Adulto	Fêmea	64	64	64	64	128	?
8	Adulto	Fêmea	128	<64	64	128	256	?
9	Adulto	Fêmea	<64	128	64	<64	128	?
10	Adulto	Macho	<64	128	64	<64	256	?
11	Adulto	Fêmea	<64	64	64	<64	256	<i>R. bellii</i>
12	Adulto	Fêmea	<64	128	64	128	512	<i>R. bellii</i>
13	Adulto	Macho	<64	<64	64	64	512	<i>R. bellii</i>
14	Jovem	Fêmea	<64	<64	<64	64	128	?
15	Jovem	Fêmea	<64	<64	<64	64	256	<i>R. bellii</i>
16	Adulto	Macho	128	<64	<64	64	512	<i>R. bellii</i>
17	Jovem	Fêmea	128	<64	<64	<64	512	<i>R. bellii</i>
18	Jovem	Macho	64	<64	<64	128	512	<i>R. bellii</i>
19	Jovem	Fêmea	128	<64	<64	128	512	<i>R. bellii</i>
20	Jovem	Macho	64	<64	<64	64	512	<i>R. bellii</i>
21	Adulto	Macho	64	<64	<64	128	256	?
22	Jovem	Fêmea	<64	<64	<64	<64	128	<i>R. bellii</i>
23	Jovem	Fêmea	256	<64	<64	128	256	?
24	Adulto	Macho	64	128	<64	128	128	?
25	Adulto	Fêmea	<64	<64	<64	<64	256	<i>R. bellii</i>
26	Adulto	Fêmea	<64	<64	<64	<64	128	<i>R. bellii</i>
27	Adulto	Macho	<64	<64	<64	<64	256	<i>R. bellii</i>
28	Adulto	Fêmea	<64	<64	<64	<64	<64	-
29	Adulto	Fêmea	<64	<64	<64	<64	<64	-
30	Jovem	Fêmea	<64	<64	<64	<64	64	<i>R. bellii</i>
31	Adulto	Fêmea	<64	64	<64	<64	128	?
32	Adulto	Macho	<64	<64	<64	<64	128	<i>R. bellii</i>
33	Adulto	Fêmea	<64	<64	<64	64	64	?
34	Adulto	Macho	<64	<64	<64	64	64	?
35	Adulto	Macho	<64	64	<64	<64	128	?
36	Adulto	Fêmea	<64	<64	<64	<64	128	<i>R. bellii</i>
37	Adulto	Fêmea	64	<64	<64	<64	512	<i>R. bellii</i>
38	Adulto	Macho	64	<64	<64	<64	128	?
39	Adulto	Macho	64	<64	<64	<64	128	?
40	Adulto	Fêmea	<64	128	<64	<64	256	?
41	Adulto	Macho	<64	64	<64	<64	256	<i>R. bellii</i>
42	Adulto	Fêmea	128	128	<64	64	256	?
43	Adulto	Fêmea	<64	256	<64	<64	128	?
44	Adulto	Fêmea	64	512	<64	<64	512	?
45	Adulto	Fêmea	64	256	128	<64	64	?
46	Adulto	Fêmea	64	<64	<64	<64	256	<i>R. bellii</i>
47	Adulto	Fêmea	128	128	<64	64	256	?
48	Adulto	Fêmea	<64	<64	<64	<64	64	<i>R. bellii</i>
49	Adulto	Fêmea	128	128	64	<64	128	?
50	Adulto	Fêmea	128	256	64	<64	256	?
51	Adulto	Fêmea	64	128	<64	64	256	?
52	Adulto	Fêmea	<64	512	<64	<64	128	<i>R. parkeri</i>
53	Adulto	Fêmea	64	512	128	64	128	<i>R. parkeri</i>
54	Adulto	Fêmea	<64	64	<64	<64	64	?
55	Adulto	Fêmea	128	64	<64	128	128	?

PAERH: Provável Antígeno Envolvido em Reação Homóloga.

(?): Não foi possível estabelecer um provável antígeno.

(-): Não apresentaram soro-reação para nenhum antígeno.

Os resultados dos hemogramas e dos exames bioquímicos realizados estão dispostos nas tabelas 3 e 4. As comparações dos resultados das amostras não soro-reagentes em relação às que apresentaram PAERH para *R. bellii* e *R. parkeri* nos ensaios sorológicos estão expressas nas tabelas 5 e 6. Não foram encontradas inclusões intracitoplasmáticas características de hemoparasitoses em nenhum esfregaço sanguíneo.

Tabela 3. Valores obtidos em eritrograma, valores absolutos de leucograma e plaquetas de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.

	Média ± Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Eritrograma				
Volume globular (%)	37,9 ± 3,1	30	44	38
Hemoglobina (g/dl)	11,85 ± 2,7	7,0	18,9	11,5
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	3,0 ± 0,8	1,8	6,8	2,8
VCM (fl)	131,4 ± 29,0	54,1	202,0	133,6
CHCM (g/dl)	31,3 ± 6,7	16,6	50,8	30,8
Leucograma				
Leucócitos totais (x 10 ³ /μL)	7128 ± 2233	2400	13900	6825
Basófilos (x 10 ³ /μL)	12,54 ± 38,55	0	192	0
Monócitos (x 10 ³ /μL)	854,8 ± 480,7	82	2349	817,5
Eosinófilos (x 10 ³ /μL)	1066 ± 598,5	0	2500	907,5
Linfócitos (x 10 ³ /μL)	1913 ± 974,9	81	4859	1852
Segmentados (x 10 ³ /μL)	3262 ± 1583	1342	10147	2865
Plaquetas (x10³/μL)	201 ± 58	96	324	191

VCM: Volume Corpuscular Médio;
CHCM: Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela 4. Valores obtidos na bioquímica sérica de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de vida livre do Distrito Federal.

	Média ± Desvio Padrão	Valor mínimo	Valor máximo	Mediana
Bioquímicos				
Alanina aminotransferase – ALT (UI/L)	54,9 ± 23,5	13	99	57
Aspartato aminotransferase - AST (UI/L)	42,8 ± 22,5	17	143	36
Gamma-glutamilttransferase – GGT (UI/L)	0,7 ± 1,0	0	3	0
Fosfatase alcalina – FA (UI/L)	143,5 ± 99,2	33	418	110
Ureia (mg/dl)	35,1 ± 29,5	14	237	31
Creatinina (mg/dl)	1,4 ± 0,3	0,8	3,2	1,4
Proteína total (g/dl)	6,0 ± 0,7	4,3	7,8	6,0
Albumina (g/dl)	2,7 ± 0,6	1,4	4,1	2,9
Globulina (g/dl)	3,2 ± 0,6	2,1	4,9	3,3

Tabela 5. Comparação dos resultados obtidos nos hemogramas das capivaras de acordo com soro-reação e PAERH nos ensaios sorológicos.

	Resultados de acordo com soro-reação e PAERH (Média ± Desvio Padrão)		
	<i>R. bellii</i> (22)	<i>R. parkeri</i> (02)	Não soro-reagentes (02)
Eritrograma			
Volume globular (%)	37,5 ± 4,8	36,5 ± 0,7	40,0 ± 0,0
Hemoglobina (g/dl)	11,93 ± 2,8	9,15 ± 0,7	10,6 ± 1,1
Eritrócitos (x 10 ⁶ /µL)	3,0 ± 0,9	3,5 ± 0,3	2,5 ± 0,0
VCM (fl)	131,2 ± 29,34	103,8 ± 11,34	160,7 ± 3,6
CHCM (g/dl)	31,75 ± 6,8	25,9 ± 2,6	26,5 ± 2,8
Leucograma			
Leucócitos totais (x 10 ³ /µL)	6883 ± 2227	9700 ± 2263	8750 ± 3536
Basófilos (x 10 ³ /µL)	13, 2 ± 39,5	0	0
Monócitos (x 10 ³ /µL)	805,6 ± 491	1277 ± 431,3	1223 ± 74,2
Eosinófilos (x 10 ³ /µL)	1011 ± 582,1	1819 ± 624,4	1430 ± 622,3
Linfócitos (x 10 ³ /µL)	1800 ± 900	3523 ± 1889	2713 ± 109,6
Segmentados (x 10 ³ /µL)	3183 ± 1510	3082 ± 682,4	3385 ± 940
Plaquetas (x10³ / µL)	202 ± 59	188 ± 45	212 ± 70

VCM: Volume Corpuscular Médio;
CHCM: Hemoglobina Corpuscular Média.

Tabela 6. Comparação dos resultados obtidos em exames bioquímicos de acordo com soro-reação e PAERH nos ensaios sorológicos.

	Resultados de acordo com soro-reação e PAERH (Média ± Desvio Padrão)		
	<i>R. bellii</i> (22)	<i>R. parkeri</i> (02)	Não soro-reagentes (02)
Bioquímicos			
Alanina aminotransferase – ALT (UI/L)	55,8 ± 24,55	39,0 ± 18,38	62,0 ± 11,31
Aspartato aminotransferase - AST (UI/L)	40, 9 ± 20,5	52,0 ± 22,6	40,0 ± 4,2
Gamma-glutamilttransferase – GGT (UI/L)	0,7 ± 0,9	0	0
Fosfatase alcalina – FA (UI/L)	139, 8 ± 93, 7	82, 5 ± 12, 0	347,0 ± 100, 0
Ureia (mg/dl)	32, 3 ± 11, 8	22, 5 ± 2, 1	25, 0 ± 2,8
Creatinina (mg/dl)	1,4 ± 0,4	1,5 ± 0,2	1,2 ± 0,0
Proteína total (g/dl)	6,0 ± 0,7	5,4 ± 0,0	5,8 ± 0,0
Albumina (g/dl)	2,7 ± 0,6	2,1 ± 0,0	3,1 ± 0,2
Globulina (g/dl)	3,2 ± 0,6	3,3 ± 0,0	2,7 ± 0,2

Foram retirados um total de 558 carrapatos do tecido cutâneo das capivaras infectadas. Sendo 162 (89 machos, 34 fêmeas e 39 ninfas) identificados como *Amblyomma sculptum*, e 387 (176 machos, 46 fêmeas e 165 ninfas) como *Amblyomma dubitatum*. Também foram colhidas nove larvas, identificadas como *Amblyomma* spp. (Tabela 7/ Figura 7).

Tabela 7. Quantidade de carrapatos total nas capivaras e utilizados nos ensaios de PCR de acordo com estágio, sexo e classificação taxonômica.

Sexo / Estágio	Identificação Taxonômica					
	<i>Amblyomma sculptum</i>		<i>Amblyomma dubitatum</i>		<i>Amblyomma</i> spp.	
	Total	PCR	Total	PCR	Total	PCR
Larvas					9	1
Ninfas	39	12	165	46		
Machos Adultos	89	77	176	33		
Fêmeas Adultas	34	33	46	29		
Total	162	122	387	108	9	1

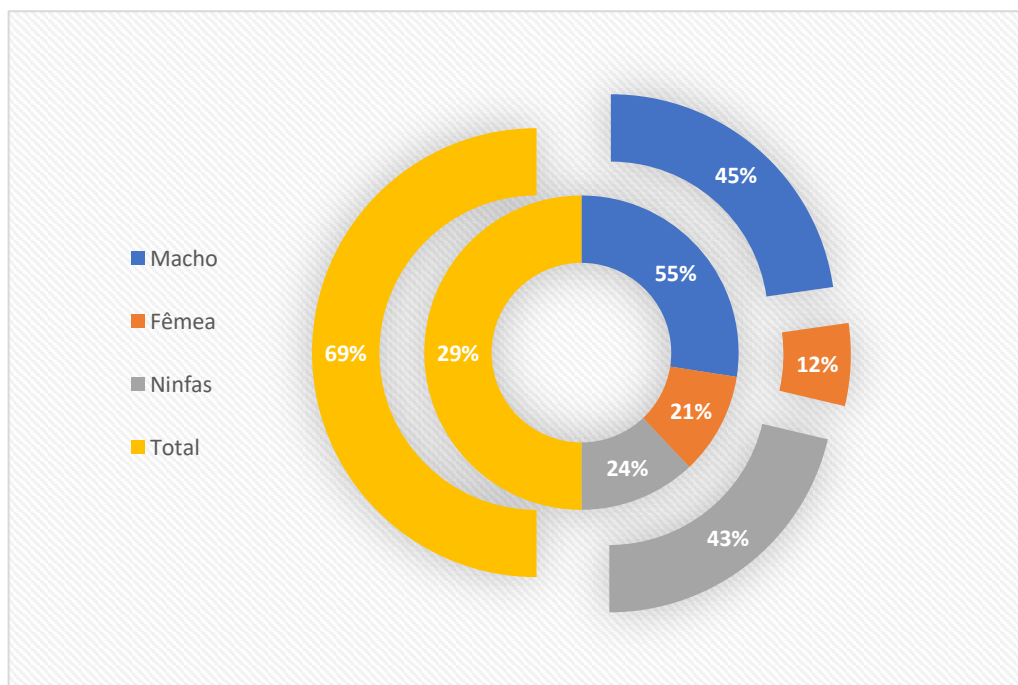


Figura 7. Relação em porcentagem da quantidade de carrapatos identificados por espécie, sexo e estágio de desenvolvimento.

Arco externo: *Amblyomma dubitatum*

Arco interno: *Amblyomma sculptum*

Entre os carrapatos amostrados, 231 (entre quatro e cinco por capivara) foram submetidos à extração de DNA e posterior ensaio de PCR (Tabela 7), com os oligonucleotídeos CS-62 e CS-462 (Tabela 1), para a pesquisa de bactérias do gênero *Rickettsia*. Em dois carrapatos, a reação de PCR amplificou o fragmento de DNA, na altura esperada de 401 pares de base (Figura 8). Portanto, dois carrapatos foram considerados infectados por patógenos do gênero e, enviados ao sequenciamento genético para identificação da espécie. Esses resultados demonstram que os carrapatos apresentaram uma taxa mínima de infecção de 0,86% (2/231). Resultados preliminares das análises do sequenciamento genético demonstraram que as amostras positivas apresentam 99,9% de similaridade com sequencias depositadas no *genbank* para *R. parkeri*.

Os dois carrapatos infectados foram identificados como uma ninfa e uma fêmea da espécie *A. dubitatum* e pertenciam, cada um, à duas capivaras fêmeas adultas (n°43 e n°49), oriundas do ponto de colheita localizado próximo ao Lago Paranoá (Figura 3). Em nenhuma das duas capivaras foi possível estabelecer um provável antígeno (Tabela 2).

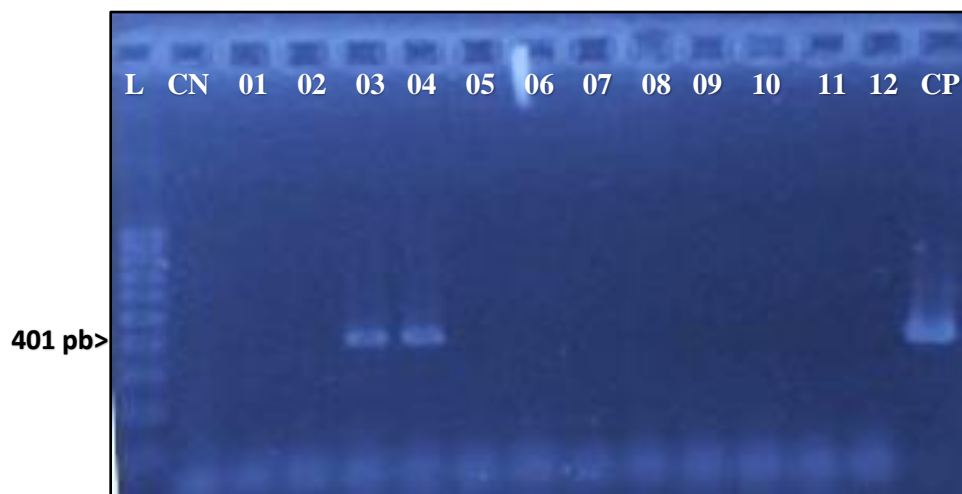


Figura 8. Resultados de PCR em gel de agarose a 2% para *Rickettsia* spp. em DNA extraído de carrapatos, utilizando os oligonucleotídeos CS-62/CS-462. Todas as amostras foram testadas em duplicata.

Poços 03 e 04: Fragmento de DNA amplificado em duplicata.

Poços 01, 02, 05, 06, 07, 08, 09, 10, 11 e 12: Amostras negativas na PCR.

L: Marcador de Peso Molecular de 100 pb (*Biorad*®)

CP: Controle Positivo

CN: Controle Negativo

*pb: pares de base

4. Discussão

De acordo com dados publicados pelo Ministério da Saúde (Anexos 1 e 2), entre os anos de 2000 e 2019, só foram notificados três casos e nenhum óbito de febre maculosa em seres humanos no Distrito Federal, o que configura a região como área não endêmica para a doença. No entanto, vários grupos de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) circulam livremente em áreas recreativas da capital do Brasil, como as regiões que circundam o lago Paranoá e a fundação Jardim Zoológico de Brasília, locais onde foram instalados os pontos de colheita de amostras biológicas para o presente estudo. Aliado a isso, todos os anos são reportados no meio jornalístico casos de infestações de carrapatos em crianças e adultos que frequentam esses locais. Esses casos vêm sendo diretamente associados a presença das capivaras e ainda não foram publicados trabalhos que relatam a situação sanitária dos animais da espécie na região (DFTV, 2017; MEDEIROS, 2018).

Os ensaios de PCR, com a utilização dos oligonucleotídeos CS-62 e CS-462, não amplificaram sequência de DNA rickettsial em nenhuma das amostras extraídas do sangue total colhido das capivaras. A detecção de *Rickettsia* spp em tecido sanguíneo de hospedeiros vertebrados é considerada rara pela literatura. Isto decorre do fato de que as rickettsias tem as células endoteliais como alvo primário e, após o primeiro contato com o hospedeiro, permanecem na circulação sanguínea por curtos períodos de tempo, migrando rapidamente para os tecidos, resultando em concentrações indetectáveis em ensaios moleculares a partir de amostras sanguíneas (LA SCOLA & RAOULT, 1997; HORTA *et al.*, 2007; LEVIN; SNELLGROVE; ZEMTSOVA, 2017).

Apesar de negativas na PCR, 96% das amostras das capivaras (Tabela 2) apresentaram soro-reação nos ensaios de imunofluorescência indireta (RIFI). Cabe salientar que todas as espécies de *Rickettsia* spp. compartilham antígenos de membrana em comum, que podem promover reação cruzada com anticorpos presentes no soro dos animais testados (LA SCOLA; RAOULT, 1997). Portanto, foi necessária a diluição em titulações mais altas para a detecção do possível antígeno envolvido na reação. Ainda em titulações mais altas, 53% das amostras apresentaram-se soro-reagentes para várias espécies do gênero *Rickettsia* (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. bellii*, *R. rhipicephali* e *R. amblyommatis*) impossibilitando a detecção do PAERH.

Nas amostras das capivaras em que foi possível a determinação do PAERH, os testes sorológicos apresentaram a *R. bellii* (40%) e *R. parkeri* (3,6%) como principais PAERH (Figura 6). Esses resultados foram compatíveis com o trabalho publicado por PACHECO *et al.* (2007), que demonstraram evidências sorológicas de *R. bellii* (68,5%) e *R. parkeri* (34,2%) em capivaras

de regiões não endêmicas de São Paulo. Além do diagnóstico em *A. dubitatum*, também já foram reportadas evidências sorológicas de bactérias das duas espécies encontradas em outras espécies de animais domésticos como cães e cavalos no estado de São Paulo (HORTA *et al.*, 2004; LABRUNA *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2007). Vale ressaltar que o presente trabalho é o primeiro relato de bactérias das espécies em capivaras da região do Distrito Federal.

A maior detecção (40%) de antígeno para *R. bellii* (Figura 6), pode determinar essa espécie como a provável bactéria do gênero com maior circulação nas populações da região do Distrito Federal. Em uma região endêmica de São Paulo, estudos sorológicos realizados em 10 capivaras demonstraram o antígeno para *R. rickettsii* como PAERH em 80% dos animais amostrados e nos outros 20%, não foi possível determinar a possível espécie envolvida (COSTA *et al.*, 2019). Apesar de apresentar uma população amostral consideravelmente menor, esses resultados divergiram do presente estudo, que não apresentou nenhuma amostra com PAERH para *R. rickettsii*, o que pode estar relacionado ao que configura o DF como área não endêmica para FMB.

Por outro lado, a *R. parkeri*, encontrada em 3,6% das capivaras amostradas na sorologia (Tabela 2/ Figura 6) e nos dois carrapatos positivos na PCR, pertence ao grupo da febre maculosa (GFM) e apresenta potencial patogênico para seres humanos (PADDOK *et al.*, 2004; VENZAL *et al.*, 2004). No entanto, ainda não foi relatado nenhum caso de óbito por infecção relacionada à essa espécie, a qual é caracterizada por manifestações clínicas moderadas em comparação as causadas pela *R. rickettsii* (PADDOCK, 2004; SILVEIRA *et al.*, 2007). Também não foram reportados casos de infecção patogênica por *R. parkeri* em humanos no Brasil (HORTA *et al.*, 2004; PACHECO *et al.*, 2007). Vale ressaltar que no diagnóstico de rotina para FMB em humanos, a maioria dos testes sorológicos vêm utilizando somente o antígeno para *R. rickettsii*, o que pode estar ocultando casos de infecção por *R. parkeri* ou outras espécies do gênero em humanos (SILVEIRA *et al.*, 2007).

Em virtude da ausência de valores hematológicos e bioquímicos de referência para a espécie *Hydrochoerus hydrochaeris* estabelecidos na literatura, optou-se por comparar os valores obtidos entre os animais soro-reagentes e não soro-reagentes. O baixo número de amostras que apresentaram PAERH para *R. parkeri* e aquelas não soro-reagentes (Tabela 2), impossibilitou a realização de uma análise estatística comparativa, porém aparentemente não foi observada diferença significativa entre os valores hematológicos e bioquímicos dos grupos de animais de acordo com a sorologia (Tabelas 5 e 6). As alterações laboratoriais características das Rickettsioses observadas em humanos e cobaias geralmente são inespecíficas, e podem se apresentar como anemia moderada, trombocitopenia e leucopenia suave, além de hiponatremia

e possíveis alterações de enzimas renais e hepáticas (PAROLA *et al.*, 2005). Vale ressaltar que a formação de anticorpos contra bactérias do gênero está diretamente associada ao contato prévio com os agentes em questão. Não é possível afirmar o momento em que a infecção foi instalada, nem se houve completa recuperação fisiológica nos animais. São necessários mais estudos que estabeleçam parâmetros de referência para a espécie.

Os dados sorológicos do presente estudo, com 40% da população de capivaras amostradas apresentando provável produção de anticorpos para *R. bellii* e 3,6% para *R. parkeri* (Tabela 2/ Figura 6), indicam o contato desses animais com vetores artrópodes que possivelmente transmitiram bactérias das duas espécies. Dois carrapatos foram positivos na PCR para pesquisa do gênero *Rickettsia*, com a utilização dos oligonucleotídeos CS-62 e CS-462, caracterizando uma taxa de infecção mínima de 0,86%. Ambos foram identificados como *A. dubitatum*, sendo uma ninfa e uma fêmea adulta. A determinação prévia da *R. parkeri* como espécie infectante desses artrópodes pode confirmar a espécie como circulante na população amostrada. Esse achado pode indicar a possibilidade de ocorrência de casos de febre maculosa em humanos na região de estudo, uma vez que a *R. parkeri* é considerada um agente patogênico do GFM (PADDOK *et al.*, 2004; VENZAL *et al.*, 2004).

A taxa de infecção mínima dos carrapatos de 0,86% para *R. parkeri* é compatível com as descritas na literatura para *R. rickettsii* em *A. sculptum* (de 0,05% a 1,28%). Nesses casos, as baixas taxas de infecção estão relacionadas a menor performance reprodutiva de fêmeas de *A. sculptum* infectadas por *R. rickettsii*, em comparação as fêmeas não infectadas, o que torna fundamental o papel do hospedeiro amplificador para a manutenção da bactéria nas populações (COSTA *et al.*, 2019). Os resultados dos testes sorológicos demonstrando amostras com PAERH para *R. parkeri*, associados aos achados de bactérias da mesma espécie em *A. dubitatum* podem definir a capivara como possível hospedeiro amplificador para *R. parkeri*. No entanto, são necessários maiores estudos que esclareçam a relação da *R. parkeri* com carrapatos da espécie *A. dubitatum*, bem como o papel desses artrópodes e das capivaras na manutenção da bactéria.

As espécies *A. sculptum* e *A. dubitatum* de carrapatos encontradas nos animais capturados no estudo, são compatíveis com artigos publicados por Labruna *et al.* (2007) e Brites-Neto (2018), que relatam coinfeção e caracterizam a capivara como hospedeiro primário de artrópodes das duas espécies. Ambos também podem eventualmente parasitar humanos e outras espécies de animais, o que contribui para a circulação de possíveis Rickettsioses em diferentes populações de espécies, incluindo os seres humanos (LABRUNA *et al.*, 2007; BRITES-NETO *et al.*, 2018^a).

A classificação taxonômica dos carrapatos colhidos no presente estudo identificou uma quantidade evidentemente maior de artrópodes da espécie *A. dubitatum* (69%) (Tabela 7/ Figura 7). Essa espécie já foi reportada em regiões do centro-oeste e vem sendo bastante associada a bactéria *R. bellii* (BRITES-NETO et al., 2018b; SAKAI et al., 2014; SANGIONI et al., 2005; SPONCHIADO et al., 2015). Pacheco et al., (2009) amostraram populações de *A. dubitatum* de 16 municípios de São Paulo e, dez municípios (62,5%) apresentaram carrapatos dessa espécie infectados por *R. bellii*, com uma taxa de infecção variando entre 6,1% a 44,9%. Outra pesquisa de patógenos do gênero *Rickettsia* em *A. dubitatum* relatou o diagnóstico de *R. bellii* em 40% e *R. parkeri* em 7,5% da população amostrada (LABRUNA et al., 2004). Apesar desses dados se apresentarem distintos à taxa de infecção de *R. parkeri* encontrada no presente estudo (0,86%), os resultados sorológicos, que demonstraram 40% das amostras com PAERH para *R. bellii* e 3,6% para *R. parkeri*, indicam o envolvimento dos carrapatos da espécie *A. dubitatum* na transmissão dessas bactérias.

A maior expressão de amostras soro-reagentes com PAERH para *R. bellii*, além das amostras positivas para *R. parkeri*, pode estar associada ao maior número de carrapatos da espécie *A. dubitatum* encontrado no presente trabalho. Diferente da *R. parkeri*, apesar de ser uma espécie associada a carrapatos, a *R. bellii* não apresenta características patogênicas (SANGIONI et al., 2005; SAKAI et al., 2014; BRITES-NETO et al., 2018b;). Na tentativa de avaliar o possível papel do *A. dubitatum* na manutenção da *R. rickettsii*, Sakai et al., (2014) realizaram infecções experimentais em carrapatos da espécie, naturalmente infectados por *R. bellii*, e avaliaram as possibilidades de transmissão transtadial e transovariana das bactérias. Somente 50% dos carrapatos infectados conseguiram perpetuar a transmissão transtadial da *R. rickettsii*.

Provavelmente, populações solitárias ou majoritárias de *A. dubitatum* podem ser incapazes de sustentar infecções de *R. rickettsii* por gerações consecutivas. Além disso, enquanto o processo de transmissão transovariana da mesma bactéria foi ineficiente em todos os carrapatos testados, 100% dos mesmos carrapatos desempenharam transmissão transovariana para *R. bellii*. Reforçando que a infecção primária de uma espécie de *Rickettsia* pode impossibilitar a transmissão transovariana de uma segunda espécie, o que suprime ou anula essa espécie da população de carrapatos (MACALUSO et al., 2002; SAKAI et al., 2014). A associação desses trabalhos com os resultados obtidos no presente estudo pode sugerir a supressão de bactérias da espécie *R. rickettsii* pela *R. bellii* nas populações do Distrito Federal.

No presente estudo, foi encontrada uma quantidade menor de carrapatos classificados como *A. sculptum* (29%) (Tabela 7/ Figura 7). A espécie *A. sculptum* está diretamente associada à

disseminação da *R. rickettsii*, bactéria causadora da febre maculosa, sendo considerado o principal vetor da bactéria no Brasil (BRITES-NETO *et al.*, 2018b; COSTA *et al.*, 2019). Estudos anteriores também sugerem que a ocorrência de outras espécies de *Rickettsia* em populações de *A. sculptum* podem suprimir de forma significativa as taxas de infecção dos carrapatos por *R. rickettsii* (SANGIONI *et al.*, 2005). Esses dados, associados às evidências sorológicas e à menor expressão de carrapatos da espécie, em relação a *A. dubitatum*, no presente trabalho também pode estar relacionado ao que configura o DF como área não endêmica para FMB. No entanto, os achados de *R. parkeri* em *A. dubitatum* também podem configurar essa espécie de carrapato como possível vetor para febre maculosa em humanos.

5. Conclusão

As capivaras no DF não apresentaram riquetsemia, mas 96,3% das amostras apresentaram titulações de anticorpos para o gênero *Rickettsia*, sem alterações laboratoriais. A maior parte demonstrou PAERH para *R. bellii* (40%) e duas (3,6%) para *R. parkeri*. A maioria dos carrapatos colhidos foram identificados como *A. dubitatum* (69%) e, dois carrapatos dessa espécie, foram positivos na PCR com sequenciamento revelando similaridade para *R. parkeri*, o que representou uma taxa de infecção mínima de 0,86%. A pesquisa sugere uma maior expressão da *R. bellii* nas populações de capivaras da região do Distrito-Federal. Apesar dos achados de *R. parkeri* apontarem a possibilidade de ocorrência de casos de febre maculosa em humanos, não há endemia de FMB no DF.

6. Referências

- BATTESTI, D. M. B.; BATTESTI, D. M. B.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. Butantan, 2006.
- BIRKENHEUER, A. J.; LEVY, M. G.; BREITSCHWERDT, E. B. **Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of Babesia gibsoni**. Journal of Clinical Microbiology, v. 41, p. 4172–4177, march, 2017.
- BRITES-NETO, J.; BRASIL, J.; TAKEDA, G. A. C. G.; GUILLEN, A. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A. **Diferenciação morfométrica entre larvas de *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 e *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899**. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, v. 70, n. 5, p. 1521–1528, 2018. ^a Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-9774>>. Acesso em: 1 fev. 2020.
- COSTA, F. B.; GERARDI, M.; BINDER, L. de C.; BENATTI, H. R.; SERPA, M. C. de A.; LOPES, B.; LUZ, H. R.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; LABRUNA, M. B. **Rickettsia rickettsii (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Infecting Amblyomma sculptum (Acari: Ixodidae) Ticks and Capybaras in a Brazilian Spotted Fever-Endemic Area of Brazil**. Journal of Medical Entomology, p. 1–4, 2019.
- DARBY, A. C.; CHO, N. H.; FUXELIUS, H. H.; WESTBERG, J.; ANDERSSON, S. G. E. **Intracellular pathogens go extreme: genome evolution in the Rickettsiales**. Trends in Genetics, v. 23, n. 10, p. 511–520, 2007.
- DFTV. **Secretaria de Saúde apura ‘ataque’ de carrapatos a visitantes do Zoo do DF**. G1, 2017. Disponível em: <<https://g1.globo.com/distrito-federal/noticia/secretaria-de-saude-apura-ataque-de-carrapatos-a-visitantes-do-zoo-do-df.ghtml>>. Acesso em: 02 fev. 2020.
- HALOS, L.; JAMAL, T.; VIAL, L.; MAILLARD, R.; SUAUA, A.; LE MENACH, A.; BOULOUIS, H.-J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. **Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks**. Veterinary Research, v. 35, p. 709–713, 2004.
- HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. **Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, n. 7, p. 793–801, 2007.
- HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S.

M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T. S.; WALKER, D. H. **Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: Serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, v. 71, n. 1, p. 93–97, 2004.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. **Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches to diagnosis of old and new Rickettsial diseases.** Journal of Clinical Microbiology, v. 35, n. 11, p. 2715–2727, 1997.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C.; SZABÓ, M. P. J. **Human parasitism by the capybara tick, *Amblyomma dubitatum* (ACARI: IXODIDAE).** Entomological News, v. 118, n. 1, p. 77–80, 2007.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. ***Rickettsia* Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo, Brazil, Where Brazilian Spotted Fever Is Endemic.** Journal of Clinical Microbiology, v. 42, n. 1, p. 90–98, 2004.

LEVIN, M. L.; SNELGROVE, A. N.; ZEMTSOVA, G. E. **Comparative value of blood and skin samples for diagnosis of spotted fever group rickettsial infection in model animals.** 2017. Ticks Tick-Borne Diseases, v.7, p. 1029-1034, 2016. Disponível em: <<http://www.criver.com>>. Acesso em: 2 fev. 2020.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. **Rickettsial Infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Inhibits Transovarial Transmission of a Second *Rickettsia*.** Journal of Medical Entomology, v. 39, n. 6, p. 809–813, 2002.

MEDEIROS, B. **Crianças vão ao Zoo do DF e voltam para casa infestadas de carrapatos.** Metrôpoles, 2018. Disponível em: <[https://www.metropoles.com/distrito-federal/criancas-vaoo-zoo-do-df-e-voltam-para-casa-infestadas-de-carrapatos](https://www.metropoles.com/distrito-federal/criancas-vaao-zoo-do-df-e-voltam-para-casa-infestadas-de-carrapatos)> . Acesso em: 02 fev.2020.

NOSANCHUK, J. S.; CHANG, J.; BENNETT, J. M. **The analytic basis for the use of platelet estimates from peripheral blood smears. Laboratory and clinical applications.** American Journal of Clinical Pathology, v. 69, n. 4, p. 383–387, 1978.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. **Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São**

Paulo Brazil: Serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. Biomedica, v. 27, n. 3, p. 364–371, 2007.

PACHECO R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; DE SOUZA, S. S. A. L.; DE SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. **Survey of *Rickettsia* spp in the ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in the State of São Paulo.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v. 42, n. 3, p. 351–353, 2009.

PADDOCK, C. D. ***Rickettsia parkeri*: A newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the united states.** Infectious Diseases in Clinical Practice, v. 12, n. 4, p. 261–262, 2004.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D. RAOULT, D. **Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts.** Clinical Microbiology Reviews, p. 719-756, Oct, 2005.

SAKAI, R. K.; COSTA, F. B.; UENO, T. E. H.; RAMIREZ, D. G.; SOARES, J. F.; FONSECA, A. H.; LABRUNA, M. B.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*.** Ticks and Tick-borne Diseases, v. 5, n. 6, p. 917–923, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.003>>

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

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

SOUSA, K. C. M.; CALCHI, A. C.; HERRERA, H. M.; DUMLER, J. S.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. **Anaplasmatocae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil.** Epidemiology and Infection, v. 145, n. 16, p. 3424–3437, 2017.

SPONCHIADO, J.; MELO, G. L.; MARTINS, T. F.; KRAWCZAK, F. S.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, N. C. **Association patterns of ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae, argasidae) of**

small mammals in cerrado fragments, western Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 65, n. 3, p. 389–401, 2015.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. *Emerging Infectious Diseases*, v. 10, n. 8, p. 1493–1495, 2004.

WEISER, G. Laboratory Technology for Veterinary Medicine. In: THRALL, M. A.; WISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. (Eds.). **Veterinary Hematology and Clinical Chemistry**. 2nd. ed: Wiley-Blackwell, 2012. p. 3–33.

ANEXOS

Anexo A – Casos confirmados de Febre Maculosa no Brasil.**Casos confirmados de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2019***

Fonte: Sinan - atualizado em 13/06/2019

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019*
Região Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	3	1	1
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0
Região Nordeste	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	2	3	2	4	0	2	2	1
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	3	2	3	0	1	2	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	41	25	20	54	76	90	62	57	58	78	77	104	90	77	107	124	99	119	183	14
Minas Gerais	23	9	10	9	24	11	18	13	11	9	10	13	7	14	11	16	20	33	72	2
Espírito Santo	2	0	0	13	11	0	0	3	1	0	4	7	5	4	3	5	6	6	0	0
Rio de Janeiro	0	1	1	2	0	24	7	10	7	8	5	13	4	4	22	14	12	16	7	1
São Paulo	16	15	9	30	41	55	37	31	39	61	58	71	74	55	71	89	61	64	104	11
Região Sul	0	0	0	6	8	39	22	33	27	41	27	28	41	35	56	26	23	39	49	20
Paraná	0	0	0	0	0	0	1	2	2	1	3	2	4	2	4	6	1	9	3	7
Santa Catarina	0	0	0	6	8	36	21	29	25	38	24	25	37	31	51	20	22	28	43	13
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	3	0	2	0	2	0	1	0	2	1	0	0	2	3	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	2	1	2	6	4	2	2	1
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	1	0	1	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0	1
Goiás	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	4	1	2	1	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Brasil	41	25	20	60	84	130	85	91	85	121	106	132	135	116	167	162	128	165	237	37

*Dados sujeitos à revisão

Anexo B – Óbitos confirmados febre maculosa no Brasil.

Óbitos de febre maculosa. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000-2019*

Fonte: Sinan - atualizado em 13/06/2019

*Dados sujeitos à revisão

Região e UF	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019*
Região Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rondônia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Acre	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amazonas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Roraima	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Amapá	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tocantins	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Nordeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Maranhão	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Piauí	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ceará	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Norte	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Paraíba	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Pernambuco	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Alagoas	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Sergipe	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Bahia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Sudeste	15	13	6	18	20	26	25	16	21	30	26	45	52	37	65	63	50	58	87	2
Minas Gerais	11	1	1	1	9	6	8	6	5	4	1	5	4	5	4	4	6	17	23	1
Espírito Santo	2	0	0	4	0	0	0	0	0	0	0	1	5	1	0	3	2	4	0	0
Rio de Janeiro	0	1	1	1	0	4	5	2	2	3	1	4	2	1	7	2	7	6	6	0
São Paulo	2	11	4	12	11	16	12	8	14	23	24	35	41	30	54	54	35	31	58	1
Região Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	0
Paraná	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	2	0	1	1	0
Santa Catarina	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Rio Grande do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Região Centro-Oeste	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Mato Grosso do Sul	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Mato Grosso	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Goias	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Distrito Federal	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Brasil	15	13	6	18	20	26	25	16	21	31	27	45	52	37	66	66	50	59	88	2

Anexo C- Diretrizes do IBAMA para controle de capivaras e FMB.

1. Introdução

O controle da capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) tem requerido o empenho do Ibama por tratar-se de espécie potencialmente causadora de dano agrícola e hospedeira primária dos carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum*, transmissores da Febre Maculosa Brasileira (FMB).

As duas espécies de carrapatos são os principais vetores da doença nos municípios do Estado de São Paulo mais afetados, localizados na região de Campinas e pertencentes às bacias hidrográficas dos rios Piracicaba, Capivari e Jundiá. Nestes municípios, percebe-se maior presença da capivara nas áreas urbanas, embora nenhum estudo tenha esclarecido, ainda, se esta situação resulta de fato de um crescimento populacional, ou de alterações no padrão de distribuição e abundância. Possivelmente as perturbações na dinâmica populacional da espécie estão relacionadas às fortes pressões antrópicas que resultaram em mudanças drásticas nas paisagens originais dessas bacias e no desaparecimento dos predadores naturais.

Quaisquer que sejam as razões para a maior ocorrência da capivara em áreas urbanas, esta situação proporciona um aumento do grau de exposição das comunidades humanas à Febre Maculosa. Embora não tenha sido totalmente esclarecido, ainda, se e como a capivara contribui para a manutenção da bactéria *Rickettsia rickettsii* no ambiente, seu papel de hospedeiro primário dos vetores justifica, em algumas situações, o desenvolvimento de medidas voltadas à redução dos seus níveis populacionais.

Durante os anos de 2005 e 2006, diversos encontros foram mantidos entre o Ibama SP e a SUCEN de Campinas para a definição de diretrizes de combate à Febre Maculosa. Nestas oportunidades, o Ibama contribuiu esclarecendo os aspectos técnicos relacionados ao manejo da capivara.

Nos encontros, ressaltou-se a importância do tratamento inter-setorial e interinstitucional da Febre Maculosa dada a multiplicidade de fatores que concorrem para a sua manifestação e, portanto, das possibilidades de ação para a prevenção e o controle, todas igualmente importantes. Estas ações devem englobar, além do controle da capivara:

- o controle das condições ambientais que favorecem a proliferação dos vetores;
- o controle sanitário dos outros hospedeiros com igual importância na difusão de carrapatos, particularmente os equídeos e os canídeos;
- o esclarecimento da população sobre a doença;
- a capacitação dos centros de saúde para o tratamento tempestivo da doença;
- o aumento dos conhecimentos sobre os aspectos ainda não esclarecidos do ciclo da FMB.

A redução dos níveis populacionais da capivara deverá ser inserida, portanto, no contexto mais amplo do combate à FMB, aliada a todas as outras medidas necessárias à prevenção e controle da doença.

As diretrizes ora propostas se pautam nas decisões tomadas na reunião realizada em 22/03/06 no CAO - UMA do Ministério Público Estadual de São Paulo e incorporam o “*Plano de ações para o controle da Febre Maculosa Brasileira em áreas com presença de capivaras*”, proposto pela Superintendência Estadual de Controle de Endemias - SUCEN. As diretrizes apontam para ações diferenciadas nas áreas de alerta e de risco da FMB, de maneira a atender às particularidades de cada situação e à legislação ambiental que versa sobre o tema.

2. Aspectos biológicos e ecológicos da capivara

A capivara é um grande roedor, típico da fauna tropical. Grandes grupos de capivaras ocorrem em todos os países da América Tropical, exceto no Chile. No Brasil, grandes populações de capivaras ocorrem no Pantanal, na ilha de Marajó e nos estados de São Paulo e do Rio Grande do Sul.

É um herbívoro generalista que se alimenta de gramíneas e de vegetação aquática, mas que se adapta facilmente a diversos produtos agrícolas, como milho, cana-de-açúcar, arroz e outros. Essa característica confere ao animal grande capacidade de adaptação a ambientes alterados pelo homem, como áreas urbanas e agrícolas. Não por acaso a maior incidência de danos agrícolas relacionados à espécie, segundo reclamações que chegam a essa Divisão de Fauna do Ibama, é observada na região de Ribeirão Preto, área de grande concentração de culturas de cana-de-açúcar, representando cerca de 14% das unidades produtoras do país.

Normalmente, o habitat da capivara – local ocupado pela espécie que contém os recursos necessários (alimento, água e abrigo) para sua sobrevivência – compreende um corpo d'água, campo ou pasto e uma área com vegetação arbustiva. A água é utilizada para as atividades de reprodução, termorregulação e fuga dos predadores; o campo ou pasto é usado para a alimentação (forrageio); e a vegetação arbustiva para abrigo e parição dos filhotes.

O desmatamento ou a substituição das matas ciliares para a implantação de áreas abertas constituídas por gramados, pastagens e culturas agrícolas próximos aos corpos d'água, proporciona a formação de ambientes propícios à ocorrência e ao aumento da população de capivaras. Ferraz (2007), em pesquisa realizada em agroecossistemas localizados na Bacia Hidrográfica do Rio Piracicaba, mostra haver forte correlação entre estes ambientes e a presença de capivaras. Estudos desenvolvidos na Venezuela, por outro lado, mostram que a demografia da espécie em áreas abertas como as de savanas (lhanos venezuelanos) na estação da seca, quando os recursos alimentares e os níveis populacionais são os mais baixos, assemelha-se à demografia observada nas áreas florestais.

A presença de áreas abertas nas margens de rios, açudes e represas é uma condição ideal para a ocorrência da capivara; esta condição é frequentemente encontrada nas áreas urbanas, particularmente nos parques públicos, clubes e condomínios horizontais. Nestes locais, as capivaras são maiormente favorecidas por se encontrarem protegidas da caça furtiva e distantes dos seus predadores naturais.

Características relacionadas à biologia da espécie, como alta taxa reprodutiva e grande capacidade de dispersão e colonização, possibilitam, à capivara, ocupar rapidamente fragmentos de habitat próximos, deslocando-se preferencialmente pela água, mesmo em áreas com altos índices de urbanização. A dispersão é facilitada pela existência da rede hídrica, que conecta os habitats ainda disponíveis. No Município de São Paulo, observa-se a ocorrência de capivaras inclusive em áreas com elevados índices de urbanização, onde o habitat disponível restringe-se a pequenas porções de território às margens de coleções hídricas, como ocorre no Canal do Rio Pinheiros e seus afluentes.

Além da destruição em larga escala das matas ciliares nas bacias hidrográficas hoje afetadas por desequilíbrios na população de capivaras, chama a atenção a profunda modificação operada pelo homem nos recursos hídricos existentes, quer seja pelo desvio de cursos d'água ou canalização de rios e córregos, quer seja pelas numerosas obras de barramento para formação de lagoas ou reservatórios, freqüentes vezes realizadas apenas por razões estéticas ou paisagísticas. É possível que tais modificações tenham impacto significativo sobre a dinâmica populacional da capivara dada a estreita relação da espécie com o recurso hídrico.

3. Diretrizes

3.1. Justificativas

O aumento de casos de FMB associados à presença de capivaras (dados da Sucen) justifica o estabelecimento de diretrizes para a redução dos níveis populacionais da espécie nas micro-bacias afetadas.

Neste contexto, as alternativas técnicas para a redução da população de capivaras devem ser planejadas de maneira a intervir nas causas do aparente desequilíbrio populacional da capivara mas, ao mesmo tempo, evitar que ações de manejo inadequadas possam agravar o risco de transmissão da FMB.

O Ibama mantém atividades voltadas ao manejo da capivara desde a década de 1990. Em diversas ocasiões essa autarquia autorizou a retirada de capivaras de áreas com ocorrência da Febre Maculosa, principalmente em municípios localizados na região de Campinas. Os resultados dessas ações, porém, não foram promissores e apenas corroboram os conhecimentos existentes sobre os aspectos biológicos e ecológicos da capivara:

- a baixa eficiência do método de captura (atração através de cevas e aprisionamento em bretes ou currais) e a conectividade geralmente existente entre os diversos fragmentos de habitat, estabelecida pelas coleções hídricas, o que possibilita a reintrodução, impedem a realização de retiradas totais;
- as retiradas parciais possibilitam, além da entrada de outros grupos na área em questão, o crescimento da população remanescente através do aumento da taxa de natalidade, dada a maior disponibilidade de recursos e conseqüente redução de competição entre os indivíduos;
- o crescimento da população de capivaras e a reintrodução poderão ocasionar o aumento do número de animais susceptíveis à *Rickettsia rickettsii*, se esta estiver presente no ambiente, e conseqüentemente o aumento do risco de contaminação de carrapatos.

Entende-se, portanto, que as capturas parciais, pelos meios hoje possíveis (cevas em bretes), não são eficientes para a redução dos níveis populacionais da capivara e, ainda, podem aumentar o risco de transmissão da FMB. Por esta razão recomenda-se que sejam adotadas, prioritariamente, alternativas voltadas ao controle populacional através da adequação ambiental e/ou o manejo do habitat.

A retirada dos animais deverá limitar-se às áreas de risco da FMB nas situações em que for possível adotar alternativas técnicas que impeçam a re-introdução e o surgimento de condições que podem implicar em novos incrementos populacionais.

3.2. Medidas recomendadas para a redução dos níveis populacionais da capivara

3.2.1. Adequação ambiental

Compreendem as medidas voltadas ao controle e prevenção dos graves desequilíbrios ambientais que podem alterar a dinâmica populacional da capivara. Tais medidas, cuja aplicação depende de uma ação eficaz do Poder Público, decorrem, em larga escala, da legislação que regulamenta o uso das Áreas de Preservação Permanente e podem ser atreladas a três diretrizes básicas:

- intensificação das ações de controle e fiscalização no que diz respeito às ocupações irregulares das Áreas de Preservação Permanente dos corpos d'água.

- Fomento aos programas de restauração das matas ciliares. Neste sentido, destaca-se a importância do “Projeto de Recuperação de Matas Ciliares”, elaborado pela Secretaria Estadual do Meio Ambiente (SMA), em andamento desde o segundo semestre de 2005. O projeto prevê a realização de pilotos em 15 micro-bacias de 5 Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRH), incluindo a UGRH Piracicaba/Capivari/Jundiá, em que se localizam os municípios mais afetados pela Febre Maculosa.
- Reavaliação dos critérios para o licenciamento de empreendimentos em áreas de mananciais e de emissão de outorgas para a formação de lagoas e reservatórios artificiais, de maneira a considerar a fragmentação das matas ciliares e os possíveis desequilíbrios da fauna.

A aplicação rigorosa da legislação que versa sobre as Áreas de Preservação Permanente e de novos critérios para a emissão das licenças ambientais pode contribuir, em médio e longo prazo, para a redução efetiva dos níveis populacionais da capivara.

Ainda que o escopo precípua do presente trabalho seja o de definir posturas recomendadas para a redução dos níveis populacionais da capivara, salienta-se a importância das três diretrizes para a preservação e conservação dos ecossistemas associados às coleções hídricas, como as áreas de várzea e as matas ciliares, fundamentais para a manutenção da quantidade e da qualidade das águas.

3.2.2. Manejo do habitat

O manejo do habitat, de abrangência menor que a adequação ambiental, consiste em modificações do ambiente que visam seu enriquecimento ou sua adequação a situações de interesse. No caso da capivara, o manejo do habitat deve centrar-se na manipulação da quantidade e da distribuição dos recursos necessários e limitantes à ocorrência da espécie, como alimento, água e espaço.

Através da manipulação do habitat pode-se reduzir a capacidade de suporte para os grupos de capivaras residentes em determinada área, fazendo com que a população passe a flutuar em densidades menores às existentes. O manejo do habitat pode implicar em recuperação da mata ciliar, retirada de um item alimentar ou na colocação de barreiras físicas (p.ex., cercas vivas, alambrados etc.) limitando o acesso dos animais a um determinado recurso.

O estabelecimento de um programa voltado ao manejo do habitat não pode prescindir de um estudo preliminar e de um diagnóstico da população de capivaras e do ambiente, que deverá ser realizado por técnicos especialistas no assunto.

Por implicar necessariamente em intervenções nas Áreas de Preservação Permanente, uma vez que o habitat da capivara inclui as coleções hídricas, sua execução deverá ser antecedida pela autorização dos órgãos ambientais competentes.

No quadro abaixo estão resumidas as etapas imprescindíveis para o manejo do habitat:

Etapas para o manejo do habitat	Diagnóstico da capivara e do ambiente
	Monitoramento populacional
	Definição das intervenções necessárias
	Obtenção das licenças ambientais
	Execução do manejo e prosseguimento do monitoramento populacional

É importante salientar que, dada a participação da capivara no ciclo da FMB, as decisões a respeito do manejo do habitat deverão ser tomadas ouvindo-se especialistas da área sanitária.

3.2.3. Medidas para as áreas de risco da Febre Maculosa Brasileira

Nas áreas de risco será autorizada pelo Ibama a retirada de capivaras desde que se tratar de grupos que possam ser isolados das áreas do entorno através da instalação de barreiras físicas. O isolamento é necessário para impedir a re-introdução de animais nas áreas objeto de manejo.

As medidas para as áreas de risco encontram-se resumidas no quadro abaixo:

Áreas de risco	Diagnóstico populacional da capivara e caracterização do ambiente na área afetada e no entorno
	Isolamento das áreas em que serão realizadas as capturas
	Retirada e abate sanitário dos animais
	Monitoramento populacional

A. Diagnóstico da capivara e caracterização do ambiente

O diagnóstico populacional da capivara e a caracterização do ambiente subsidiarão o processo de tomada de decisões: onde retirar capivaras, onde localizar os bretes para a captura e como realizar o isolamento das áreas em que serão realizadas as capturas.

O diagnóstico, a ser realizado por técnicos com experiência no assunto, deverá compreender as seguintes etapas:

- A) levantamento da população de capivaras, que consiste na localização e mapeamento dos grupos de animais e na estimativa do seu tamanho populacional.
- B) Levantamento da área utilizada pelos animais através da localização dos vestígios como fezes, pegadas, carreiros ou trilhas.
- C) Caracterização do ambiente observando-se os principais aspectos como uso do solo, vegetação e recursos hídricos existentes ou rede de drenagem.

As diretrizes técnicas para a realização do levantamento da população de capivaras e da área utilizada já foram elaboradas pelo Ibama e serão repassadas aos órgãos municipais sempre que necessário.

B. Isolamento das áreas de risco

Naturalmente, grupos de capivaras raramente se encontram isolados, uma vez que, possivelmente, derivam de grupos localizados em áreas próximas dos quais se dispersaram para formar novas famílias. A dispersão e a colonização de novos ambientes são facilitadas pelo hábito de deslocar-se principalmente pelos corpos d'água, os quais conectam os diversos fragmentos de habitats localizados na mesma micro-bacia. Portanto, para a remoção total das capivaras, será necessário realizar adequações no ambiente, através de barreiras físicas de maneira a impedir que haja re-introdução, quer seja pelas margens, quer seja pela água.

O isolamento das áreas para a realização do manejo da capivara poderá implicar na instalação de cercas em Áreas de Preservação Permanente e grades em cursos d'água e, portanto, não poderá prescindir de uma avaliação dos impactos que podem resultar deste tipo de intervenção. Dentre outros, destacamos:

- impedir o fluxo da Fauna de uma forma geral;
- dificultar o escoamento da água, com provável impacto negativo sobre as áreas localizadas a montante, aumentando os riscos de alagamentos principalmente nas épocas chuvosas;

- favorecer processos de assoreamento e formação de ambientes lânticos, com conseqüentes alterações nas características físico-químicas e biológicas da água.

O isolamento deverá ser realizado, portanto, nas situações em que os riscos decorrentes sejam aceitáveis se comparados ao risco de ocorrência da Febre Maculosa. Sabe-se que em algumas áreas de risco, como beira de rios ou córregos, o isolamento não será exequível. Em tais áreas, a redução dos níveis populacionais da capivara deverá ser alcançada com utilização de técnicas de manejo do habitat ou adequação ambiental.

Os interessados deverão apresentar o projeto técnico relativo ao isolamento da área ao DEPRN, sempre que implicar em intervenção em Área de Preservação Permanente e instalação de barreiras em coleções hídricas. A manifestação do órgão ambiental estadual será parte integrante do processo de autorização do manejo da capivara por parte da Superintendência do Ibama no Estado de São Paulo.

C. Destinação dos animais retirados

Os animais retirados das áreas de risco deverão ser abatidos, não sendo recomendada nenhuma outra destinação, como criadouros ou translocação. Esta conduta, recomendada pela Sucen e por especialistas da área médico-veterinária, baseia-se no reconhecimento de que os tratamentos com carrapaticidas não são eficazes a ponto de eliminar todos os carrapatos encontrados no hospedeiro. O abate visa impedir que carrapatos eventualmente infectados sejam transportados de uma área a outra, contribuindo para a difusão da Febre Maculosa para outras áreas do estado.

D. Monitoramento populacional

O monitoramento populacional consiste no acompanhamento dos grupos de capivaras ao longo do tempo e permite observar as flutuações da população e detectar crescimento, redução ou estabilização populacional.

Em algumas situações, a retirada total de capivaras poderá implicar em tempos relativamente longos, por isso é recomendável a realização do monitoramento para detectar possíveis crescimentos populacionais em decorrência das capturas. As informações obtidas a partir do monitoramento deverão ser utilizadas como instrumento para avaliar a eficiência das campanhas de captura e indicar a necessidade, ou não, de alterações nos programas estabelecidos.

3.3. Implementação das diretrizes

As diretrizes propostas no presente trabalho serão recomendadas aos órgãos municipais para que sejam incorporadas em seus planos de controle da FMB. Nesta perspectiva, recomenda-se que as decisões referentes às áreas de risco sejam tomadas no interior de grupos municipais inter-setoriais convocados para esta finalidade precípua.

Os grupos inter-setoriais poderão avaliar, entre outros, os seguintes aspectos:

- áreas de risco passíveis de isolamento;
- cronogramas para a execução das obras de isolamento;
- diretrizes para o manejo do habitat;
- medidas para o controle dos carrapatos e manejo dos outros hospedeiros, conforme preconizado pela SUCEN.

Competências quanto às pessoas físicas e/ou jurídicas que deverão executar as ações definidas.

3.4. Legislação pertinente

Lei 5.197 de 03 de Janeiro de 1967 – Código da Fauna

Lei 9605 de 12 de Fevereiro de 1998 e Decreto 3.179 de 21 de Setembro de 1999 – Lei de Crimes Ambientais e Decreto regulamentador

Lei 4.771 de 15 de Setembro de 1965 – Código Florestal

Resolução Conama 302 de 20 de Março de 2002

Resolução Conama 303 de 20 de Março de 2002

Resolução Conama 369 de 28 de Março de 2006

Constituição do Estado de São Paulo

4. Referências bibliográficas

- Ferraz, K.P.M.B, Verdade L. Ecologia comportamental da capivara: bases biológicas para o manejo da espécie in Mattos, W.R.S. (Ed.) Produção animal na visão dos brasileiros. Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília, D. F., 2001
- Ferraz, K.P.M.B., R.M.F. Santos-Filho, T.R.O. Piffer, Verdade L. M. Biologia e Manejo da Capivara: do controle de danos ao máximo rendimento sustentável. p. 580-588 in Mattos, W.R.S. (Ed.) A produção animal na visão dos brasileiros, Sociedade Brasileira de Zootecnia, Brasília, Distrito Federal, 2001.
- Ferraz, K.P.M.B., Lechevalier M., Couto H.T.Z., Verdade L. M. *Damage caused by capybaras in a corn field*. Scientia Agrícola 60: 191-194, 2003
- Ferraz K M P.B., Ferraz S F de B., Moreira J. R., Couto H. T. Z. de C., Verdade L. M. *Capybara (Hydrochoerus hydrochaeris) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis*; Journal of Biogeography, Oxford, v.34, n.2, p.223-230, 2007.
- Gerardo A., Cordero R. e Ojasti J. *Comparison of Capybara populations of open and forested habitats*. J. Wildl. Manage 45(1), 1981
- Mac Donald D. W., Dwindling resources and the social behaviour of Capybaras (Hydrochoerus hydrochaeris) (Mammalia). J. Zool., London, 194: 371-391, 1981.
- Labruna M. B., Kerber, C. E., Ferreira, F., Fqaccini, J. L. H., De Waal, D. T., Gennari, S. M., *Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil*. Veterinary Parasitology, 97: 1-14, 2001
- Ojasti J., *Estudio Biologico del Chigüire o Capibara*. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Caracas, Venezuela, 1973.
- São Paulo (Estado). Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias – Sucen, Vera Lúcia Fonseca de Camargo-Neves (Coord.) Manual de Vigilância Acarológica. 62p, 2004.
- Verdade, L., Ferraz K. P. M. B. Capybaras on anthropogenic habitat in Southeastern Brazil. Brazilian Journal of Biology 66(1b): 371-378, 2006

São Paulo, 06 de Março de 2008

ROSSANA BORIONI

Analista Ambiental - Mat. SIAPE 1423508
Divisão de Fauna e Recursos Pesqueiros

Anexo D: Declaração de aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética.

Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 27 de março de 2019.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “ESTUDO DA CONDIÇÃO DE SANIDADE DE CAPIVARAS (*HYDROCHOERUS HYDROCHAERIS*) ORIUNDAS DO DISTRITO FEDERAL E ENTORNO”. Protocolo n.º 20/2019, sob responsabilidade da Professora Giane Regina Paludo foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Hydrochoerus hydrochaeris* (100). A presente aprovação é válida pelo período de: 01/03/2019 a 29/02/2020.



Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



Anexo E- Protocolo de extração de DNA dos carrapatos pelo método de Isotiocianato de Guanidina e fenol clorofórmio.

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA DE CARRAPATOS – GT

- 1) Colocar um carrapato em cada eppendorf identificado
 - a. Fêmeas ingurgitadas – Cortar, usar somente o capítulo (terço anterior) para evitar o máximo de contaminação com sangue
 - b. Larvas – Nunca usar várias larvas de diferentes origens. Geralmente só junta as encontradas no mesmo bolo
- 2) Adicionar em cada eppendorf 150 µL de PBS
- 3) Triturar os carrapatos com ponteira queimada
- 4) Homogeneizar no vórtex por 10 segundos
- 5) Spin por 6-7 segundos
- 6) Adicionar 450 µL de GT em cada microtubo
 - a. **ATENÇÃO: UTILIZAR A CAPELA DE FLUXO LAMINAR**
 - b. Manter o GT na geladeira
- 7) Colocar no banho maria a 37°C e deixar incubando por 10 minutos, com vórtex a cada 2,5 minutos, agitando por 10 segundos
- 8) Spin de 6 segundos na centrífuga
- 9) Acrescentar 100 µL de clorofórmio em cada microtubo
 - a. **ATENÇÃO: UTILIZAR A CAPELA DE FLUXO LAMINAR**
- 10) Vórtex por 10 segundos e deixar descansando por 2 minutos
- 11) Centrifugar os tubos a 12.000 rpm por 5 minutos
 - a. Na centrífuga, lembrar de colocar a dobra da tampa do eppendorf para cima para facilitar a identificação do local do pellet
 - b. Identificar um novo microtubo para cada amostra
- 12) Obtenção de 2 fases no eppendorf
- 13) Recuperar 400 µL da fase aquosa (transparente) colocando-a no novo microtubo identificado e desprezar o microtubo com a fase restante (azul);
 - a. **NÃO PUXAR O CORANTE (FASE AZUL). INIBIDOR DE PCR**
 - b. Pode-se puxar até 400 µL, mas menos que isso não tem problema
- 14) Colocar em cada microtubo 600 µL de isopropanol 100% (para solubilizar)
 - a. **ATENÇÃO: UTILIZAR A CAPELA DE FLUXO LAMINAR**

- 15) Deixar no freezer a -20°C por no mínimo 2 horas, podendo ficar *overnight* ou tempo indeterminado
- 16) Centrifugar 12000 rcf – 15 min – 4°C
- 17) Desprezar o sobrenadante
 - a. Técnica do papel – um papel para cada tubo
- 18) Adicionar 800 μL de etanol à 70% em cada microtubo
- 19) Centrifugar a 12000 rcf - 5 minutos - 4°C
- 20) Desprezar o sobrenadante
- 21) Secar o pellet a 56°C no banho maria por 30 minutos, com o tubo aberto até secar
- 22) Ressuspender o pellet com PBS
 - a. 30 a 60 μL de acordo com os testes a serem efetuados
 - b. Carrapato inteiro: 60 μL
 - c. Pernas e larvar: 30 μL
 - d. Ninfas: 15 μL
- 23) Vórtex por 6 segundos.