

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”

Soroprevalência de gambás (*Didelphis spp.*) para a bactéria *Rickettsia rickettsii* em Piracicaba-SP: priorização de áreas de risco de ocorrência da Febre Maculosa Brasileira

Luis Guilherme de Queiroz
Orientador: Prof. Dr. Gilberto José de Moraes
Monografia apresentada ao Departamento
de Ciências Biológicas como parte do requisito de obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Piracicaba, dezembro de 2021

Soroprevalência de gambás (*Didelphis spp.*) para a bactéria *Rickettsia rickettsii* em Piracicaba-SP: priorização de áreas de risco de ocorrência da Febre Maculosa Brasileira

Resumo

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma doença muito relevante no Brasil, podendo ocasionar a morte da pessoa infectada em poucos dias, com letalidade acima de 60% na Região Sudeste nos últimos anos. É causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, cujo vetor, na região de Piracicaba, estado de São Paulo, é o carapato-estrela (*Amblyomma sculptum*). Os principais hospedeiros deste carapato são capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e equinos, sendo o gambá (*Didelphis spp.*) um hospedeiro secundário e considerado organismo sentinel para a doença. Todos estes animais são encontrados no município de Piracicaba que, por sua vez, enfrenta constantemente problemas com FMB. O presente trabalho visou validar o uso de gambás em substituição a capivaras para análise sorológica, a fim de descobrir a soroprevalência da bactéria causadora da FMB, com vistas ao estabelecimento de um protocolo de priorização de áreas para trabalhos de prevenção da enfermidade no município de Piracicaba pelos órgãos públicos. No total, 115 gambás foram capturados, oriundos de sete locais, cada um dos quais com um corpo d'água (rio, ribeirão ou lagoa). Uma amostra de sangue foi tomada de cada animal e submetida à reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Apenas nove dos gambás capturados (7,8%) foram confirmados como soropositivos para *R. rickettsii*, todos fêmeas, a maioria das quais prenhes. Dentre os gambás soropositivos, o menor tinha 60 cm de comprimento e pesava 0,75 kg, enquanto o maior tinha 71 cm de comprimento e pesava 1,25 kg. Ao considerar a baixa proporção de gambás soropositivos no estudo, sugere-se que em trabalhos desta natureza sejam coletados 25 gambás por área estudada. A análise conjunta dos dados, considerando os dados levantados pelo presente trabalho e aspectos socioeconômicos dos locais de estudo, sugere três locais como prioritários: lagoas do bairro São Francisco, trecho do rio Piracicaba no bairro do Bongue e ribeirão Piracicamirim nas proximidades do bairro Santa Cecília.

Palavras chave: carapato-estrela, hospedeiros, Febre Maculosa

Seroprevalence of opossums (*Didelphis* spp.) for the bacterium *Rickettsia rickettsii* in Piracicaba-SP: prioritization of areas regarding the risk of occurrence of the Brazilian Spotted Fever

Abstract

The Brazilian Spotted Fever (FMB) is a very relevant disease in Brazil, which can cause the death of infected persons in a few days, with a lethality rate above 60% in the southeast region in recent years. It is caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii*, whose vector, in the region of Piracicaba, state of São Paulo, is the tick *Amblyomma sculptum*. The main hosts of this tick are capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) and horses, opossum (*Didelphis* spp.) being a secondary host and considered a sentinel organism for the disease. All these animals are found in Piracicaba, which, in turn, constantly faces problems with FMB. This study aimed to validate the use of opossums to replace capybaras in serological analysis, in order to determine the seroprevalence of the bacteria causing FMB, with a view to establishing a protocol for prioritizing areas for disease prevention work in Piracicaba by public authorities. In total, 115 opossums were captured, from seven locations, each with a water body (river, stream or lake). A blood sample was taken from each animal and submitted to indirect immunofluorescence assay (IFA). Only nine of the captured opossums (7.8%) were confirmed as seropositive for *R. rickettsii*, all females, most of which were pregnant. Among the seropositive opossums, the smallest was 60 cm long and weighed 0.75 kg, while the largest was 71 cm long and weighed 1.25 kg. The low proportion of seropositive opossums in the study suggests that in works of this nature, 25 opossums should be collected per studied area. The joint analysis of the data, considering the data collected in the present study and socioeconomic aspects of the study sites, suggests three places to have priority: lagoons in the São Francisco neighborhood, stretch of the Piracicaba river in the Bongue neighborhood and the Piracicamirim stream in the vicinity of the Santa Cecília neighborhood .

Key words: hosts, Spotted Fever, tick

1. Introdução

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma importante doença no município de Piracicaba – SP, onde constantemente atinge a população de seres humanos. Anualmente, diversas pessoas vão a óbito por efeito desta enfermidade no município (Secretaria da Saúde de Piracicaba, 2017).

Embora alguns locais de Piracicaba já sejam conhecidos como áreas de risco de contágio de FMB, como, por exemplo, a lagoa do bairro Santa Rita (onde há placas alertando sobre a doença), o perigo em outras áreas é pouco conhecido ou totalmente desconhecido.

1.1 Revisão sobre a enfermidade

A febre maculosa, conhecida como *Fiebre Manchada* em espanhol e *Spotted Fever* em inglês, é uma enfermidade de grande relevância cujos principais sintomas são febre alta, dor de cabeça, dores no corpo, indisposição, diarreia, vômito e, nos estágios mais avançados, máculas na pele, o que justifica seu nome popular. Esta enfermidade evolui rapidamente, podendo ser fatal em 7 a 14 dias após o contágio. Seu primeiro registro clínico deu-se em 1909 em Idaho, EUA, por Edward E. Maxey (Ricketts, 1909; Walker, 1989). No Brasil, o primeiro registro desta enfermidade foi descrito em 1929 por José Toledo Piza, no Estado de São Paulo, porém sendo confundida com outra enfermidade, o tifo, recebendo o nome de “*Tifho Exanthemático de São Paulo*” (Gurgel et al., 2009; Piza, 1932). Mais tarde, a doença foi identificada também nos estados de Minas Gerais, Bahia e Rio de Janeiro (cronologicamente) (Greca et al., 2008), sendo incluída na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória do Ministério da Saúde pela Portaria GM/MS nº 1943, de 18 de outubro de 2001 (Angerami, 2011; Martins, 2014; Ministério da Saúde, 2018, 2020). De acordo com a Vigilância de Zoonoses e Doenças de Transmissão Vetorial do Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis, da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, em 2019 o Brasil registrou 273 casos confirmados de febre maculosa. Destes, 174 (63,7%) foram hospitalizados; 69 (39,7%) evoluíram para óbito, com letalidade de 25,3% entre as confirmações (Associação Paulista de Medicina, 2021). Em 2021, foram confirmados no Brasil 69 casos e 19 mortes por febre maculosa até o final de setembro (CNN Brasil, 2021). Em nosso país, a Região Sudeste concentra a maior parte dos casos de FMB; nesta

região, a letalidade tem sido superior a 60% nos últimos anos (Del Fiol et al., 2010; Paes de Araújo et al., 2016).

2. Organismos relacionados ao ciclo da Febre Maculosa Brasileira

A manutenção do ciclo enzoótico da febre maculosa em áreas endêmicas, se deve principalmente à participação permanente de hospedeiros vertebrados primários e secundários, sendo alguns destes amplificadores do agente causal da doença.

2.1 Agente causal

O agente causal da FMB é a bactéria *Rickettsia rickettsii*, classificada como: proteobactéria, cocobacilo pleomórfico gram-negativo (Angerami, 2011; Martins, 2014), de comportamento parasitário intracelular obrigatório (Angerami, 2011). Esta foi isolada pela primeira vez em 1906, pelo pesquisador Howard T. Ricketts.

Em hospedeiros vertebrados, a bactéria parasita o endotélio vascular e paredes dos vasos de praticamente todo o corpo, alojando-se no citoplasma ou até mesmo no núcleo das células do hospedeiro (Martins, 2014). Deste modo, o tecido sofre lesões microvasculares e, consequentemente, alteração de permeabilidade vascular, problemas como distúrbios no sistema de coagulação, pequenos ferimentos vasculares e lesões teciduais difusas (Sporn et al., 1994; Valbuena e Walker, 2005; Walker, 2007; Chen e Sexton, 2008).

2.2 Votor

Ao redor do mundo, patologias desta natureza estão associados ao parasitismo por carapatos. No Brasil, o principal votor da FMB no interior do estado de São Paulo é o carapato-estrela (*Amblyomma sculptum*), ácaro hematófago da família Ixodidae (Rohr, 1909, Perez, 2007, 2008; Del Fiol et al., 2010) cuja fase adulta é caracterizada pelas manchas dorsais de cor esbranquiçada, formando ornamentos similares à de uma estrela invertida. Em seu desenvolvimento, esta espécie passa pelos estágios de ovo, larva, ninfa e adulto. Todos os estágios pós-embriónarios podem transmitir a bactéria, sendo no entanto, a ninfa o estágio mais importante (Sucen, 2004). Como os demais carapatos, é um parasito hematófago, cujos estágios jovens (larva e ninfa) apresentam hábito generalista (baixa especificidade parasitária), enquanto que o hábito parasitário se torna mais especializado na fase adulta (Labruna, 2006, Perez et al., 2008).

Uma notável característica fisiológica adaptativa dos carapatos é a composição de sua saliva, que contém substâncias anestésicas, as quais contribuem fortemente para a insensibilidade do hospedeiro quando está sendo picado.

A morfologia do carapato-estrela altera-se ao longo de seu ciclo de vida: durante o estágio de larva, o corpo é caracterizado pela cor vermelho-alaranjado e a presença de 3 pares de pernas; durante o estágio de ninfa, um novo par de pernas surge; durante o estágio adulto, o dorso torna-se esclerotizado (especialmente nos machos), conferindo maior rigidez ao corpo; neste estágio, ocorre também o escurecimento do corpo, em tons de marrom, com as manchas típicas esbranquiçadas.

A larva do carapato-estrela eclode dos ovos deixados pela teleóginas no solo. Esta sobe e desce na vegetação a espera da passagem de um hospedeiro, ao qual se prende permanecendo nele por alguns dias, alimentando-se. Em seguida, esta desce ao solo onde passa por uma ecdise (troca de exoesqueleto) passando ao estágio de ninfa. Esta repete o mesmo processo, também passando por uma nova ecdise para o estágio adulto, que permanece na vegetação, a espera da passagem de um novo hospedeiro, do qual se alimenta por vários dias, com aumento de volume se for fêmea. Após ingurgitada, a fêmea desce ao solo, onde faz a postura dos ovos. Os machos adultos, por sua vez, permanecem sobre o hospedeiro por tempo mais longo, alimentando-se e copulando novas fêmeas.

O carapato-estrela infectado transmite a bactéria *R. rickettsii* a seu hospedeiro através da picada, ao parasitar o hospedeiro, para repasto sanguíneo. Para que a transmissão ocorra, é necessário que o carapato permaneça alimentando-se do hospedeiro por pelo menos 3 a 5 horas.

A bactéria *R. rickettsii* é, de certo modo, prejudicial ao próprio carapato, pois, como demonstrado por Soares et al. (2011), fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (antigamente classificado como *A. cajennense*, Martins, 2016) infectadas pela bactéria apresentam menor desempenho reprodutivo, menor peso da massa de ovos e menor taxa de eclosão da progênie. Consequentemente, indivíduos de carapato-estrela não conseguem manter *R. rickettsii* circulando indefinidamente em sua população através de transferência transovariana (de genitor para prole), sendo, portanto, necessária a presença de um organismo amplificador da bactéria naquele ecossistema para que esta perdure por várias gerações. A proporção de carapatos infectados por transferência transovariana é relativamente baixa (cerca de 1% da população) (Burgdorfer, 1988; Guedes et al., 2005; Pinter e Labruna, 2006; Sangioni et al., 2005), porém, em valores absolutos esta

quantidade pode ser significativa, tendo em vista tanto a elevada progênie de cada postura – superior a 7.500 ovos – como a viabilidade de eclosão (>95%) (Rohr, 1909).

Os hospedeiros primários do carapato-estrela – ou seja, aqueles que permitem aos adultos do carapato um repasto sanguíneo adequado para a fase reprodutiva – são, principalmente, os equinos e as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*). Esta última é também amplificadora de *R. rickettsii*. Os hospedeiros secundários (ou intermediários) incluem gambás (*Didelphis* spp.), cães, gatos, urubus, seres humanos, dentre outros animais (Labruna, 2006, Del Fiol et al., 2010; Perez et al., 2008).

2.3 Hospedeiros do vetor

2.3.1 Capivara

A capivara é um roedor típico da região neotropical, nativo da América do Sul. Apresenta hábito semiaquático (necessita de um lago, rio ou outros corpos d'água para a termorregulação, acasalamento e fuga de predadores) (Silva, 1986). É ativa predominantemente à noite, embora isso possa variar um pouco entre grupos distintos, os mais isolados sendo frequentemente ativos também durante o dia. Alimenta-se principalmente de gramíneas e plantas aquáticas; ocasionalmente, pode se alimentar também de outras plantas, que embora não preferidas, como a soja, podem ser bastante danificadas. O porte médio de um indivíduo adulto é de aproximadamente 1,3 m de comprimento e cerca de 50 kg, sendo que na literatura há registros de capivaras com cerca de 80 kg (Silva et al., 2013). Apresenta comportamento social e forma grupos de tamanhos variados, entre 10 e 40 animais, mas eventualmente de até mais de 100 animais (Herrera, 2013). Normalmente tem grande mobilidade, podendo andar vários quilômetros em busca de alimento e/ou de parceiros sexuais (Silva, 1986).

Este animal desempenha papel fundamental na dispersão do carapato-estrela e como fonte de inóculo de *R. rickettsii* (Burgdorfer, 1988; Guedes et al., 2005; Pinter e Labruna, 2006; Sangioni et al., 2005). Deste modo, carapatos sadios (isto é, que não são portadores da bactéria) podem ser infectados ao se alimentar do sangue de capivaras em bacteremia. Além disto, como as larvas e ninfas do carapato descem do hospedeiro durante a transição entre um estágio e outro e depois procuram um novo hospedeiro, este comportamento aumenta significativamente as chances de um carapato sadio adquirir e/ou transmitir a bactéria cada vez que muda de estágio. De acordo com Perez et al.

(2008), a taxa de prevalência de carapatos em capivaras é de 100% com uma infestação média de 2680 e máxima de 3158 carapatos por capivara.

De acordo com Ramírez-Hernández et al. (2020), as capivaras, quando infectadas por *R. rickettsii*, apresentam bacteremia por cerca de 10 dias, manifestando sintomas clínicos como febre e perda de apetite, e, em casos mais graves e raros, anormalidades na pele, coma, e até mesmo morte do animal. Após a infecção, desenvolvem imunidade à bactéria e normalmente não apresentam mais sintomas clínicos.

2.3.2 Gambá

O gambá (*Didelphis* spp.) também é considerado uma espécie importante no ciclo da FMB em áreas endêmicas para esta doença. Estes marsupiais podem ser encontrados em regiões temperadas desde a América do Norte até a América do Sul. Nesta última região, as duas espécies mais comuns são o gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) e o gambá-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) (IUCN, 2015). Ambas as espécies podem ser encontradas tanto em áreas florestais quanto em ambientes antropizados, próximos ou dentro de áreas urbanas. (Ortiz, 2018; Cáceres, 2002). Trata-se de um marsupial solitário, de hábito noturno e arborícola. Apresenta médio porte, com o indivíduo adulto medindo aproximadamente 60 cm de comprimento e tendo massa corporal variando entre 500 e 2750g (Cáceres e Monteiro-Filho, 1999; Rossi e Bianconi, 2011). Sua dieta é generalista, e inclui principalmente insetos e frutos (Cáceres, 2003; Mares e Ernest, 1995; Talamoni e Dias, 1999), e eventualmente sementes, pequenos vertebrados, restos de alimentos humanos descartados e crustáceos (Cáceres, 2002).

Estudos anteriores (Horta et al., 2009) confirmaram que este marsupial também é hospedeiro (secundário) do carapato-estrela e amplificador de *R. rickettsii* pelo que pode ser considerado uma espécie sentinel visando a estudos epidemiológicos da FMB. Segundo Bozeman et al. (1967), gambás experimentalmente infectados por *R. rickettsii* apresentaram ricketsemia durante três a quatro semanas, porém, conforme demonstrado por Horta et al. (2009), não há manifestação de sintomas clínicos nos gambás infectados mesmo durante este período. Segundo Perez et al. (2008), a taxa de prevalência de carapatos em gambás é de 80% com uma infestação média de 167 e máxima de 916 carapatos por gambá.

3. Ações preventivas da enfermidade

A prevenção da FMB envolve a adoção de várias medidas. Uma das principais se refere à conscientização pública, por meio de: placas de alerta, palestras, panfletos, divulgação em rádio e jornal, treinamentos, dias de campo. Esta usualmente é a medida mais efetiva, por permitir a adoção de cuidados que reduzem os riscos de infecção como evitar caminhar nas proximidades de corpos d'água onde transitam capivaras, locais de maior perigo de parasitismo humano pelo carrapato-estrela. Outra medida envolve o manejo da vegetação (manter a vegetação baixa para reduzir a população de carrapatos). Eventualmente pode-se optar pelo manejo reprodutivo de capivaras. Esta alternativa, no entanto, envolve muitas variáveis, desde ambientais até sociais, de modo que é obrigatória a obtenção de uma licença (autorização oficial) do IBAMA por meio do sistema SISBIO / ICMBio ou, no Estado de São Paulo, de uma licença do DeFau (Departamento de Fauna) emitida via sistema GEFAU, além da eventual autorização de comissões de ética internas. O manejo é realizado, inicialmente, por meio do recenseamento dos grupos de capivaras residindo no lugar com ajuda de ceva dos animais para contagem. Em seguida eles são capturados, anestesiados e marcados com chip, colar ou brinco numerado. Então é realizada a cirurgia (laqueadura nas fêmeas e/ou vasectomia nos machos) por um profissional de medicina veterinária devidamente licenciado para realizar esta atividade. Há também a possibilidade de se realizar o controle de carrapatos, este usualmente com produtos químicos, eventualmente com produtos biológicos. Quando estas opções se mostram inadequadas ou de eficiência insuficiente, outra alternativa é a exclusão de capivaras, seja pelo uso de cercas (evitando, assim, a passagem dos animais para áreas antropizadas) ou por meio de abate de acordo com a Resolução Conjunta Nº 1, SMA/SES, de 1 de julho de 2016 que dispõe sobre a aprovação das “Diretrizes técnicas para a vigilância e controle da Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo”.

Outra medida que pode ser adotada é a revegetação do local, substituindo gramíneas por árvores, técnica que permite o sombreamento dos espaços impedindo o crescimento de gramíneas (principal alimento das capivaras) e indiretamente contribuindo para a redução da dispersão de carrapatos.

Quando, por algum motivo, uma pessoa é infectada por FMB, deve imediatamente procurar atendimento médico e informar o médico que houve picada de carrapato ou visita a área de trânsito de capivaras, informações que permitirão ao profissional um diagnóstico e medicação assertivos.

O atendimento médico precoce é de extrema importância pois a enfermidade evolui muito rapidamente, podendo levar a pessoa infectada a óbito em poucos dias. A frequência de óbitos é alta dentre os infectados (no estado de São Paulo a letalidade da doença chega a ultrapassar 60%), o que pode ser atribuído a: 1) o desconhecimento sobre a possibilidade de ocorrência da doença (muitas vezes o indivíduo não encontra o carapato em seu corpo); 2) como consequência do motivo anterior, a doença pode ser diagnosticada e tratada erroneamente por apresentar quadro clínico similar a de outras enfermidades, uma vez que no estágio inicial, a FMB manifesta os mesmos sintomas de outras doenças como dengue ou gripe.

Capivaras são predadas por onças, sucuris e jacarés e, devido à ausência ou escassez destes predadores no município de Piracicaba, tem-se o crescimento populacional dos grupos de capivaras e, consequentemente, da população de carapatos.

4. Questões socioeconômicas

No município de Piracicaba existe cerca de uma centena de corpos d'água, sendo os principais: o Rio Piracicaba e Ribeirão Piracicamirim sendo que em vários trechos destes existem diversos estabelecimentos comerciais e residências. Outros exemplos de importantes corpos d'água relacionados a esta problemática são citados a seguir. Lagoas do distrito industrial Unileste (duas grandes lagoas situadas praticamente no centro do distrito), onde se localizam várias empresas, também recebem pescadores com certa frequência; lagoas do Horto Florestal de Tupi (local aberto à visitação pública, que recebe visitantes quase diariamente; são em número de 3 no interior da mata); lagoas do Bairro São Francisco (duas pequenas lagoas localizadas bem próximo a residências, duas escolas primárias e uma empresa) e lagoa do Bairro Santa Rita (cercada por residências e próxima a uma escola; que recebe semanalmente grande número de visitantes).

Em alguns trechos destes locais existem placas alertando sobre a presença de carapatos, mas não se sabe em que medida estas placas chegam a cumprir seu papel.

Seria conveniente que o poder público desenvolvesse ações preventivas nos locais descritos, para reduzir a incidência de FMB. Porém, dada a dificuldade da adoção destas medidas concomitantemente em todos os corpos d'água do município, recomenda-se a necessidade de elaborar um protocolo para priorizar as áreas onde há maior risco de transmissão da doença, de forma que esforços possam ser direcionados priorizando as áreas de maior risco.

5. Contextualização do trabalho e objetivos

A elaboração do protocolo de priorização é o alvo de um projeto maior, iniciado em 2019 como parte do Programa “Aprender na Comunidade” da Pró-Reitoria de Graduação da Universidade de São Paulo, cuja viabilização pode se beneficiar muito do presente projeto. A hipótese deste grande projeto é de que a priorização possa ser estabelecida com a integração de diversas avaliações, que levam em conta cada elemento relacionado à incidência da FMB, a saber: os hospedeiros do agente causal, seu vetor, os hospedeiros do vetor, o agente causal e o ser humano. A estimativa dos níveis de ocorrência destes elementos é fundamental para a seleção de áreas prioritárias.

No entanto, um dos aspectos mais complicados em uma análise deste tipo refere-se à estimativa da presença de *R. rickettsii*. Sendo a capivara seu principal hospedeiro, teoricamente a simples análise sorológica destas poderia determinar o nível de ocorrência da bactéria, não fosse as dificuldades relacionadas ao difícil manejo para ceva e captura destes roedores. Por esta razão, a determinação de um animal alternativo par se obter esta informação é altamente desejável, pelo que se considerou o uso de gambás, a qual se justifica pelo fato de que estes marsupiais, segundo estudos recentes (Horta, 2009; Ortiz, 2018), são amplificadores da bactéria *R. rickettsii*, além de apresentarem menor porte e maior facilidade de captura, contenção e manejo, em comparação com as capivaras. Consequentemente, surgiu a necessidade da comprovação de que os gambás poderiam substituir as capivaras dentro do contexto do presente trabalho.

Sendo assim, os objetivos do presente trabalho foram: 1) validar a possibilidade do uso de gambás para a estimativa dos níveis de ocorrência de *R. rickettsii* (com base nos resultados dos trabalhos de Horta, 2009 e Ortiz, 2018); 2) demonstrar a viabilidade de uso do citado protocolo; 3) treinamento do autor deste documento para a execução do protocolo citado (sendo este último considerado o principal dentre os objetivos).

6. Materiais e métodos

O trabalho aqui descrito faz parte de um conjunto de ações desenvolvidas para a priorização dos corpos d’água, através de um protocolo em estado de validação que, além da determinação da ocorrência de *R. rickettsii*, envolve a determinação das densidades populacionais de capivaras e de carapatos nas proximidades de corpos d’água (= áreas experimentais) preliminarmente selecionadas em função da aparente frequência da visitação pública.

Dentre os muitos corpos d'água do município de Piracicaba, as áreas selecionadas para estudo foram as proximidades dos seguintes corpos d'água:

1. Lagoa do Bairro Santa Rita (coordenadas aproximadas: 22°45'25.5"S 47°35'18.6"W);
2. Lagoas do bairro São Francisco (coordenadas aproximadas: 22°46'26.0"S 47°35'07.1"W);
3. Lagoas do distrito industrial Unileste (coordenadas aproximadas: 22°43'59.0"S 47°35'33.0"W);
4. Lagoas do Horto Florestal de Tupi (coordenadas aproximadas: 22°44'08.6"S 47°31'41.4"W);
5. Trecho do Rio Piracicaba nas proximidades do “Shopping Center” (coordenadas aproximadas: 22°42'47.4"S 47°39'05.3"W);
6. Trecho do Rio Piracicaba nas proximidades do Bairro Bongue e Bairro Nhô Quim (coordenadas aproximadas: 22°43'02.9"S 47°40'35.4"W).
7. Trecho do Ribeirão Piracicamirim nas proximidades do bairro Santa Cecília (coordenadas aproximadas: 22°43'47.6"S 47°37'38.0"W).

O trabalho especificamente desenvolvido por este projeto é um dos módulos importantes do projeto global, envolvendo a análise sorológica de amostras de sangue tomadas de gambás nas áreas de estudo, visando comprovar a possibilidade de uso destes marsupiais em substituição às capivaras. Consistiu das seguintes etapas:

6.1 Captura dos gambás no campo.

A coleta dos animais foi realizada após a obtenção prévia das licenças de número 68733-1 (ano 2019) e 68733-2 (ano 2021) expedidas pelo SISBIO, assim como as autorizações com número de protocolo 2019-16 e 8063030521 (ID 000239) do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da ESALQ. Em cada área experimental, no mínimo 15 gambás foram capturados, sendo grande parte desta etapa (cerca de 80% dos gambás) realizada em 2019.

Para cada captura, foram distribuídas 10–20 armadilhas (tipo *Tomahawk*, de 20 x 20 x 40 cm) devidamente identificadas (cada uma com um número) em cada área de estudo no início de cada semana (adaptado de Perez, 2008; Ortiz, 2018). Cada armadilha foi iscada com ¼ de laranja (Ortiz, 2018). A disposição das armadilhas foi feita colocando-se cada uma em um local onde haveria maior chance de captura (geralmente debaixo de árvores), sempre respeitando-se uma distância de pelo menos 10 m entre uma

armadilha e outra. Diariamente, estas foram visitadas para verificar a captura dos animais (Figura 1). Sempre que possível, fotografias e referências geográficas foram feitas no local exato onde cada armadilha foi armada, de modo que os gambás pudessem ser liberados de volta ao ambiente no mesmo local da captura.



Figura 1. Gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) capturado em armadilha tipo “tomahawk” iscada com laranja. Cada armadilha é identificada com um número.

6.2 Obtenção das amostras de sangue e dos carapatos.

Os gambás capturados foram conduzidos à ESALQ, no laboratório de Acarologia do Departamento de Entomologia e Acarologia, onde permaneceram por 5–7 dias, dentro de gaiolas mais espaçosas em uma sala arejada e com iluminação elétrica. Dentro de cada gaiola foi colocado um pote com água, sendo esta trocada (renovada) diariamente. Os gambás foram alimentados 1 vez por dia com frutas, verduras e pedaços de carne cozida, provenientes das sobras das refeições do restaurante universitário da ESALQ. Na sexta-feira de cada semana foi feita a biometria e coleta da amostra de sangue de cada gambá. Para tanto, a médica veterinária aplicava uma injeção de anestesia com 58 mg de cloridrato de quetamina e 12 mg de cloridrato de xilazina na proporção 1:1, na dosagem de 0,5 mL/kg de peso vivo, por meio de uma seringa de insulina de 0,5ml com agulha fixa, tamanho 0,52 x 6 mm. Enquanto estavam anestesiados (o efeito durava aproximadamente 1 hora), os gambás passaram por biometria (sexagem, pesagem com

balança de pano e medição com fita métrica), marcação (brinco metálico numerado na orelha) e extração de sangue. Esta última foi realizada usando-se seringas equipadas com agulha hipodérmica de 20 x 0,55 mm, aplicadas na região ventral da cauda do animal (Ortiz, 2018) e o sangue recolhido (aproximadamente 0,5 mL) foi imediatamente transferido para pequenos frascos de polietileno. Imediatamente após a extração, cada amostra de sangue foi centrifugada a 2000 rotações por minuto por 10 minutos para separação do soro, usando-se uma centrífuga modelo 80-2B da fabricante Centribio. Em seguida, as amostras centrifugadas foram armazenadas a -20° C em um *freezer* modelo CHB53 da fabricante Consul até a realização das análises.

Carapatos que estavam parasitando os gambás foram coletados e identificados, sendo que para captura dos carapatos foram utilizadas bandejas de plástico de aproximadamente 40 x 20 cm, posicionadas debaixo da gaiola de cada gambá enquanto eles permaneceram no confinamento (Perez, 2008). Na parte de cima da bandeja há uma tela (malha) que retém toda a matéria sólida que cai da gaiola, incluindo os carapatos que estavam parasitando os marsupiais. Sobre a tela foi adicionada maravalha (serragem) para absorver a matéria líquida (urina do gambá, por exemplo) que cai da gaiola (Figura 2). Cerca de 5-7 dias após a captura do gambá, os carapatos que caíram na maravalha sobre a tela da respectiva bandeja foram coletados manualmente com pinça ou pincel e armazenados em pequenos frascos de polietileno. Inicialmente os carapatos foram mantidos vivos, sendo que um algodão úmido foi colocado na região da tampa de cada frasco, garantindo umidade aos carapatos e impedindo que estes escapassem do recipiente. Deste modo, muitos carapatos que foram coletados como larvas ou ninfas realizaram ecdise dentro do frasco, tornando-se ninfas e adultos respectivamente. A partir de meados do projeto, não houve mais necessidade de manter os carapatos vivos, então dentro de cada frasco foi colocado álcool 70%. Todos os frascos foram identificados com o número do brinco do respectivo gambá, local (trecho) onde o animal foi capturado e a quantidade de carapatos que foi inserida dentro do respectivo frasco. Após a coleta manual dos carapatos na maravalha, as bandejas eram lavadas (adaptado de Perez, 2008).



Figura 2. Gambá cativo. Gaiola posicionada em cima de bandeja com maravalha para posterior coleta dos carrapatos ingurgitados.

Logo após a coleta dos carrapatos, os gambás foram conduzidos de volta aos locais onde haviam sido capturados, para liberação na natureza.

6.3 Análise sorológica dos gambás e identificação taxonômica dos carrapatos parasitos dos gambás.

As amostras de sangue que estavam armazenadas no *freezer* foram colocadas dentro de uma caixa de isopor contendo gel rígido reutilizável “Gelox” da fabricante Termogel, a qual foi transportada até o Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da USP na Cidade de São Paulo – SP.

A análise sorológica foi realizada sob a supervisão do Prof. Marcelo B. Labruna no laboratório de doenças parasitárias da FMVZ, através da técnica RIFI (reação de imunofluorescência indireta) com base no protocolo estabelecido por Horta et al. (2004) que verifica a presença de ligação antígeno-anticorpo anti-*Rickettsia rickettsii* através de uma etapa inicial de triagem e uma etapa de titulação. Em particular, esta parte do trabalho foi feita em estreita colaboração dos acadêmicos André P. Almeira e Julia D. Silva, da ESALQ. Na triagem, inicialmente uma parte da amostra de cada animal foi colocada em uma lâmina contendo抗ígenos da bactéria *R. rickettsii*. Assim, possíveis anticorpos específicos presentes no soro do animal ligam-se à bactéria presente na lâmina. Em seguida, são adicionados anti-anticorpos contendo fluorocromos (elementos que garantem a fluorescência), e estes ligam-se aos anticorpos do animal. Em cada lâmina havia controle positivo e negativo. As ligações antígeno-anticorpo marcadas com os fluorocromos foram visualizadas num microscópio UV (Figura 3) onde os elementos de cor verde representam as ligações antígeno-anticorpo. As diluições foram feitas em uma proporção de 1:64. As amostras tidas como positivas na triagem passaram então para a etapa de titulação, onde foram tituladas até alcançarem seu maior título.

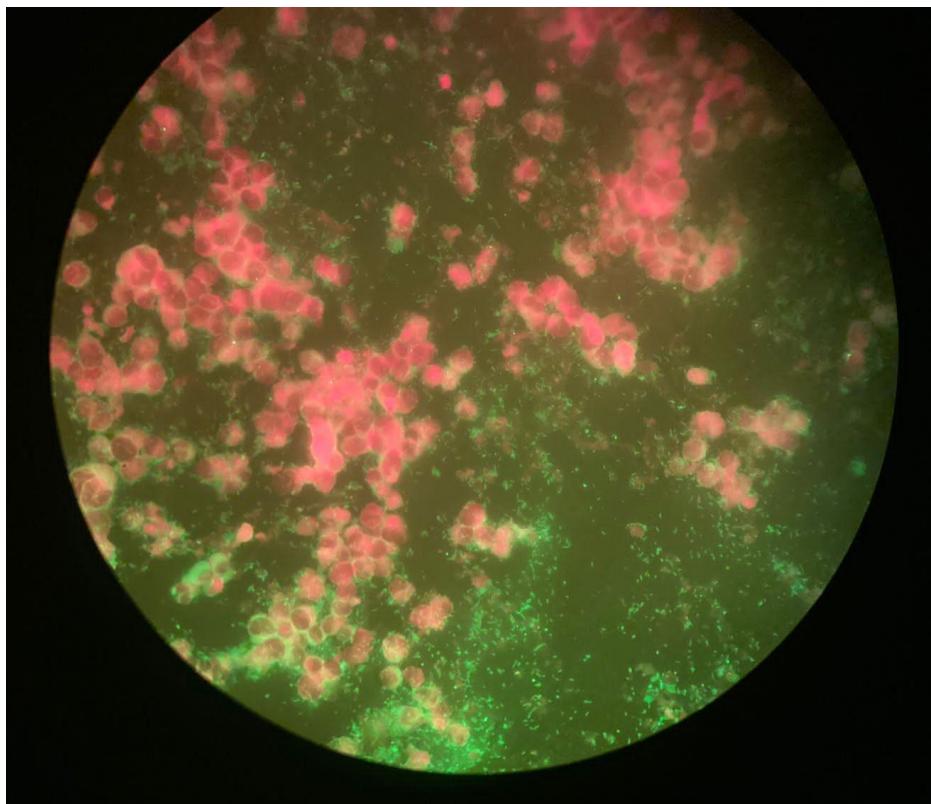


Figura 3. Observação em microscópio de uma lâmina contendo amostra do soro de gambá, durante a etapa de triagem das amostras. Em vermelho, células e outros elementos orgânicos que não são de interesse. Em verde, ligações antígeno-anticorpo representando possíveis cocobacilos de *Rickettsia rickettsii*.

Os carapatos que estavam parasitando os gambás capturados foram identificados, também no Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ, sendo transportados dentro dos próprios frascos onde foram guardados e estes, por sua vez, dentro de uma caixa de isopor. A identificação a nível de espécie, feita com a orientação do Dr. Thiago F. Martins, do mesmo laboratório, foi possível para os estágios de ninfa e adulto, sendo que as larvas foram identificadas somente como pertencentes ao gênero *Amblyomma*. As identificações foram realizadas por observação em lupa com o auxílio de chaves de identificação taxonômica (Barros-Battesti et al., 2006; Martins et al., 2010).

6.4 Análise dos dados

Todos os dados foram tabulados e submetidos a análises estatísticas, com a colaboração direta do Dr. Emiliano A. Brandão e da Dra. Adriane da F. Duarte, Pós-doutorandos da ESALQ, sendo realizada inicialmente a análise de normalidade, com Shapiro $\geq 0,05$, homodasticidade com Bartlett $\geq 0,05$, uma vez que os dados não atingiram os pressupostos estatísticos, análise não-paramétrica foi aplicada, utilizando Kruskal-Wallis em substituição a anova paramétrica ($p \leq 0,05$), para análise do comprimento e peso médio de gambás com e sem bactéria. Enquanto para as comparações absolutas de

gambás com carrapatos e considerados com bactérias nos diferentes pontos de coletas, aplicou-se o teste de Fisher, realizando a combinação das amostras independentes.

6.5 Integração dos dados e priorização das áreas

Esta etapa pode ser descrita como a análise, em conjunto, de todos os dados obtidos e a utilização desta para elaboração do protocolo de priorização. Posteriormente, o protocolo permanecerá à disposição da prefeitura de Piracicaba.

A equipe responsável pela obtenção dos dados requeridos foi composta por profissionais ligados às seguintes instituições: ESALQ (J. Dotoli, E. Veiga, J. Mandro, Dr. C. Perez, Profa. O. Queiroz, Prof. G. Moraes); FMVZ - USP São Paulo (Prof. M. Labruna, L. Binder, M. Serpa, T. Martins); UNESP Jaboticabal (Profa. D. Battestti); profissionais do Centro de Controle de Zoonoses, Secretaria de Saúde, Vigilância Epidemiológica (G. Perencin) e Secretaria de Defesa do Meio Ambiente da Prefeitura de Piracicaba (Dra. M. Curi).

7. Resultados

No total foram capturados 115 gambás (15 deles foram capturados no ano de 2021, como parte do trabalho aqui descrito), sendo que 71 indivíduos (61%) corresponderam a fêmeas e 44 (39%) a machos (Tabela 1). De todos os gambás capturados, 25,7 % das fêmeas e 26,7 % dos machos puderam ser detectados como portadores de carrapatos. O gambá que apresentou maior infestação por carrapatos foi o de número 3 (Tabela 1) capturado na área do bairro Bongue. Dentre todos os animais capturados, apenas um morreu (antes de ser identificado com brinco) por motivos desconhecidos.

Tabela 1. Dados biométricos, de níveis de parasitismo pelo carrapato-estrela e de infecção por *Rickettsia rickettsii* de gambás (*Didelphis* spp.) capturados nos locais de estudo (regiões do município de Piracicaba).

Animal (nº do brinco)	Sexo	Comprimento (cm)	Peso (kg)	Carrapatos				Sorologia (Titulação) ⁽²⁾	Obs. ⁽³⁾
				Total	Larvas	Ninfas ⁽¹⁾	Adultos ⁽¹⁾		
Horto de Tupi									
1	F	71	1,2	4	4	0	0	512	P
15	F	60	1,0	0	-	-	-	N	L
16	F	37	0,25	0	-	-	-	N	
57	M	44	0,2	0	-	-	-	N	
72 B	F	62	1,05	1	1	0	0	<64	
73 B	F	65	0,7	2	2	0	0	<64	
74 B	F	63	0,8	2	2	0	0	N	

Cont.

Cont.

75 B	M	81	1,5	4	0	1S+3D	0	N	
76 B	F	62	0,7	6	6	0	0	N	
77 B	F	63	0,7	0	-	-	-	N	
78 B	F	72	0,95	1	0	1D	0	N	
17	M	39	0,25	0	-	-	-	N	
18	M	41	0,25	0	-	-	-	N	
19	M	31	0,2	0	-	-	-	N	
20	F	79	1,3	1	0	0	1D	N	
Santa Rita									
41	F	65	0,85	1	1	0	0	N	P
42	F	69	1,25	0	-	-	-	N	L
43	F	53	0,5	0	-	-	-	N	P
81	F	58	0,85	0	-	-	-	N	
58	F	49	0,5	0	-	-	-	N	
59	M	37	0,1	2	0	2D	0	N	
51	F	60	1,0	0	-	-	-	N	P
52	M	24	0,2	0	-	-	-	N	
45	M	41	0,25	0	-	-	-	N	
46	M	46	0,3	0	-	-	-	N	
47	M	29	0,1	0	-	-	-	N	
48	F	63	1,0	0	-	-	-	128	
49	M	64	0,95	7	2	5D	0	N	
50	F	56	0,55	0	-	-	-	<64	
44	M	44	0,25	0	-	-	-	<64	
São Francisco									
64	M	65	1,45	180	85	7S+19D	60S+9D	N	
70	F	60	0,95	64	27	5S+20D	8S+4D	1024	
71	F	60,5	0,95	0	-	-	-	N	
72 A	M	67	1,1	0	-	-	-	N	
74 A	F	61	0,65	0	-	-	-	N	
87	F	65	1,0	0	-	-	-	2048	P
81	F	65	0,8	0	-	-	-	<64	
83 B	F	60	1,05	0	-	-	-	N	P
93	M	76	1,7	195	188	6S	1S	N	
60	M	52	0,5	0	-	-	-	N	
61	F	56	0,7	0	-	-	-	N	
62	F	49	0,4	0	-	-	-	<64	
63	F	57	0,55	0	-	-	-	N	
64	F	60	0,9	0	-	-	-	N	
80 B	F	62	0,65	0	-	-	-	<64	P
Distrito industrial Unileste									
97	M	61	0,9	0	-	-	-	N	
21	F	35	0,15	0	-	-	-	N	
22	M	38	0,2	0	-	-	-	N	
23	F	38	0,2	0	-	-	-	N	
24	F	37	0,2	0	-	-	-	N	
25	M	33	0,15	0	-	-	-	N	
26	F	38	0,2	0	-	-	-	N	
27	F	70	1,2	0	-	-	-	N	L
28	M	87	1,75	0	-	-	-	N	

Cont.

Cont.

29	F	40	0,2	0	-	-	-	-	N	
30	F	41	0,15	0	-	-	-	-	N	
31	F	42	0,15	0	-	-	-	-	<64	
32	F	75	1,3	0	-	-	-	-	N	L
33	F	69	1,15	0	-	-	-	-	N	
34	M	64	1,3	0	-	-	-	-	N	
Piracicamirim										
65	F	67	0,9	0	-	-	-	-	N	
66	F	60	0,945	18	9	1S+7D	1S	-	N	
67	M	73	1,6	0	-	-	-	-	N	
69	M	67	1,85	0	-	-	-	-	N	
73 A	F	54	0,75	0	-	-	-	-	N	
75 A	M	70	1,45	0	-	-	-	-	N	
76 A	M	64	1,35	0	-	-	-	-	N	
77 A	F	67	1,0	0	-	-	-	-	N	
78 A	F	70	1,0	0	-	-	-	-	N	
79	F	64	1,0	0	-	-	-	-	N	
88	M	53	0,75	0	-	-	-	-	N	
89	F	64	1,25	0	-	-	-	-	512	P
86	F	70	1,45	0	-	-	-	-	N	
82	F	63	1,0	0	-	-	-	-	N	
85	F	70	1,0	0	-	-	-	-	N	
80 A	M	65	0,85	0	-	-	-	-	N	
84	M	64	1,15	0	-	-	-	-	N	
83 A	F	67	1,3	0	-	-	-	-	N	
90	F	60	0,75	0	-	-	-	-	1024	P
92	F	60	1,05	3	3	0	0	-	N	P
94	M	67	1,45	0	-	-	-	-	N	
Rio Piracicaba / Bongue										
95	M	65	1,05	9	4	2D	3S	-	N	
2	F	72	1,05	4	4	0	0	-	N	P
3	F	61	1,1	662	377	84S+37D	136S+28D	1024		
113	F	61	0,7	212	189	5S+17D	1S	<64		
71	F	75	1,05	1	1	0	0	<64		
79	F	73	0,9	0	-	-	-	-	N	L
4	F	67	1,25	1	1	0	0	512		P
5	F	70	0,85	6	1	4D	1S	-	N	P
6	F	65	1,05	18	13	1D	3S+1D	-	N	L
7	M	64	1,05	60	58	1S	1D	1024		
8	F	69	0,9	192	165	11S+8D	5S+3D	-	N	L
9	M	54	1,0	59	46	2S+3D	7S+1D	-	N	
10	M	71	1,7	0	-	-	-	-	N	
11	F	60	1,45	0	-	-	-	-	N	P
12	M	60	1,2	0	-	-	-	-	256	
13	F	60	0,95	0	-	-	-	-	512	L
14	F	60	1,0	0	-	-	-	-	128	L
5	F	70	0,85	0	-	-	-	-	N	P
Rio Piracicaba / Shopping										
35	F	65	1,25	0	-	-	-	-	2048	P
36	F	40	0,3	0	-	-	-	-	N	

Cont.

Cont.

37	F	44	0,3	0	-	-	-	-	N	
65	F	56	0,65	0	-	-	-	-	64	
66	M	49	0,35	0	-	-	-	-	N	
67	M	46	0,35	0	-	-	-	-	N	
53	M	57	0,85	0	-	-	-	-	N	
54	M	66	0,9	0	-	-	-	-	N	
55	F	57	0,7	0	-	-	-	-	N	P
56	F	64	1,2	0	-	-	-	-	N	L
69	M	54	0,65	20	16	4D	0	0	N	
68	M	51	0,66	2	2	0	0	0	<64	
82	M	54	0,9	4	4	0	0	0	N	
38	M	39	0,25	0	-	-	-	-	N	
39	M	40	0,25	0	-	-	-	-	N	
40	M	36	0,2	0	-	-	-	-	64	

⁽¹⁾ D = *Amblyomma dubitatum*, S = *A. sculptum*. ⁽²⁾ N = soronegativos. (3) L = lactante (amamentando), P = prenhe.

Dos gambás capturados, 17 eram fêmeas prenhes e 10 eram lactantes (Figura 4).



Figura 4. Filhotes de gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*) se amamentando dentro do marsúpio (bolsa) da mãe.

Ao longo da análise sorológica (RIFI), 26 animais foram acusados como soropositivos durante a fase de triagem das amostras de soro [30,0% das fêmeas e 11,1% dos machos (Figura 5), o que corresponde a 21 e 5 indivíduos respectivamente], sendo a maior parte gambás oriundos do trecho correspondente ao bairro Bongue, às margens do rio Piracicaba.

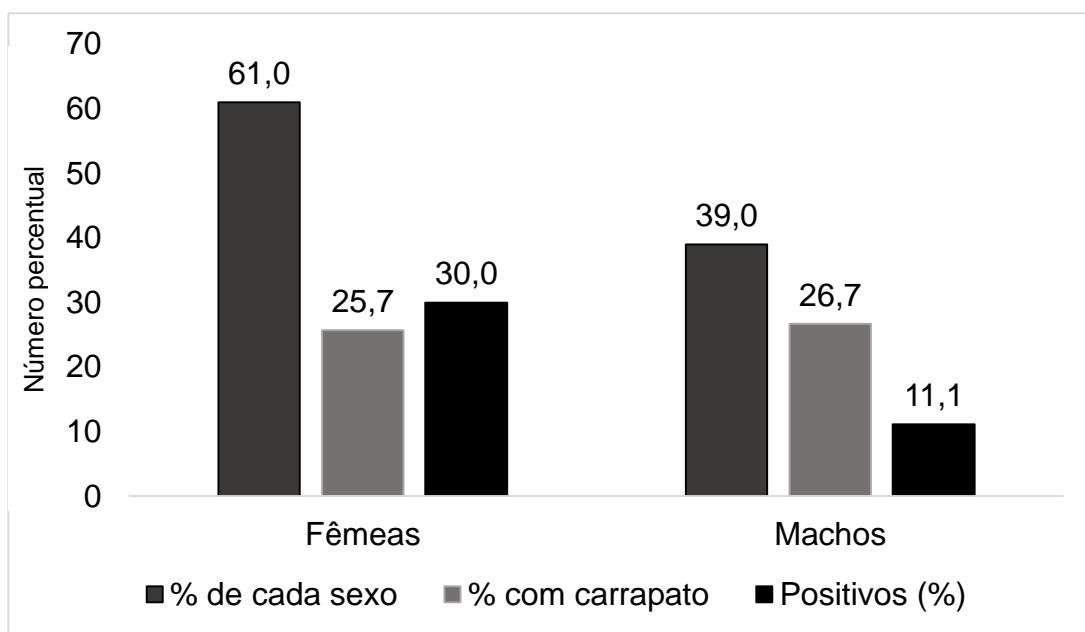


Figura 5. Percentual de gambás fêmeas e machos capturados e também percentual de indivíduos que estavam infectados com a bactéria segundo a etapa de triagem da análise sorológica.

Para cada gambá, a titulação para *R. rickettsii* foi comparada com a titulação para *R. bellii*. Considerou-se como soropositivo para *R. rickettsii* apenas os gambás cujo título foi pelo menos 4 vezes maior que o título para *R. bellii*. Isto foi observado nos gambás de números 1 (Horto de Tupi), 3, 4, 13, (trecho Bongue), 35 (trecho Shopping), 70, 87 (bairro São Francisco), 89, 90 (trecho Piracicamirim) como mostrado na Tabela 2. Os demais animais, mesmo quando acusados como soropositivos na etapa de triagem da RIFI, não foram considerados como soropositivos para *R. rickettsii* por ter seu título sido menor do que 4 vezes o título de *R. bellii*. Isto indica que a soropositividade para *R. rickettsii* foi observada em 7,8% dos gambás capturados, todos eles fêmeas.

Tabela 2. Quantidade de gambás (*Didelphis* spp.) soropositivos na triagem da RIFI e a titulação encontrada em suas respectivas amostras tanto para *Rickettsia rickettsii* quanto para *Rickettsia bellii*, confirmando-se a titulação de *R. rickettsii* quando o título observado foi igual ou maior que 4 vezes o título para *R. bellii* (linhas coloridas).

Identificação do gambá	Titulação para <i>R. rickettsii</i>	Titulação para <i>R. bellii</i>
Horto de Tupi		
1	512	< 64
72 B	< 64	< 64
73 B	< 64	< 64
Bairro Santa Rita		
44	< 64	< 64
48	128	< 64
50	< 64	< 64
Bairro São Francisco		
62	< 64	< 64
70	1024	< 64
80 B	< 64	< 64
81	< 64	< 64
87	2048	< 64
Distrito Unileste		
31	< 64	< 64
Ribeirão Piracicamirim		
89	512	< 64
90	1024	128
Bairro Bongue		
3	1024	256
4	512	128
7	1024	1024
12	256	256
13	512	< 64
14	128	64
12	256	256
113	< 64	128
Rio Piracicaba - Shopping		
35	2048	< 64
40	64	< 64
65	64	< 64
68	< 64	< 64

Com relação ao comprimento e peso médio dos machos capturados, diferenças significativas não foram observadas ($p \geq 0,05$) entre gambás infectados (soropositivos) e não infectados (soronegativos) (Figura 6), com comprimento médio de $54,8 \pm 2,28$ e $51,0 \pm 1,70$ cm para infectados e não infectados respectivamente. Enquanto que o peso médio foi de $0,82 \pm 0,08$ e $0,67 \pm 0,07$ cm também para infectados e não infectados.

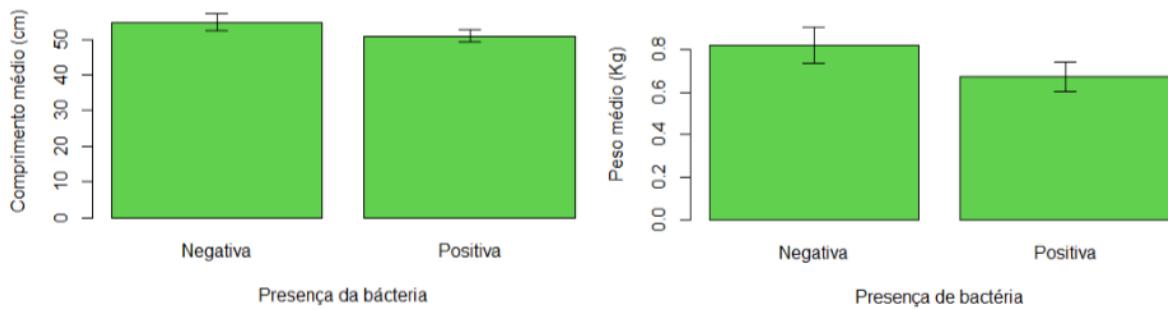


Figura 6. Comprimento médio (cm) e peso médio (kg) de machos não infectados e infectados por bactéria. Barras indicam os respectivos erros padrões. Os animais foram considerados infectados aqui segundo a etapa de triagem da análise sorológica.

Ao analisar todas as fêmeas capturadas, com relação ao comprimento e peso médio, diferenças significativas não foram observadas ($p \geq 0,05$) entre gambás não-infectados e infectados (Figura 7), com comprimento médio de $59,7 \pm 1,37$ e $61,4 \pm 0,83$ cm, respectivamente. Enquanto, o peso médio foi de $0,82 \pm 0,03$ e $0,77 \pm 0,04$ cm também para não infectados e infectados.

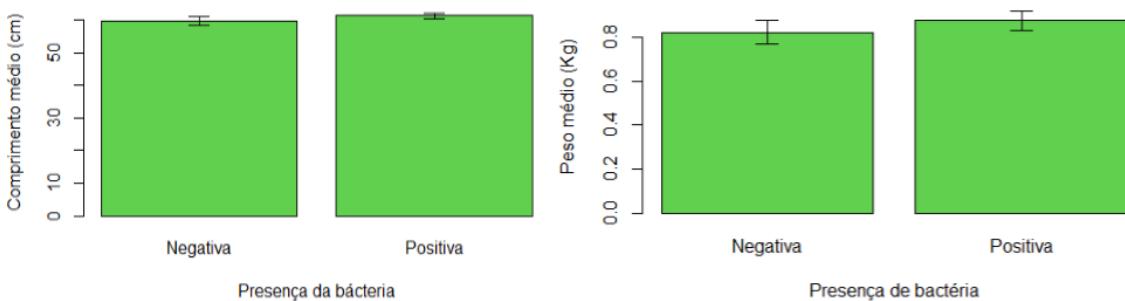


Figura 7. Comprimento médio (cm) e peso médio (kg) de fêmeas infectadas e não infectadas por bactéria. Barras indicam os respectivos erros padrões. Os animais foram considerados infectados aqui segundo a etapa de triagem da análise sorológica.

Quando agrupados fêmeas e machos capturados por ponto de coleta, foi possível verificar que embora não tenha havido grande variação na captura, o número de gambás com carrapatos em cada ponto de coleta variou de 0-11 indivíduos, o que correspondeu a 0 - 61% de infestação com relação ao total coletado por ponto, ou seja, de prevalência (Tabela 3). A região do Distrito Unileste teve o menor número de gambás com carrapatos e também o menor percentual de gambás considerados soropositivos para ambas as espécies de *Rickettsia* (7%), seguida pela região do Ribeirão Piracicamirim (9%), enquanto as regiões do bairro Bongue e Horto do Tupi foram as de maior prevalência, embora as regiões com maiores números de animais soropositivos tenham sido os bairros Bongue e São Francisco (Tabela 3).

Tabela 3. Pontos de coleta com o percentual de gambás capturados (n= 115 no total), percentual dos animais com carrapatos e percentual de soropositivos para as bactérias *Rickettsia bellii* e *Rickettsia rickettsii* em relação ao total de capturas do respectivo local; número absoluto entre parênteses.

Ponto de coleta	% de gambás (nº)	% com carrapatos (nº)	% soropositivos (nº)
Santa Rita	13,0 (15)	20,0 (3) ab*	20,0 (3) ab*
São Francisco	13,0 (15)	20,0 (3) ab	33,0 (5) ab
Unileste	13,0 (15)	00,0 (0) a	07,0 (1) a
Horto do Tupi	13,0 (15)	53,0 (8) b	20,0 (3) ab
Shopping	14,0 (16)	19,0 (3) ab	25,0 (4) ab
Bongue	15,7 (18)	61,0 (11) bc	44,0 (8) b
Piracicamirim	18,3 (21)	09,0 (2) a	09,0 (2) a
Total	100 (115)	26 (30)	22,6 (26)

*Significativo pelo teste de Fisher ($p \leq 0,05$), sendo as comparações realizadas na coluna (entre os pontos de coleta).

No total, foram coletados 1741 carrapatos dos gambás capturados, dos quais 1211 (70%) eram larvas (todas identificadas como *Amblyomma* sp.) e 530 (30%) estavam na fase de ninfa e adulto quando foram identificados, sendo 349 (20%) pertencentes à espécie *A. sculptum* e 181 (10%), à espécie *A. dubitatum*. Esta última espécie também pode ser infectada por *R. rickettsii*, sendo importante na transmissão do patógeno de uma capivara a outra ou mesmo ao gambá. No entanto, não é importante na transmissão direta ao ser humano, por não parasitar o ser humano. Dos carrapatos coletados, 268 destes adultos foram coletados como ninfas e 106 das ninfas foram coletadas como larvas, passando por ecdise enquanto estavam dentro do tubo. O parasitismo por espécies de carrapatos nos gambás de acordo com cada local de estudo é mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Proporção (%) de gambás parasitados por carapatos nos locais de estudo (regiões do município de Piracicaba) e percentual de gambás com carapatos de cada local em relação ao total de gambás parasitados. Larvas não estão sendo consideradas aqui.

Local	Somente <i>Amblyomma sculptum</i> (A. s.)	Somente <i>Amblyomma dubitatum</i> (A. d.)	Mista ⁽¹⁾	A. s. + A. d. + mista	% de gambás parasitados do total
Distrito Unileste	0	0	0	0	0
Horto de Tupi	0	13	7	20	26,7
Piracicamirim	0	0	5	5	6,7
Rio P. – Bongue	0	0	44	44	36,7
Rio P. – Shopping	0	6	0	6	10
São Francisco	7	0	13	20	10
Santa Rita	0	13	0	13	10

⁽¹⁾ Parasitados pelas duas espécies de *Amblyomma* conjuntamente.

O local onde houve maior proporção de infecção (soropositividade) confirmada de *R. rickettsii* em comparação a *R. bellii* em gambás foi o trecho do bairro Bongue, onde 17% dos gambás capturados naquele local foram confirmados como soropositivos para *R. rickettsii* na etapa de titulação da análise sorológico (Tabela 5). Em contrapartida, o local onde foi detectada menor taxa de infecção foi o trecho do Distrito Industrial Unileste, onde apenas um gambá foi acusado como soropositivo na triagem da análise sorológico, porém tendo título para *R. rickettsii* menor do que 4 vezes o título de *R. bellii*. (Tabela 5).

Tabela 5. Proporção (%) de gambás que foram confirmados como soropositivos para *Rickettsia rickettsii* (segundo a etapa de titulação da análise sorológico) nos locais de estudo (regiões do município de Piracicaba) e titulação média da bactéria por local.

Local	Gambás soropositivos			Titulação média para <i>R. rickettsii</i>
	N	% do local	% do total	
Distrito Unileste	0	0	0	< 64
Horto de Tupi	1	7	11,1	≈ 256
Piracicamirim	2	10	22,2	≈ 768
Rio P – Bongue	3	17	33,3	≈ 448
Rio P. – Shopping	1	6	11,1	≈ 512
São Francisco	2	13	22,2	≈ 640
Santa Rita	0	0	0	< 64

8. Discussão

8.1 Validação da metodologia

A disponibilidade dos gambás-de-orelha-branca é essencial para que o método possa ser empregado, como citado por Ortiz (2018). No trabalho aqui relatado, foi confirmada a presença abundante destes em todos os locais de estudo, exceto no Horto de Tupi, onde a grande maioria dos animais capturados era gambás-de-orelha-preta. Não foi possível determinar a razão desta diferença, mas é possível que isto esteja ligado às condições mais naturais daquele local, provavelmente facilitando o desenvolvimento de maiores populações do gambá-de-orelha-preta, e menor população do gambá-de-orelha-branca.

A captura de gambás para a análise sorológico mostrou-se satisfatória pelo uso da laranja como atrativo, validando o método utilizado por Ortiz (2018). Em pré-testes realizados antes do início oficial do projeto, outras iscas (banana e ovo de galinha cozido)

foram usadas nas armadilhas, mostrando-se menos eficientes do que a laranja. Trata-se de um método simples, seguro e de muito mais fácil uso do que a captura de capivaras. Uma vez capturados, os animais podem ser facilmente conduzidos para um laboratório, onde as amostras de sangue puderam ser facilmente obtidas para análise sorológica, sem estressar os animais.

A facilidade de manutenção dos gambás em laboratório também foi validada, uma vez que eles são de fácil manejo, tem dieta generalista e apresentaram elevada taxa de sobrevivência em cativeiro. Sua manutenção foi viável nas condições experimentais, em que foram mantidos em local arejado, com água abundantemente oferecida a cada dia, e alimentados diariamente com frutas, verduras e sobras de alimentação humana.

A manutenção destes sobre uma bandeja com maravalha durante cinco dias foi suficiente para se coletar os carapatos, que mantidos em laboratório sob umidade alta permitiram a obtenção de carapatos nos estágios de ninfa e adulto, possibilitando a identificação. O método de obtenção dos carapatos em laboratório foi validado (adaptado de Perez et al., 2008), mostrando-se muito mais prático e eficaz do que a inspeção manual de cada gambá, a qual é trabalhosa e sujeita ao risco de o coletor deixar de encontrar carapatos (principalmente larvas, que são menores) por ficarem ocultos entre os pêlos do gambá. No entanto, o método pode ser feito de forma mais eficiente pela colocação de duas bandejas de tamanhos semelhantes sobrepostas sob cada gaiola em que os gambás são mantidos, fazendo-se um orifício no centro da bandeja superior, na qual a maravalha será depositada. Isto facilita o escoamento da urina do animal para a bandeja inferior, sendo esta retirada diariamente da bandeja inferior para descarte.

Dentre todos os gambás capturados, apenas 7,8% (9 animais) foram confirmados como soropositivos para *R. rickettsii*, sendo todos fêmeas, das quais 6 estavam prenhas e 1 estava lactante. Destes 9 animais soropositivos, o menor comprimento detectado foi de 60 cm e o maior foi de 71 cm, enquanto que o menor peso foi de 0,75 kg (gambá nº 90) e o maior foi de 1,25 kg (em 3 animais).

Os dados sugerem que independentemente de se encontrar ou não a presença de carapatos nos gambás, estes poderão ser considerados no processamento. No presente trabalho foi verificado que em vários dos animais soropositivos não foram encontrados carapatos (inclusive alguns dos gambás com maiores titulações de *R. rickettsii*). Porém,

ainda assim, a detecção de carapatos parasitos nos gambás ou de carapatos de vida livre nos locais de estudo é uma etapa muito importante a ser incluída no protocolo, uma vez que o carapato é o vetor da FMB e, portanto, é o agente responsável por transmitir o patógeno aos seres humanos.

A hipótese de que gambás poderiam ser usados como organismos sentinelas para a presença de *R. rickettsii* e poderiam substituir as capivaras para a elaboração do protocolo de priorização de áreas foi confirmada, entrando em acordo com as evidências de que gambás são amplificadores da bactéria e contribuem para sua transmissão horizontal a carapatos conforme demonstrado por Horta et al. (2009) e Melo et al. (2016). Os animais analisados apresentaram níveis de titulação de bactéria e/ou de infestação por carapatos relativamente proporcionais ao histórico de casos de FMB em seres humanos em cada local de estudo, com exceção do bairro São Francisco, onde não há registros de casos recentes da enfermidade apesar dos dados obtidos naquele local ao longo do presente trabalho.

Os resultados do presente estudo sugerem em primeiro lugar que, para maior precisão dos dados, teria sido conveniente a captura de um número maior de gambás por local, tendo em vista que a se considerar a proporção de gambás infectados, o número esperado de gambás parasitados seria de 1,2/ 15. No estudo conduzido por Ortiz (2018), a proporção de gambás soropositivos para *R. rickettsii* foi de 54,5%. Portanto, sugere-se que para o protocolo em preparação, estabeleça-se que sejam capturados 25 gambás de cada área estudada.

Os dados também sugerem que os gambás infectados sejam em sua maioria fêmeas (talvez prenhes). Infelizmente, as características relativas a sexo e estado de prenhez não foram relatadas por Horta et al. (2009) ou por Ortiz (2018). Certamente, a elucidação destes aspectos é importante do ponto de vista científico, não existindo, no entanto, até o momento, informação que dê suporte à aparente relação entre sexo, prenhez e infecção por *R. rickettsii*. Por esta razão, é possível que a relação observada no presente estudo seja apenas casual. Seria importante avaliar-se esta possível (porém não provável) relação em trabalhos futuros, tendo em vista a importância prática deste assunto no que se refere ao uso dos gambás como animais sentinelas no protocolo de determinação de áreas prioritárias para a prevenção da FMB. Finalmente, os dados sugerem que tanto

animais pequenos quanto grandes possam estar infectados, podendo assim animais de diferentes tamanhos serem considerados no citado protocolo.

8.2 Áreas a serem priorizadas

Dentre os 7 locais onde o presente trabalho foi realizado, podem ser destacados como áreas prioritárias para ações de prevenção da FMB: o bairro São Francisco em primeiro lugar, o bairro Bongue em segundo lugar e o Ribeirão Piracicamirim em terceiro lugar, tendo-se em todos estes locais determinada a presença de gambás soropositivos para *R. rickettsii*. É adequado notar que apenas três locais foram destacados mas um número maior de locais poderia ser selecionado pelos órgãos públicos para ações preventivas, de vez que outros também apresentam riscos aos seres humanos.

Apesar de não haver registros recentes de casos de FMB no bairro São Francisco, este foi um local com alta taxa de soropositividade de *R. rickettsii* nos gambás (22,2%). Além disso, é extremamente importante notar que neste bairro existem, bem próximo às lagoas, várias residências, duas escolas primárias e uma empresa.

O trecho do bairro Bongue, como foi observado nos resultados do presente trabalho, concentrou a maior parte dos gambás infectados por *R. rickettsii* (33,3%). Além disso, este local recebe constante visitação de pessoas, seja para lazer, trabalho ou porque residem naquela região. Outro detalhe importante é que recentemente uma pessoa que foi à óbito por FMB supostamente foi infectada neste local.

Também no ribeirão Piracicamirim, 22,2% dos gambás foram confirmados como soropositivos para *R. rickettsii*. Além disso, neste local foi detectada maior titulação média para esta bactéria ($\cong 768$). Neste trecho, encontra-se um grande número de residências, lojas, uma escola, um clube e áreas de lazer públicas. As capivaras não são encontradas neste local durante o dia, tendo em vista a proximidade ao câmpus da ESALQ, onde estas permanecem durante o dia, e de onde saem à noite em busca de alimento às margens do Piracicamirim.

É importante notar que, devido à enorme quantidade de fatores bióticos e abióticos envolvidos no ciclo da FMB, é possível que o nível de perigo dos locais altere-se ao longo do tempo. Portanto, sugere-se que novas avaliações sejam conduzidas, ao se decidir por novas ações preventivas no futuro.

9. Conclusões

- Gambás podem ser usados como organismos sentinelas da FMB no município de Piracicaba, substituindo as capivaras pela maior facilidade de capturas da primeira espécie.
- Na escolha de áreas a serem priorizadas para ações de prevenção à ocorrência da FMB, dentre os locais estudos devem ser priorizados as lagoas do bairro São Francisco, o trecho do rio Piracicaba no bairro Bongue e o trecho do Ribeirão Piracicamirim, nas proximidades do bairro Santa Cecília.

10. Agradecimentos

À Comissão Técnica de Prevenção e Controle da Febre Maculosa da ESALQ-USP pela oportunidade e por todo apoio técnico. Ao Programa “Aprender na Comunidade”, da Pró-Reitoria de Graduação da Universidade de São Paulo, por viabilizar a execução do presente trabalho.

Ao Prof. Dr. Gilberto Moraes por supervisionar o projeto em meio a inúmeros outros trabalhos e se preocupar com o aprendizado dos estagiários. Ao Dr. Carlos A. Perez, pela ajuda ao longo do projeto. Ao Prof. Marcelo B. Labruna, Dr. Thiago Martins, Lina C. Binder e Maria C. A. Serpa, do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ pela orientação no que se refere aos estudos sorológicos e identificação dos carapatos.

Ao técnico de campo Josenilton Luiz Mandro pela gigantesca ajuda nas atividades de campo. Imensos agradecimentos aos colegas do laboratório de Acarologia da ESALQ-USP e estagiários da Comissão pela ajuda na alimentação dos gambás: Elias Figueredo, Sofía Jimenez, Lina Gonzales, Alan Nunes, João Martin, Ivan Valerio, Edvangela C. Neves e Carolina Vitti. Imensos agradecimentos a Adriane F. Duarte e Emiliano A. Brandão pela inestimável contribuição com os cálculos estatísticos.

11. Referências

- Angerami, R.N. (2011) **Febre maculosa brasileira no estado de São Paulo: aspectos clínicos e epidemiológicos.** Tese (Doutorado). Campinas, SP. Universidade Estadual de Campinas.
- Associação Paulista de Medicina (2021). **Febre maculosa: País teve 273 casos confirmados em 2019.** Disponível em: <<http://associacaopaulistamedicina.org.br/noticia/febre-maculosa-pais-teve-273-casos-confirmedos-em-2019>> Acesso em 10/10/2021.
- Barros-Battesti, D.M.; Arzua, M.; Bechara, G.H. (2006). **Carapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies;** por Darci Moraes Barros-Battesti, Márcia Arzua e Gervásio Henrique Bechara. São Paulo, VoxlICTTD-3/Butantan.
- Bozeman, F.M.; Shirai, A.; Humphries, J.W.; Fuller, H.S. (1967). Ecology of Rocky Mountain Spotted Fever. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 16, n. 1, p. 48–59.
- Brasil. Ministério da Saúde (2018). **Sistema Nacional de Agravos de Notificação – SINAM.** Brasília, DF. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/febremaculosabr.def>>. Acesso em: 29 maio de 2021.
- Brasil. Ministério da Saúde (2020). **Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória do Ministério da Saúde.** Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2020/prt0264_19_02_2020.html>. Acesso em 14/06/2021.
- Burgdorfer, W. (1988.) Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus. In: WALKER, D. H. (Ed.). **Biology of Rickettsial Diseases**, Boca Raton, FL: CRC Press. p. 33-50.
- Cáceres, N.C. (2002). Food habits and seed dispersal by the White-Eared opossum *Didelphis albiventris* in Southern Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 37, n. 2, p. 97–104.
- Cáceres, N.C. (2003). Use of the space by the opossum *Didelphis aurita* Wied-Newied (Mammalia, Marsupialia) in a mixed forest fragment of southern Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 20, n. 2, p. 315–322.

Cáceres, N.C.; Monteiro-Filho, E.L.A. (1999). Tamanho corporal em populações naturais de *Didelphis* (Mammalia: Marsupialia) do Sul do Brasil. **Revista Brasileira de Biologia**, São Carlos, v. 59, n. 3, p. 461–469.

Chen, L.F., Sexton D.J. (2008). What's new in Rocky Mountain spotted fever?. **Infectious Disease Clinics of North America**. 22, p. 415-32.

CNN Brasil (2021). **Febre maculosa: quais são as causas, os sintomas e como prevenir a doença**. Disponível em: <<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/febre-maculosa-quais-sao-as-causas-os-sintomas-e-como-prevenir-a-doenca/>> Acesso em 10/10/2021.

Dantas-Torres, F. (2007). Rocky Mountain spotted fever. **The Lancet Infectious Diseases**. 7, p. 724-32.

Del Fiol F.S., Junqueira F.M., Rocha M.C.P., Toledo M.I., Barberato Filho S. (2010) **A febre maculosa no Brasil**. Revista Panamericana de Salud Pública, 27, p. 461–466.

Governo do Estado de São Paulo (2016). **Resolução Conjunta SMA/SES N° 01, de 1º de julho de 2016.** Disponível em: <<https://www.infraestruturaeioambiente.sp.gov.br/legislacao/2016/07/resolucao-conjunta-sma-ses-01-2016/>>. Acesso em 02 de outubro de 2021.

Greca H., Langoni H., Souza L. C. (2008). Brazilian spotted fever: a reemergent zoonosis, 2007. **J Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. 14, p. 3-18.

Guedes, E.; Leite, R.C.; Prata, M.C.A. et al. (2005). Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever–endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.8, p. 841-845.

Gurgel, C.B.F.M; Coutinho, E.R, Favoritto, P.C.; Ramos, F.; Proquere, L.P.; Magdalena, C.V.; Prioli, L.F. (2009). Investigações das riquetsioses: contribuições de cientistas brasileiros. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 7, p. 256-260.

Herrera, E.A. (2013). Capybara digestive adaptations. In: Moreira, J.R.; Ferraz, K.M.P.M.B.; Herrera, E.A.; MacDonald, D.W. (Ed.). **Capybara Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species**. Cap. 5, p. 97-106.

Horta, M.C.; Labruna, M.B.; Sangioni, L.A.; Vianna, M.C.B.; Gennari, S.M.; Galvão, M.A.M.; Mafra, C.L.; Vidotto, O.; Schumaker, T.T.S.; Walker, D.H. (2004). Prevalence of antibodies to spotted fever group Rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia Rickettsii* and another spotted fever group *rickettsia*. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97. Disponível em: <<http://www.ajtmh.org/content/71/1/93.full>>. Acesso em 02 de outubro de 2021.

Horta, M.C.; Moraes-Filho, J.; Casagrande, R.A.; Saito, T.B.; Rosa, S.C.; Ogrzewalska, M.; Matushima, E.R.; Labruna, M.B. (2009). Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p. 109-118.

International Union For Conservation Of Nature And Natural Resources – IUCN (2015). **The IUCN Red List of Threatened Species**. Versão 2015-4. Cambridge. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 02 de outubro de 2021.

Labruna, M.B. (2006). Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: **Simpósio Brasileiro de Acarologia. Anais...** UFV. p. 63.

Mares, M. A.; Ernest, K. A. (1995). Population and Community Ecology of Small Mammals in a Gallery Forest of Central Brazil. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 76, n. 3, p. 750.

Martins, L.A. (2014). **Efeitos da infecção por *Rickettsia rickettsii* sobre o perfil da expressão gênica do carrapato vetor *Amblyomma cajennense***. Dissertação (mestrado). Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia.

Martins, T. F.; Onofrio, V.C.; Barros-Battesti, D.|M.; Labruna, M.B. (2010). Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: Descriptions, redescriptions, and identification key. **Ticks and tick-borne diseases**, Jena, v. 1, n. 2, p. 75-99.

Martins, T.F.; Barbieri, A.R.M.; Costa, F.B.; Terassini, F.A.; Camargo, L.M.A.; Peterka, C.R.L.; Pacheco, R.C.; Dias, R.A.; Nunes, P.H.; Marcilli, A.; Scofield, A.; Campos, A.K.; Horta, M.C.; Guilloux, A.G.A.; Benatti, H.R.; Ramirez, D.G.; Barros-Battesti, D.M.; Labruna, M.B. (2016). Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). **Parasites & Vectors.** 9, p. 186.

Melo, A.L.T.; Aguiar, D.M.; Spolidorio, M.G.; Yoshinari, N.H.; Matushima, E.R.; Labruna, M.B.; Horta, M.C. (2016). Evidência sorológica de exposição a agentes transmitidos por carrapatos em gambás (*Didelphis* spp.) no estado de São Paulo, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 25, n. 3, p. 348-352.

Ortiz, F. T. (2018). **Ocorrência de infecção por *Rickettsia rickettsii* em hospedeiros do carrapato-estrela no Campus “Luiz de Queiroz”**. Dissertação (mestrado), Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo.

Paes de Araújo, R.; Navarro, M.B.M.A.; Cardoso, T.A.O. (2016). **Febre maculosa no Brasil: estudo da mortalidade para a vigilância epidemiológica**. Scielo Brazil. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/cadsc/a/7PWKZJsBkzsMQrMtBnNVdDb/?lang=pt> Acesso em: 01 de junho de 2021.

Perez, C.A. (2007) **Bioecologia e manejo do carrapato-estrela, *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), vetor da Febre Maculosa Brasileira**. 178 p. Tese (Doutorado em Ciências Florestais/ Conservação de Ecossistemas Florestais) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Perez, C.A. (2008). Novos paradigmas no controle na fase de vida livre do carrapato-estrela, vetor da febre maculosa, em ambientes peri - urbanos. **Vetores e Pragas**, ano XI, nº 18, p. 9-13.

Perez, C.A.; Almeida, A.F.; Almeida, A.; Carvalho, V.H.B.; Balestrin, D.C.; Guimarães, M.S.; Costa, J.C.; Ramos, L.A.; Arruda-Santos, A.D.; Máximo-Espíndola, C.P.; Barros-Battesti, D.M. (2008). Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, p. 210–217. Pinter, A.; Labruna, M.B. (2006). Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1078, p. 523-529.

Piza, J.T. (1932). **Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o Tifo Exantemático de São Paulo**. In: Tifo Exantemático de São Paulo (J. T. Piza, J. R. Meyer & L. Salles-Gomes, org.), p. 11-119, São Paulo: Sociedade Impressora Paulista.

Ramírez-Hernández, A.; Uchoa, F.; Serpa, M.C.A.; Binder, L.C.; Rodrigues, A.C.; Szabó, M.P.J.; Fogaça, A.; Souza, C.E.; Labruna, M.B. (2020). Clinical and serological evaluation of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) successively exposed to an *Amblyomma sculptum*-derived strain of *Rickettsia rickettsia*. **Nature, Scientific Reports**.

Ricketts, H. T. (1909). A Micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain Spotted Fever. **Journal of the American Medical Association**, v. 52, n. 5, p. 379–380.

Rohr, C.J. (1909). Estudo sobre Ixodidas no Brasil. **Rio de Janeiro: Gomes & Irmão**. 220 p.

Rossi, R. V.; Bianconi, G. V. (2011). **Oderm Didelphimorphia**. In: REIS, N. R. de et al. (Ed.). Mamíferos do Brasil. 2. ed. Londrina: UEL. p. 31–69. 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. (2005). Rickettsial infection in animals and brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270. Disponível em: <https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/11/2/04-0656_article>. Acesso em: Acesso em 02 de outubro de 2021.

Secretaria da Saúde de Piracicaba (2017). **Secretaria da Saúde orienta sobre febre maculosa.** Disponível em: <

<http://www.piracicaba.sp.gov.br/secretaria+da+saude+orienta+sobre+febre+maculosa.aspx> >. Acesso em 01/06/2021.

Silva, L.F.W. (1986). **Criação de capivaras em cativeiro.** São Paulo: Nobel, 1986. 69p.

Silva C.F., Oliveira E.F., Cunha E.M.F. (2013). Estrutura e dinâmica das populações de capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) em uma área de aberta e em uma Unidade de Conservação: Perspectivas para o manejo. **Revista em Agronegócios e Meio Ambiente**, v. 6, n.3, p. 497-515.

Soares, J. F.; Soares, H.S.; Barbieri, A.M.; Labruna, M.B. (2011). Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 139–151.

Sporn M.B., Roberts A.B., Goodman D.S. (eds) (1994). In *The Retinoids: Biology Chemistry and Medicine*, 2nd edn. New York: Raven Press.

Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) (2004). **Manual de Vigilância Acarológica.** São Paulo: Secretaria do Estado da Saúde. 62p.

Talamoni, S.A.; Dias, M. M. (1999). **Population and community ecology of small mammals in southeastern Brazil.** Mammalia, Berlin, v. 63, n. 2, p. 167–181.

Valbuena G., Walker D.H. (2005). Changes in the adherens junctions of human endothelial cells infected with spotted fever group rickettsiae. **Virchows Arch**, v. 446, p. 379-82.

Walker, D.H. (1989). Rocky Mountain spotted fever: a disease in need of microbiological concern. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 2, p. 227-40.

Walker, D.H. (2007). Rickettsiae and rickettsial infections: the current state of knowledge. **Clinical Infectious Diseases**, v. 45(suppl I): S39-S44.