LINA DE CAMPOS BINDER

Avaliação de possíveis variáveis epidemiológicas associadas à distribuição espacial da infecção por *Rickettsia rickettsii* em cães e carrapatos em uma área endêmica para febre maculosa brasileira na Região Metropolitana de São Paulo

São Paulo
2020

LINA DE CAMPOS BINDER

Avaliação de possíveis variáveis epidemiológicas associadas à distribuição espacial da infecção por *Rickettsia rickettsii* em cães e carrapatos em uma área endêmica para febre maculosa brasileira na Região Metropolitana de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo
2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3984
FMVZ

Binder, Lina de Campos

Avaliação de possíveis variáveis epidemiológicas associadas à distribuição espacial da infecção por *Rickettsia rickettsii* em cães e carrapatos em uma área endêmica para febre maculosa brasileira na Região Metropolitana de São Paulo / Lina de Campos Binder. – 2020.
70 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. Febre maculosa. 2. Cão doméstico. 3. *Rickettsia rickettsii*. 4. *Amblyomma aureolatum*. 5. Dinâmica populacional. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Maria Aparecida Laet, CRB 5673-8, da FMVZ/USP.

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação de possíveis variáveis epidemiológicas associadas à distribuição espacial da infecção por *Rickettsia rickettsii* em cães e carrapatos em uma área endêmica para Febre Maculosa Brasileira na Região Metropolitana de São Paulo.", protocolada sob o CEUA nº 1878230418 (ID 005818), sob a responsabilidade de **Marcelo Bahia Labruna e equipe; Lina de Campos Binder; Adriano Pinter dos Santos** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 21/11/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of possible epidemiological variables associated with the spatial distribution of *Rickettsia rickettsii* infection in dogs and ticks in an area endemic to Brazilian spotted Fever in the Metropolitan Region of São Paulo.", utilizing 4 Dogs (males and females), protocol number CEUA 1878230418 (ID 005818), under the responsibility of **Marcelo Bahia Labruna and team; Lina de Campos Binder; Adriano Pinter dos Santos** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 11/21/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **01/2019** a **06/2020**

Área: **Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal**

Origem: **Animais provenientes de doação espontânea**

Espécie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **0 a 8 anos**

N: **4**

Linhagem: **Beagle**

Peso: **4 a 11 kg**

Local do experimento: **Infectório experimental da SUCEN em Mogi Guaçu, SP**

São Paulo, 15 de setembro de 2020

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Universidade de São Paulo

São Paulo, 29 de abril de 2020
CEUA N 1878230418

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Marcelo Bahia Labruna

Área: Medicina Veterinária Preventiva E Saúde Animal

Título da proposta: "Avaliação de possíveis variáveis epidemiológicas associadas à distribuição espacial da infecção por *Rickettsia rickettsii* em cães e carrapatos em uma área endêmica para Febre Maculosa Brasileira na Região Metropolitana de São Paulo."

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ (ID 006153)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 26/fevereiro/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "EMENDA: inclusão de 15 cobaias (*Cavia porcellus*) No item 4.6 Infecção experimental do projeto, utilizamos quatro cães da raça Beagle conforme inicialmente previsto. Dos carrapatos expostos a esses cães, estamos mantendo a colônia em laboratório para posterior testes laboratoriais de detecção molecular de DNA de *R. rickettsii* na próxima geração de larvas dessa colônia, conforme inicialmente previsto. Foram obtidas mais de 50 fêmeas ingurgitadas dos cães, as quais estão neste momento ovipondo em laboratório, com o intuito de produzir larvas. Nosso plano inicial era fazer apenas detecção molecular por PCR nos ovos e larvas oriundas dessas larvas. Recentemente, a banca de qualificação deste projeto sugeriu fortemente que usássemos parte dessas larvas pra infestar cobaias, a fim de comprovar a competência vetorial e a viabilidade da *rickettsia* presente nas larvas. Sendo assim, estamos incluindo uma emenda nesse projeto, que consiste na inclusão de 15 cobaias (*Cavia porcellus*), cada uma para ser infestada com larvas oriundas de uma fêmea ingurgitadas. Como tivemos 3 cães infectados no estudo, a proposta inclui distribuir 5 cobaias para as larvas oriundas de pelo menos 5 fêmeas ingurgitadas que se alimentaram nos cães infectados. Com essa complementação na metodologia, teremos resultados muito mais sólidos sobre avaliação do cão como possível hospedeiro amplificado de *R. rickettsii* para carrapatos adultos da espécie *A. aureolatum*, pois estaremos complementando as análises com testes de competência vetorial, e não simplesmente detecção de DNA. Metodologia com as cobaias: as 15 cobaias serão compradas da Granja RG e serão alojadas em caixas individuais no Infectório do VPS para as infestações com carrapatos. As infestações experimentais consistirão na colocação de carrapatos (1000 larvas por animal) dentro de câmara de pano de algodão colada sob o dorso tricotomizado de cada animal, que será previamente anestesiado (60 a 80mg de cetamina + 8 a 15mg de xilazina, ambas /kg, Via: IM). Amostras de sangue serão colhidas nos dias 0, 21 do experimento, via intracardiaca em cobaias (1,5ml). A temperatura retal será mensurada diariamente das cobaias. Ao fim do experimento, as cobaias serão eutanasiadas com dose excessiva de anestésico (3 x a dose de anestesia descrita para coleta de sangue). As carcaças serão autoclavadas e descartadas como lixo biológico. Caso a cobaia soroconverta ao antígeno de *R. rickettsii* aos 21 dias após infestação, será comprovada a infecção das larvas por *R. rickettsii* e provada a sua competência vetorial para o agente."

Comentário da CEUA: "O pesquisador solicita a inclusão de 15 cobaias (*Cavia porcellus*) no estudo, para comprovar a competência vetorial e a viabilidade da *rickettsia* presente nas larvas oriundas dos carrapatos fêmeas ingurgitadas, que se alimentaram de cães infectados. A justificativa, assim como a descrição metodológica, foram bem apresentadas e certamente trarão benefícios complementares ao estudo. O pesquisador enviará a nota fiscal de compra destes animais no primeiro relatório".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

Camilla Mota Mendes
Vice-Coordenador

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
de São Paulo

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: BINDER, Lina de Campos

Título: Avaliação de possíveis variáveis epidemiológicas associadas à distribuição espacial da infecção por *Rickettsia rickettsii* em cães e carrapatos em uma área endêmica para febre maculosa brasileira na Região Metropolitana de São Paulo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Ao meu pai Thomas e aos meus avós Franz e Avany, verdadeiros entusiastas e amantes do conhecimento. Suas doces lembranças sempre estarão vivas em mim!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha mãe e à toda minha família, por serem sempre um porto seguro cheio de carinho e compreensão.

Ao Marcelo, por todas as oportunidades e ensinamentos comigo compartilhados ao longo desses sete anos. Por todos os campos e viagens sempre cheios de ensinamentos e de boas risadas!

Ao Grisi, por toda ajuda ao longo do mestrado, pelas longas reuniões, pela paciência e por todo o conhecimento comigo compartilhado. Esse trabalho não teria sido possível sem a sua imensa colaboração.

Ao Felipe, pessoa que me abriu as portas do laboratório, e que cheio de paciência e dedicação me apresentou ao mundo da pesquisa, dos carrapatos e das doenças parasitárias.

À Carol por todo o apoio no laboratório e em todas as nossas coletas fotográficas, mas principalmente por todos os nossos cafés recheados de risadas e desabafos!!

À Professora Lia e aos alunos da Escola Estadual Jardim Rivera, por sua iniciativa e colaboração na idealização e execução desse projeto, mas principalmente pelo entusiasmo e amor pelo saber.

A todos os moradores do Recreio que nos receberam e que aceitaram participar do projeto. Sem essa receptividade esse trabalho seria simplesmente impossível.

A todos que colaboraram diretamente com as coletas desse trabalho, Adriano, Carol Cláudia, Jonas, Maria, Sebastian e Xico.

Ao Alejandro, por todo o apoio durante as semanas em Mogi e por sua paciência e gentileza infinitas!!

Ao Daniel, pela imensa ajuda na análise dos dados, por sua paciência e disponibilidade.

Aos amigos do VPS, Amália, Ana, Alexandre, Álvaro, Bárbara, Bianca, Bruna, Diego, Glauber, Hector, Hermes, Herbert, Jaciara, Jonas, Mara, Ryan, Sebastian, Thiago, Xico e Yara, pelas trocas de experiências, pela companhia e pelo apoio durante os dias de trabalho. E mais ainda pelas conversas, lanchinhos e cervejinhas, que certamente tornaram esse período muito mais alegre e divertido!

A todos os funcionários do VPS, pelo apoio. Em especial ao Renato, por toda a ajuda no laboratório e por nossos bons papos matinais; à Hilda, por todos os ensinamentos; ao Pedrinho, pelo cuidado com os animais e o bom humor constante; e, ao Danival, por toda a ajuda com as questões burocráticas.

À SUCEN, pela estrutura disponibilizada para o estudo e a todos os funcionários da SUCEN de Mogi Guaçu, pelo apoio e companhia durante o experimento.

Aos meus amigos da ETESP e às amigas da turma 77, por todos esses anos de amizade. Vocês são o meu apoio e a minha alegria quando a vida fica difícil.

Aos animais que participaram desse projeto. Minha eterna gratidão e meu eterno respeito a cada uma dessas vidas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) processo nº 2018/01596-8, pelo financiamento do projeto.

Por fim, agradeço ao Arthur por todo o amor demonstrado nas grandes e pequenas coisas. Obrigada! Caminhar ao seu lado faz do mundo um lugar bem mais colorido!

RESUMO

BINDER, L.C. Avaliação de possíveis variáveis epidemiológicas associadas à distribuição espacial da infecção por *Rickettsia rickettsii* em cães e carrapatos em uma área endêmica para febre maculosa brasileira na Região Metropolitana de São Paulo. 2020. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma doença infecciosa aguda causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e transmitida por diferentes espécies de carrapatos. Por gerar efeitos deletérios nos carrapatos, a transmissão horizontal da *R. rickettsii* por meio de um hospedeiro amplificador é crucial para a sua manutenção na população de carrapatos em áreas endêmicas para a FMB. Na Região Metropolitana de São Paulo, o carrapato *Amblyomma aureolatum* é o vetor da *R. rickettsii*; no entanto, não se sabe qual vertebrado poderia atuar como hospedeiro amplificador para essa espécie de carrapato. O cão doméstico é o principal hospedeiro dos adultos de *A. aureolatum* nas áreas endêmicas desta região metropolitana, sendo um ótimo sentinela para a ocorrência da doença em humanos. Para avaliar a capacidade do cão em atuar como hospedeiro amplificador, carrapatos adultos de *A. aureolatum* foram alimentados em dois grupos de cães: o grupo infectado e o grupo controle, infestados respectivamente por carrapatos infectados com *R. rickettsii* e por carrapatos não infectados. Todos os cães do grupo infectado desenvolveram bacteremia suficiente para infectar as fêmeas de *A. aureolatum*, e parte delas foi capaz de transmitir a bactéria para sua progênie. A fim de investigar as possíveis variáveis associadas à exposição de cães a *R. rickettsii*, um inquérito sorológico foi conduzido em cães do bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, área endêmica para FMB. Por meio de tal inquérito, obtiveram-se 31% de amostras positivas. Por meio de uma regressão logística, obteve-se que as variáveis que mostraram associação à soropositividade dos cães foram “maior frequência de acesso não supervisionado à rua”, “menor distância ao caso humano de FMB mais próximo” e “maior distância à principal via de acesso ao bairro”. Por fim, para avaliar a dinâmica populacional de cães foram realizadas campanhas de captura e recaptura fotográficas em duas áreas do bairro com diferentes densidades de animais soropositivos. Foram realizadas quatro campanhas ao longo de nove meses. A abundância de cães não foi diferente entre as duas áreas, no entanto a área com maior densidade de cães soropositivos apresentou também uma maior entrada de novos indivíduos. Com esse estudo, pudemos demonstrar que parte das fêmeas de *A. aureolatum* alimentadas em cães infectados por *R. rickettsii* são capazes de transmitir a bactéria de forma

eficiente para parte de sua progênie, indicando que o cão poderia atuar como hospedeiro amplificador da *R. rickettsii* para essa espécie de carrapato. Nossos resultados confirmam o excelente papel do cão como sentinela de casos humanos de FMB, além de mostrar a associação da exposição de cães a *R. rickettsii* ao acesso não supervisionado a rua. A maior presença de cães soropositivos nas áreas mais distantes da via de acesso ao bairro poderia estar associada a uma maior introdução de novos indivíduos, especialmente por meio de abandonos frequentes, como foi relatado por moradores do bairro e verificado em nosso estudo de avaliação da dinâmica populacional dos cães.

Palavras chave: Febre maculosa. Cão doméstico. *Rickettsia rickettsii*. *Amblyomma aureolatum*. Dinâmica populacional.

ABSTRACT

BINDER, L.C. **Assessment of possible epidemiological variables associated with the spatial distribution of *Rickettsia rickettsii* infection in dogs and ticks in an endemic area to Brazilian spotted Fever in the Metropolitan Region of São Paulo.** 2020. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Brazilian Spotted Fever (BSF) is an acute infectious disease caused by the bacterium *Rickettsia rickettsii* and transmitted by different ticks' species. Due to deleterious effects caused on ticks by this bacterium, the horizontal transmission of *R. rickettsii* through an amplifier host is crucial for its maintenance in the tick population in BSF endemic areas. The tick *Amblyomma aureolatum* is the vector of *R. rickettsii* In the Metropolitan Region of São Paulo; however, it is not known which vertebrate could act as an amplifier host for this tick species. The domestic dog is the main host for *A. aureolatum* adults in BSF endemic areas located in this metropolitan region, being an excellent sentinel for BSF human cases. In order to assess dog's ability to act as an amplifier host, adult ticks of *A. aureolatum* were allowed to feed on two groups of dogs: the infected group and the control group, which were respectively infested with *R. rickettsii* infected ticks and with uninfected ticks. All dogs in the infected group developed a bacteremia sufficient to infect *A. aureolatum* females, and part of them was able to transmit the bacteria to their progeny. In order to investigate the possible variables associated with dog exposure to *R. rickettsii*, a serological survey was conducted on dogs from the Recreio da Borda do Campo neighborhood, municipality of Santo André, a BSF endemic area. By conducting this survey, it was possible to obtain 31% of positive samples. Through a logistic regression, it was found that the variables that showed an association with dogs' seropositivity were "higher frequency of unsupervised access to the street", "shorter distance to the nearest human BSF case" and "greater distance to the main access road to the neighborhood". Finally, to assess the population dynamics of dogs, photographic capture and recapture campaigns were carried out in two areas of the neighborhood with different densities of seropositive animals. Four campaigns were carried out over nine months. The abundance of dogs did not differ between the two areas, however the area with the highest density of seropositive dogs also presented a greater entry of new individuals. In this study, we were able to demonstrate that part of *A. aureolatum* females fed on dogs infected with *R. rickettsii* are able to transmit the bacteria efficiently to part of their progeny, suggesting that the dog could act as an amplifier host for *R. rickettsii* for this tick species. Our results confirm the excellent role of the dog as a sentinel for BSF human cases, in addition to showing the

association of dog exposure to *R. rickettsii* with unsupervised access to the street. The greater presence of seropositive dogs in the most distant areas of the access road to the neighborhood could be associated with a greater introduction of new individuals, especially through frequent abandonments, as was reported by residents of the neighborhood and verified in our dog population dynamics study.

Keywords: Spotted fever. Domestic dog. *Rickettsia rickettsii*. *Amblyomma aureolatum*. Population dynamics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema de infestações experimentais em cães com carrapatos <i>Amblyomma aureolatum</i> infectados e não infectados com <i>Rickettsia rickettsii</i> . Grupo controle composto por um cão; grupo infectado composto por três cães. Cada cão possuiu duas câmaras de infestação (A e P) coladas a seu dorso.	32
Figura 2 - Distribuição espacial de casos humanos de febre maculosa e de cães soropositivos e soronegativos para <i>Rickettsia rickettsii</i> no bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, estado de São Paulo	36
Figura 3 - Trajetos percorridos durante as campanhas de captura e recaptura fotográfica de cães e distribuição espacial de cães soropositivos e soronegativos para <i>Rickettsia rickettsii</i> no bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, estado de São Paulo	38
Figura 4 - Conjunto de gráficos apresentando as estimativas de parâmetros demográficos de populações de cães com acesso não supervisionado à rua em duas áreas (Norte e Sul) no bairro Recreio da Borda do Campo, Município de Santo André, estado de São Paulo.	40
Figura 5 - Tempo de duração das principais manifestações clínicas observadas em cães infestados por carrapatos infectados com <i>Rickettsia rickettsii</i> (cães 2, 3 e 4) ou não infectados (cão 1). A área sombreada representa o intervalo considerado normal para a espécie	42
Gráfico 1 - Número de cães sororreagentes frente a antígenos de <i>Rickettsia rickettsii</i> agrupados de acordo com o título máximo observado	36
Gráfico 2 - Temperatura retal de cães avaliada durante 25 dias pós infestação com carrapatos infectados com <i>Rickettsia rickettsii</i> (cães 2, 3 e 4) ou não infectados (cão 1). A área sombreada representa o intervalo considerado normal para a espécie	41
Gráfico 3 - Resposta sorológica de cães frente a antígenos de <i>Rickettsia rickettsii</i> após infestação com carrapatos infectados avaliada por meio de reação de Imunofluorescência indireta (RIFI).....	44
Quadro 1 - <i>Primers</i> utilizados nas reações de PCR.....	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise logística para soropositividade frente a antígenos de <i>Rickettsia rickettsii</i> em cães do bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, estado de São Paulo.	37
Tabela 2 - Estimativas de parâmetros demográficos de populações de cães com acesso não supervisionado à rua em duas áreas do bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, estado de São Paulo. Valores entre parênteses indicam intervalo de confiança de 95%	39
Tabela 3 - Dados clínicos dos cães infestados com adultos de <i>Amblyomma aureolatum</i> infectados (cães 2, 3, 4) e não infectado (cão 1) com <i>Rickettsia rickettsii</i>	43
Tabela 4 - Dados reprodutivos de fêmeas de <i>Amblyomma aureolatum</i> alimentadas em cães infectados (cães 2, 3, 4) e não infectado (cão 1) com <i>Rickettsia rickettsii</i> e mantidas a 23°C e UR>95%	45
Tabela 5 - Detecção de <i>Rickettsia rickettsii</i> em fêmeas de <i>Amblyomma aureolatum</i> e em seus respectivos ovos e larvas de acordo com o cão e câmara de infestação na qual a fêmea se alimentou, bem como o resultado da infestação de cobaias com <i>pools</i> de larvas	46
Tabela 6 - Dados clínicos de cobaias infestadas com larvas de <i>Amblyomma aureolatum</i> , resultados das análises sorológicas das cobaias e resultado da PCR convencional para o grupo da febre maculosa realizada nos <i>pools</i> de ovos das posturas das respectivas larvas. Cada linha da tabela corresponde a uma única cobaia.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHI	Caldo infusão de cérebro e coração
D	Dia
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPI	Dia pós infestação
FMB	Febre maculosa brasileira
IgG	Imunoglobulina G
LPI	Local provável de infecção
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
RIFI	Reação de imunoflorescência indireta
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
UV	Luz ultravioleta
VIF	<i>Variance Inflation Factor</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. OBJETIVOS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1. INVESTIGAÇÃO DE VARIÁVEIS ASSOCIADAS À EXPOSIÇÃO DE CÃES À <i>R.</i> <i>RICKETTSII</i>	23
3.1.1. Área de estudo.....	23
3.1.2. Análises sorológicas	23
3.1.3. Avaliação de variáveis associadas à distribuição de cães sororreagentes para <i>R.</i> <i>rickettsii</i>	24
3.1.4. Avaliação da dinâmica populacional de cães irrestritos e parcialmente restritos..	27
3.2. INFECÇÃO EXPERIMENTAL	29
3.2.1. Obtenção das colônias de <i>A. aureolatum</i>	29
3.2.2. Infestação dos cães.....	30
3.2.3. Análises sorológicas	32
3.2.4. Análises moleculares	32
3.2.5. Infestações em cobaias.....	34
3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E CONSTRUÇÃO DE MAPAS.....	35
4. RESULTADOS	35
4.1. INVESTIGAÇÃO DE VARIÁVEIS ASSOCIADAS A EXPOSIÇÃO DE CÃES À <i>R.</i> <i>RICKETTSII</i>	35
4.1.1. Análises sorológicas	35
4.1.2. Avaliação de variáveis associadas à distribuição de cães sororreagentes para <i>R.</i> <i>rickettsii</i>	36
4.1.3. Avaliação da dinâmica populacional canina	37
4.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL	40
4.2.1. Cães.....	40
4.2.2. Carrapatos.....	44
4.2.3. Infestação das cobaias	46
5. DISCUSSÃO	48
6. CONCLUSÕES.....	56
REFERÊNCIAS	57
ANEXO A - QUESTIONÁRIOS APLICADOS AOS TUTORES DE CÃES.....	68

1. INTRODUÇÃO

A febre maculosa brasileira (FMB), causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, é a doença transmitida por carrapatos de maior importância médica na América do Sul (PAROLA et al. 2013). Sua ocorrência está restrita às Américas, sendo reportada no Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Argentina e Brasil (LABRUNA, 2009). Diferentes carrapatos atuam como vetores da bactéria em diferentes áreas geográficas. Enquanto os carrapatos *Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis* são os principais vetores nos EUA, os carrapatos *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma mixtum* (ambos membros do complexo *Amblyomma cajennense* sensu lato) são os principais vetores na América do Sul (LABRUNA, 2009; PAROLA et al., 2009). No entanto, na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), o vetor da FMB é o carrapato *Amblyomma aureolatum*, distinguindo essa região de todas as demais áreas endêmicas para FMB no mundo (LABRUNA, 2009; KATZ et al., 2009; PINTER; LABRUNA, 2006).

Os primeiros casos de FMB na América Latina foram registrados na cidade de São Paulo no final da década de 1920 (PIZA et al., 1932). Desde então a enfermidade é endêmica na RMSP (TIRIBA, 1972; OGRZEWALSKA et al., 2012), tendo se espalhado em direção ao interior do estado nas últimas três décadas (KATZ et al., 2009; PINTER et al., 2011). Já no início da década de 1930, Gomes (1933) conseguiu isolar o agente da FMB de carrapatos *A. aureolatum* que parasitavam um cão em uma área endêmica na cidade de São Paulo, afirmando que carrapatos do gênero *Amblyomma* seriam muito possivelmente os vetores da enfermidade no estado.

Entre 2007 e 2017, foram confirmados 1574 casos de FMB no Brasil, dos quais resultaram 534 óbitos (taxa de letalidade de 34%). Entre 2007 e 2019, somente no estado de São Paulo, foram notificados 870 casos confirmados com 465 óbitos (taxa de letalidade de 53,4%). Na Região Sul da RMSP (municípios de Diadema, Mauá, Ribeirão Pires, Rio Grande da Serra, Santo André e São Bernardo) foram confirmados no mesmo período 71 casos da doença, com uma taxa de letalidade de 67,6%, uma das mais altas do estado (BRASIL, 2020; SÃO PAULO, 2020).

Diferente do que ocorre na RMSP, o *A. sculptum* é o principal vetor da bactéria *R. rickettsii* no interior do estado de São Paulo e em toda a região Sudeste do Brasil (GUEDES et al., 2005; PEREZ et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2010), onde a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) é a principal espécie hospedeira para todos os estágios de vida desse carrapato (GUEDES et al., 2005). Além disso, esses mamíferos se mostraram excelentes hospedeiros

amplificadores da *R. rickettsii* para o *A. sculptum* (SOUZA et al., 2009). Dessa maneira, o expressivo aumento populacional dessa espécie de vertebrados no interior do Estado de São Paulo nas últimas décadas tem sido associado à expansão dos casos de FMB nessa região (LABRUNA, 2013; NASSER, 2015; SOUZA et al., 2009, 2015).

Os dois cenários epidemiológicos encontrados no estado de São Paulo, são bastante distintos. Enquanto os casos de FMB nas áreas de transmissão por *A. sculptum* ocorrem principalmente em indivíduos adultos do sexo masculino e estão principalmente relacionados a atividades laborais ou de lazer em áreas rurais ou de mata, os casos de FMB da RMSP não obedecem a esse padrão. Os casos estão associados especialmente ao contato com cães e acometem pessoas mais jovens, sem relação com atividade ocupacional (ANGERAMI et al., 2012). Nessa região, os casos ocorrem especialmente em áreas próximas a fragmentos de mata, nas quais os cães desempenham importante papel trazendo carrapatos de dentro dos fragmentos para o ambiente doméstico (DIAS, 1937; PINTER et al., 2008, ANGERAMI et al., 2012). De fato, Scinachi et al. (2017) demonstraram que um maior contato dos cães com o interior de fragmentos de mata, facilitado por processos de desmatamento e fragmentação, é um fator determinante para a ocorrência de casos humanos de FMB em áreas com transmissão associada ao *A. aureolatum*.

Outra diferença marcante entre os dois cenários epidemiológicos da FMB no estado de São Paulo é a taxa de letalidade mais elevada na RMSP em comparação à do interior do estado (ANGERAMI et al., 2012). Saraiva et al. (2014) demonstraram que indivíduos adultos de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii* previamente alimentados necessitavam ficar apenas 10 minutos fixados em cobaias para transmitir a infecção, em contraste aos não alimentados, que necessitavam de pelo menos 10 horas. De mesmo modo, a taxa de letalidade entre os animais expostos a carrapatos previamente alimentados se mostrou mais alta que a de animais expostos a carrapatos não alimentados nesse estudo. Isso poderia explicar a maior taxa de letalidade da FMB em áreas de transmissão por *A. aureolatum* do que nas de transmissão por *A. sculptum*, uma vez que humanos são normalmente parasitados por indivíduos de *A. sculptum* não alimentados, enquanto nas áreas onde a transmissão se dá por meio do *A. aureolatum*, os humanos têm contato principalmente com indivíduos previamente alimentados nos cães (ANGERAMI et al., 2012, SARAIVA et al., 2014).

A espécie *A. aureolatum* ocorre apenas na América do Sul, se estendendo do Uruguai ao Suriname, passando pelo Nordeste da Argentina, Leste do Paraguai, Sudeste do Brasil e Guiana Francesa (GUGLIELMONE et al., 2003). No entanto, casos de FMB associados ao *A. aureolatum* foram reportados apenas na RMSP (FONSECA, 1935; PINTER; LABRUNA,

2006). No estado de São Paulo essa espécie ocorre no bioma Mata Atlântica especialmente em áreas de maior altitude (>500m), as quais apresentam alta umidade e temperaturas amenas durante todo o ano (PINTER et al., 2004; BARBIERI et al., 2015).

Os principais hospedeiros para os carrapatos adultos de *A. aureolatum* são canídeos silvestres, e em paisagens muito alteradas pelo homem o próprio cão doméstico atua como ótimo hospedeiro para esse estágio de vida (GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004). Os adultos são também o único estágio para o qual há relatos de parasitismo em humanos, indicando ser essa a única fase do *A. aureolatum* associada a casos de FMB (ARAGÃO; FONSECA, 1961; GUGLIELMONE et al., 2003; OGRZEWALSKA et al., 2012).

Com relação aos hospedeiros das formas imaturas de *A. aureolatum*, há relatos desses estágios parasitando aves passeriformes e algumas poucas espécies de mamíferos, especialmente roedores (ARAGÃO; FONSECA, 1961; ARZUA et al., 2003, 2005; GUGLIELMONE et al., 2003; VENZAL et al., 2005; OGRZEWALSKA et al., 2012, 2014, PACHECO et al., 2012; LUZ et al., 2017). Pinter et al. (2004) avaliaram algumas espécies (*Gallus gallus domesticus*, *Cavia aperea porcellus*, *Rattus norvegicus*, *Oryctolagus cuniculus*, *Calomys callosus* e *Canis familiaris*) quanto à capacidade delas de atuar como hospedeiras dos estágios imaturos de *A. aureolatum*. Dentre todas as espécies avaliadas em laboratório, apenas frangos (*G. gallus*) e cobaias (*C. aperea*) se mostraram bons hospedeiros para as formas imaturas de *A. aureolatum*, reforçando que aves e roedores não murinos poderiam ter um papel importante no ciclo biológico dessa espécie de carrapato.

Pinter et al. (2004) realizaram um estudo com duração de 24 meses, no qual foram coletados carrapatos parasitando cães domésticos em um município da RMSP. Durante todo esse período, de fato, só foram encontrados exemplares adultos da espécie *A. aureolatum*, o que corroborou a tese de que os cães não são bons hospedeiros para as fases imaturas dessa espécie de carrapato.

O mesmo estudo demonstrou que não há uma variação sazonal da infestação de *A. aureolatum* nos cães, o que condiz com a distribuição de casos humanos de FMB nessas áreas, a qual não apresenta picos sazonais. Essa situação difere da que ocorre nas áreas de transmissão por *A. sculptum*, onde se observa um maior número de casos de junho a outubro, período em que há uma maior atividade da fase de ninfa dessa espécie de carrapato (LEMONS et al., 2001; LABRUNA et al., 2002; ANGERAMI et al., 2012). Além disso, Pinter e Labruna (2006) isolaram a bactéria *R. rickettsii* de 0,89% (06/669) dos adultos de *A. aureolatum* coletados no estudo de Pinter et al. (2004) em diferentes estações do ano, demonstrando que

realmente havia circulação da bactéria na área e que sua presença nos carrapatos não estava limitada a um único período sazonal.

Durante o ano de 2005, Moraes-Filho et al. (2009) realizaram um estudo no bairro Recreio da Borda do Campo, Município de Santo André na RMSP, onde casos confirmados de FMB haviam sido reportados. O bairro caracteriza-se por ser cercado por um grande fragmento de Mata Atlântica e por ser entremeado por pequenos fragmentos de mata, resultando em um grande perímetro de mata em contato com as habitações, o que facilita a entrada de cães nesses fragmentos e o contato com carrapatos *A. aureolatum* eventualmente infectados por *R. rickettsii* (SCINACHI et al., 2017). Ao longo do estudo de Moraes-Filho et al. (2009), foram encontrados mais de 50% dos cães parasitados por *A. aureolatum* e quase 70% dos cães que viviam no entorno da residência onde havia sido confirmado um caso de FMB se mostraram soropositivos para *R. rickettsii*, corroborando a hipótese de ser o *A. aureolatum* o vetor responsável pela transmissão da FMB na área.

Em seu estudo, Labruna et al. (2011) infectaram experimentalmente larvas de *A. aureolatum* com *R. rickettsii* e obtiveram taxas de manutenção transtadial da infecção, de transmissão transovariana e de infecção filial próximas a 100%. No entanto, comparando-se o desempenho das fêmeas infectadas em relação às fêmeas do grupo controle, foi possível observar a produção de uma menor massa de ovos e uma maior taxa de mortalidade entre as fêmeas infectadas, o que demonstra ter a bactéria *R. rickettsii* efeitos deletérios sobre as fêmeas adultas de *A. aureolatum*. Tais efeitos negativos poderiam explicar as baixas prevalências de infecção por *R. rickettsii* em carrapatos *A. aureolatum* de áreas endêmicas para FMB (PINTER; LABRUNA, 2006, LABRUNA et al., 2011). De mesmo modo, tais efeitos deletérios também indicam que a transmissão vertical exclusivamente seria incapaz de manter a infecção por *R. rickettsii* em uma população de *A. aureolatum* por muitas gerações sucessivas, uma vez que a cada geração, o número de carrapatos infectados seria menor (LABRUNA et al., 2011).

Por essa razão, acredita-se que a transmissão horizontal, por meio de um hospedeiro vertebrado amplificador, seja essencial para a formação de novas linhagens de carrapatos infectados e para a consequente manutenção da *R. rickettsii* em áreas endêmicas para FMB com transmissão por *A. aureolatum* (LABRUNA et al., 2011). Segundo Labruna (2009), um hospedeiro amplificador deve: (I) ser abundante na área endêmica; (II) ser suscetível à infecção por *R. rickettsii*; (III) ser um bom hospedeiro para o carrapato vetor; (IV) ser capaz de manter a bactéria circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar novos carrapatos; e, (V) apresentar uma alta taxa de renovação populacional. O último requisito é

fundamental, pois cada indivíduo parece atuar como amplificador apenas durante alguns dias ou semanas ao longo de toda a sua vida, tornando-se, após a primeira infecção, imune a infecções subsequentes. Desse modo, é essencial a constante introdução de novos indivíduos suscetíveis na população para manter a *R. rickettsii* em uma determinada área. Assim, identificar o possível hospedeiro amplificador da *R. rickettsii* para o *A. aureolatum* seria crucial para compreender o ciclo epidemiológico da FMB nas áreas endêmicas com transmissão por esse carrapato.

Estudos foram conduzidos na RMSP com o objetivo de investigar os principais hospedeiros dos estágios imaturos do *A. aureolatum* nas áreas endêmicas. Tais estudos constataram que as aves passeriformes são os principais hospedeiros das fases imaturas de *A. aureolatum* e não encontraram nenhum mamífero parasitado por essa espécie de carrapato (PINTER, 2007; OGRZEWALSKA et al., 2012). Estudos de infecção experimental em laboratório mostraram que o sabiá (gênero *Turdus*), ave frequentemente parasitada pelas fases imaturas do *A. aureolatum*, é refratária à infecção por *R. rickettsii*, não servindo de fonte de infecção para carrapatos (GUILLEN, 2014). Além disso, OGRZEWALSKA e PINTER (2016), com base em uma série de estudos disponíveis acerca do papel das aves na manutenção de bactérias do gênero *Rickettsia*, também destacam a falta de evidências de que esses animais atuem como hospedeiros amplificadores desses agentes.

Em paisagens da RMSP bastante alteradas pelo homem, os adultos de *A. aureolatum* têm como principal hospedeiro o cão doméstico (PINTER et al., 2004). O cão cumpre três dos cinco requisitos postulados por Labruna (2009) necessários para ser considerado um bom hospedeiro amplificador: (I) o cão é bastante abundante nas áreas endêmicas para FMB na RMSP; (II) é suscetível à infecção por *R. rickettsii* (PIRANDA et al., 2008); e, (III) é um ótimo hospedeiro da fase adulta do *A. aureolatum*. Seria, portanto, necessário verificar se o cão cumpre os dois requisitos restantes para poder considerá-lo um potencial hospedeiro amplificador.

Apesar de já ter sido demonstrado que o cão é capaz de manter a *R. rickettsii* circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar novos carrapatos (PIRANDA et al., 2011), não se sabe se a transmissão transovariana da bactéria em fêmeas de *A. aureolatum* infectadas já na fase adulta seriam suficientes para criar novas linhagens de carrapatos infectados. Estudos com outras espécies de carrapatos demonstraram que as taxas de transmissão transovariana da *R. rickettsii* são bastante baixas ou ausentes quando a infecção ocorre primariamente nos carrapatos adultos (PARKER et al., 1933; BURGDORFER; BRINTON, 1975; PIRANDA et al., 2011, SOARES et al., 2012). No entanto, nenhum estudo

dessa natureza foi conduzido com a espécie *A. aureolatum*, sendo interessante ressaltar que em estudos experimentais o *A. aureolatum* se mostrou extremamente suscetível à infecção por *R. rickettsii* e eficiente na manutenção da mesma por sucessivas gerações, sendo muito mais competente nesses aspectos do que o *A. sculptum*, outro agente da FMB no estado de São Paulo (LABRUNA et al., 2008, 2011; SOARES et al., 2012).

Com relação ao último requisito, pouco se sabe sobre a taxa de renovação populacional de cães nas áreas endêmicas para FMB. Conhecer a dinâmica de entrada e saída de indivíduos nessas populações é essencial, pois permitiria estimar o número de indivíduos suscetíveis que entram na população em um determinado período de tempo e se essa taxa seria compatível com a manutenção da *R. rickettsii* em determinada área. É importante ressaltar que, ao contrário do que ocorre com outras espécies, a entrada de novos indivíduos em uma população de cães não se dá apenas pelos nascimentos, mas também e principalmente pelo abandono e pela aquisição de novos animais (MORTERS et al., 2014; DIAS et al., 2015; SANTOS-BAQUERO et al., 2016).

Diante do exposto, é razoável pensar que os cães tenham um papel ainda mais crucial na epidemiologia da FMB na RMSP do que se supunha. Além de facilitarem o contato de humanos com carrapatos eventualmente infectados, eles poderiam também atuar como amplificadores da *R. rickettsii*, exercendo assim papel essencial na manutenção da bactéria nessas áreas. Com esse trabalho se pretende identificar fatores associados à infecção de cães por *R. rickettsii* em uma área endêmica par FMB na RMSP, além de investigar o possível papel do cão doméstico como amplificador da *R. rickettsii* para carrapatos adultos de *A. aureolatum*.

2. OBJETIVOS

- 1- Investigar variáveis associadas à distribuição espacial da infecção por *R. rickettsii* em cães em uma área endêmica para FMB na RMSP;
- 2- Avaliar o possível papel do cão doméstico como hospedeiro amplificador da *R. rickettsii* para carrapatos da espécie *A. aureolatum*;
- 3- Avaliar a dinâmica populacional canina em uma área endêmica para FMB na RMSP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. INVESTIGAÇÃO DE VARIÁVEIS ASSOCIADAS À EXPOSIÇÃO DE CÃES À *R. RICKETTSII*

3.1.1. Área de estudo

O estudo foi conduzido no bairro Recreio da Borda do Campo, localizado no município de Santo André, estado de São Paulo (23°44'07"S, 46°28'36"O). O bairro tem uma população de aproximadamente 10 000 habitantes (BRASIL, 2010) e ocupa uma área de 3,52Km² delimitada a noroeste pelo Rodoanel Mario Covas: SP-21(principal via de acesso ao bairro); a sudeste pela represa Billings; e, a leste e a oeste por fragmentos de Mata Atlântica, além de ser entremeado por pequenos fragmentos de mata, resultando em um grande perímetro de mata em contato com as habitações, o que facilita a entrada de cães nesses fragmentos (SCINACHI et al., 2017).

3.1.2. Análises sorológicas

Durante os meses de abril e maio de 2015, a Superintendência de Controle de Endemias do Estado de São Paulo (SUCEN) coordenou um trabalho vigilância epidemiológica da febre maculosa no bairro Recreio da Borda do Campo. Para tal, foram realizadas duas visitas à área, totalizando a coleta de dados de 100 residências distribuídas de forma uniforme por todo o bairro. Foram colhidas amostras de sangue de um único cão de cada residência e ao tutor foram aplicados dois questionários que tinham como intuito, além de obter informações básicas do animal (idade, sexo, possibilidade de acesso à rua, etc.), avaliar qual o nível de conhecimento do tutor acerca da FMB e do papel do cão na epidemiologia da enfermidade na região (**Anexo A**). Como preconizado por Pinter et al. (2008), animais com menos de um ano ou que tivessem sido trazidos de outros bairros/municípios nos últimos dois anos não foram incluídos no estudo.

Todas as amostras de sangue foram identificadas e levadas em temperatura ambiente ao laboratório, onde foram centrifugadas. As respectivas amostras de soro foram então armazenadas a -20°C para posteriores análises. Todas as 100 amostras de soro coletadas na área de estudo foram submetidas à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) utilizando antígenos de *Rickettsia rickettsii* cepa Taiaçu (PINTER; LABRUNA, 2006) e um conjugado comercial marcado com fluoresceína anti IgG de cão produzido em coelho (IgG; Sigma

Diagnostics, St. Louis, MO), como descrito por Labruna et al. (2007a). Cada amostra de soro foi inicialmente testada na diluição de corte (1:64), sendo as amostras reativas posteriormente testadas em diluições seriadas para determinação do título final. Em cada lâmina uma amostra de soro sabidamente não reativa (controle negativo) e uma amostra de soro sabidamente reativa (controle positivo) foram testadas na diluição de corte.

3.1.3. Avaliação de variáveis associadas à distribuição de cães sororreagentes para *R. rickettsii*.

Com o objetivo de identificar possíveis fatores de risco para a exposição de cães à *R. rickettsii* no bairro, foi realizada uma regressão logística utilizando como variáveis explicativas para a variável “soropositividade do cão frente a antígenos de *R. rickettsii*” as variáveis que, considerando as características da ecologia da FMB, poderiam estar relacionadas à exposição dos cães à *R. rickettsii* nessa área.

A partir do modelo inicial, foram retiradas, através do método de *Backward Elimination*, as variáveis que mais contribuíam para a colinearidade, avaliadas através do VIF (*Variance Inflation Factor*). Em seguida foram também retiradas as variáveis sem significância estatística, de modo que fossem mantidas apenas as variáveis que contribuíssem significativamente para a explicação do fenômeno.

Os dados para cada uma das variáveis analisadas foram obtidos através do questionário aplicado e das coordenadas geográficas de cada ponto de coleta e são listadas a seguir:

- (I) **Distância da residência à borda da mata:** uma vez que um maior contato de cães com o interior de fragmentos de mata parece ser um fator determinante para a ocorrência de casos humanos de FMB (SCINACHI et al., 2017), procurou-se avaliar se a distância mínima de cada ponto de coleta até o ponto mais próximo do fragmento de mata que contorna o bairro estaria associada a exposição dos cães à *R. rickettsii*.
- (II) **Distância à principal via de acesso ao bairro:** durante visitas ao bairro que ocorreram antes das coletas, foi relatado por muitos moradores que o bairro era conhecido na região como um local de abandono de cães e que os abandonos ocorriam sobretudo na área sul do bairro, por ser uma área mais afastada da principal via de acesso ao bairro, o Rodoanel. Um maior número de cães sendo

introduzidos em uma determinada área poderia gerar maiores densidade e taxa de renovação populacional, fatores que poderiam contribuir para a manutenção da *R. rickettsii* na área. Procurou-se verificar então se havia uma diferença na distribuição de cães soropositivos para *R. rickettsii* associada à distância das respectivas residências ao Rodoanel.

- (III) **Vulnerabilidade Social:** características socioeconômicas podem ter um impacto no modo como cães são criados, desde a frequência de visitas ao veterinário, aplicação de ectoparasiticidas, valor nutricional do alimento oferecido até a restrição ou não de acesso à rua. Esses aspectos da criação podem tanto impactar no estado geral de saúde dos animais como também em uma maior exposição a carrapatos, podendo estar associados a uma maior exposição dos cães à *R. rickettsii*. Assim, procuramos verificar se as características socioeconômicas estariam relacionadas à distribuição espacial de cães sororreagentes. Para isso se utilizou o Índice Paulista de Vulnerabilidade Social (SÃO PAULO, 2010) como indicador socioeconômico dos setores censitários que compõem o bairro.
- (IV) **Distância ao local provável de infecção (LPI) de casos humanos:** uma vez que na RMSP os cães são os principais hospedeiros dos adultos de *A. aureolatum*, estágio responsável pela transmissão da *R. rickettsii* para humanos e que, portanto, são considerados ótimos animais sentinelas para a detecção de áreas de risco para FMB (ARAGÃO; FONSECA, 1961; GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004, 2008; OGRZEWALSKA et al., 2012), procuramos verificar se de fato havia uma associação entre a sorologia dos cães e a distância dos mesmos aos pontos de ocorrência de casos humanos de FMB. Para isso, verificou-se a localização da ocorrência de casos de FMB ocorridos no bairro entre 2007 e 2014 (cedidos pela Superintendência de Controle de Endemias, Serviço Regional 01 São Paulo) e calculou-se a distância entre os cães e o caso humano mais próximo.
- (V) **Nível de conhecimento do tutor acerca da ecologia da FMB:** considerando que um conhecimento adequado da ecologia da FMB poderia levar o tutor a adotar medidas de prevenção da doença que incluíssem uso de coleiras carrapaticidas nos cães, aplicação periódica de ectoparasiticidas, restrição de

acesso dos animais a áreas de matas, entre outras, procuramos avaliar se havia associação entre o nível de conhecimento do tutor acerca da ecologia da FMB na região e a exposição do respectivo cão ao agente etiológico da doença. Para tanto, atribuímos uma nota de 0 a 4 ao conhecimento do tutor acerca da epidemiologia da FMB de acordo com as respostas do questionário aplicado.

- (VI) **Tempo de moradia do cão no bairro e idade do animal:** um maior tempo de vida do cão em uma determinada área onde há circulação de carrapatos infectados poderia aumentar o risco de um animal ser infectado pela *R. rickettsii*, uma vez que teria estado potencialmente exposto ao agente por um maior período de tempo. Levando este aspecto em conta, procuramos analisar a associação dessas duas variáveis a exposição de cães à *R. rickettsii*.
- (VII) **Sexo do animal:** uma diferença comportamental entre fêmeas e machos no que diz respeito a áreas de uso e maiores distâncias percorridas (DÜRR et al., 2017) poderia ter um impacto na probabilidade de entrada em fragmentos de mata e consequentemente no contato com carrapatos, portanto essa variável também foi incluída nas análises.
- (VIII) **Frequência de acesso não supervisionado à rua:** uma vez que carrapatos *A. aureolatum* não habitam naturalmente ambientes domésticos, é necessário que os cães tenham acesso às áreas habitadas por essa espécie de carrapato (fragmentos de mata) para que possam eventualmente ser infectados pelo agente etiológico da FMB. Assim, considerou-se que os animais que têm acesso não supervisionado à rua poderiam ter uma maior facilidade de acesso às áreas de mata, o que poderia aumentar as chances de esses animais serem expostos a carrapatos infectados por *R. rickettsii*.

3.1.4. Avaliação da dinâmica populacional de cães irrestritos e parcialmente restritos

A população alvo do nosso estudo foram cães com acesso não supervisionado à rua (*free-roaming dogs*). Esse grupo de cães é caracterizado por seus indivíduos não estarem restritos em uma residência ou propriedade e por não terem acesso à rua apenas sob supervisão do tutor. Eles podem não ter nenhum tipo de restrição de movimento durante todo o tempo (cães irrestritos) ou podem ter acesso à rua apenas em períodos específicos do dia (cães parcialmente restritos). Os cães podem ter um tutor, podem ser cães comunitários, ou podem ser cães sem qualquer tipo de tutor, sendo este último caso o menos frequente (WHO/WSPA, 1990; SLATER, 2001; MATOS et al., 2002). Cães irrestritos e parcialmente restritos são o grupo de cães de maior relevância na epidemiologia de doenças nas quais o cão exerce algum tipo de papel, especialmente por: I. serem os mais frequentes a entrar em remanescentes florestais e interagir com a fauna silvestre; II. por, em geral, receberem menos cuidados veterinários; e, III. por terem maiores áreas de uso (SLATER, 2001; YOUNG et al., 2011; TORRES; PRADO, 2010; BIFFI, 2017)

Com o objetivo de avaliar a dinâmica demográfica canina como fator associado à infecção dos cães por *R. rickettsii* no bairro Recreio da Borda do Campo, foram escolhidas duas áreas de estudo com base na distribuição espacial dos cães sororreagentes e não sororreagentes para *R. rickettsii*: I. uma área com baixa densidade de cães sororreagentes na parte norte do bairro; e II. uma área com alta densidade de cães sororreagentes na região sul do bairro.

Para estimar a densidade populacional e a dinâmica de entrada de novos indivíduos na população de cães irrestritos e parcialmente restritos das duas áreas, foi utilizado o método de captura-recaptura fotográfica (WHO/WSPA, 1990). Em cada uma das áreas foi determinado um percurso de 5,1 Km, os quais foram percorridos de carro a uma velocidade constante de 10 Km/h duas vezes por dia (uma vez no período da manhã e outra no período da tarde) por dois dias consecutivos, em cada uma das 4 campanhas realizadas com intervalos de três meses (Novembro de 2018, e Fevereiro, Maio e Agosto de 2019). Todos os cães que estivessem livres na rua ao longo do percurso foram fotografados em ângulos e posições diferentes, a fim de facilitar o seu reconhecimento posterior. Para registrar a localização de cada cão fotografado foi utilizado um rastreador GPS para que os registros pudessem ser analisados em um mapa com todas as coordenadas dos percursos realizados. Para assegurar que o esforço de captura fosse o mesmo nas duas áreas, um cronômetro foi utilizado para contabilizar o tempo de esforço de captura. A contagem era sempre interrompida quando fosse necessária alguma

parada do veículo, ou quando, devido às características do trajeto, um mesmo trecho tivesse que ser percorrido mais de uma vez.

Em todas as campanhas, as capturas fotográficas foram realizadas por uma mesma equipe, composta por três pessoas. Uma pessoa era responsável por dirigir o veículo e registrar as coordenadas geográficas das capturas; outra pessoa era responsável por realizar as fotografias dos cães; e, a terceira era responsável por preencher uma ficha de identificação para cada captura, contendo informações básicas do cão (sexo e faixa etária) e descrições de características morfológicas que pudessem auxiliar na posterior identificação do animal. Após a realização das campanhas, as fotos foram analisadas pelo membro da equipe que havia ficado encarregado de preencher as fichas de identificação, e, a partir da análise conjunta das fotos e das fichas, foi construída uma tabela para cada área de coleta contendo os históricos de captura e recaptura de cada um dos indivíduos

Um dos métodos classicamente utilizados para calcular a abundância de cães em uma determinada área é o método de Beck (WHO/WSPA, 1990). No entanto, tal método exige algumas prerrogativas, dentre as quais a de que todos os animais da população devem ter a mesma probabilidade de serem fotografados. Tal premissa é difícil de ser cumprida no caso de cães domésticos, uma vez que eles apresentam comportamentos bastante particulares que variam de acordo com os hábitos dos tutores e com as próprias características de cada animal. Cães irrestritos, por exemplo, tendem a passar maiores períodos do dia andando livremente, aumentando a probabilidade de serem vistos, em comparação a cães parcialmente irrestritos, os quais permanecem livres durante menos tempo.

Outra exigência do método é a de a população ser fechada, ou seja, mortalidade, nascimentos, imigração e emigração devem ser mínimos durante o período do estudo. Tal pré-requisito é preenchido pelo nosso experimento, uma vez que cada campanha é realizada em dois dias consecutivos, nos permitindo afirmar que a variação do número de indivíduos é mínima durante o período. No entanto, ao se analisar as quatro campanhas em conjunto, a fim de se avaliar a entrada de novos indivíduos nessa população, estamos lidando com uma população aberta, procurando exatamente compreender a dinâmica de entrada de indivíduos nessa população

Sendo assim, optou-se por outra ferramenta que nos permitisse avaliar os parâmetros pretendidos, a saber, um pacote do software R - o Rcapture (RIVEST; BAILLARGEON, 2019). Trata-se de um pacote concebido justamente para experimentos de captura e recaptura, o qual, a partir das histórias de captura/recaptura dos indivíduos e da informação sobre a característica da população (aberta ou fechada, permitindo inclusive uma combinação dos

dois cenários), permite estimar uma série de características demográficas como abundância, probabilidade de sobrevivência e número de novos indivíduos a entrar na população (BAILLARGEON; RIVEST, 2007).

Para a estimativa dos parâmetros demográficos, deve se escolher um modelo que se adeque melhor aos dados. Existem três modelos disponíveis: Chao, Poisson2 e Darroch. Cada modelo pode incorporar até três fontes de variação na probabilidade de captura: uma heterogeneidade temporal (t), na qual as probabilidades de captura variam entre as ocasiões de captura; uma heterogeneidade entre os indivíduos (h), na qual a probabilidade de captura varia entre os indivíduos; e, uma heterogeneidade causada por mudanças comportamentais (b), na qual o ato da captura modifica o comportamento do indivíduo alterando a probabilidade de esse indivíduo ser capturado novamente (BAILLARGEON; RIVEST, 2007).

3.2. INFECÇÃO EXPERIMENTAL

3.2.1. Obtenção das colônias de *A. aureolatum*

Para formação das colônias de carrapatos *A. aureolatum* a serem utilizadas no experimento, foram coletadas cinco fêmeas ingurgitadas em cães do Município de Mogi das Cruzes, SP, área endêmica para FMB. As fêmeas foram colocadas em incubadora a 23°C e com umidade relativa maior que 95%, condições ideais para a manutenção de indivíduos dessa espécie de carrapato (PINTER et al., 2004).

Após o término da oviposição as fêmeas foram congeladas a -20°C, bem como um *pool* de ovos de cada uma de suas posturas. As amostras foram processadas individualmente para extração de DNA pela técnica de isotiocianato de guanidina, conforme previamente descrito (SANGIONI et al., 2005). Em seguida, essas amostras foram submetidas à reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) CS-78 e CS-323 (**Quadro 1**), que amplificam o fragmento de 401 pb do gene da proteína citrato sintase (*gltA*), existente em todas as espécies do gênero *Rickettsia*, conforme descrito por Labruna et al. (2004a). As amostras foram todas negativas na PCR, nos mostrando que se tratavam de linhagens de carrapatos não infectadas.

Para a obtenção da colônia não infectada, após a eclosão dos ovos, as larvas de duas posturas foram alimentadas em duas cobaias provenientes de biotério comercial. Para isso foram coladas uma câmara de tecido de cerca de 5cm de diâmetro no dorso de cada um dos animais e nelas foram colocadas as larvas de *A. aureolatum*.

Para a obtenção da colônia infectada, órgãos de cobaias infectadas com *R. rickettsii* cepa Taiacu, nunca antes submetida a crescimento *in vitro* (cultivo celular) armazenados a -80°C foram macerados com caldo de infusão cérebro/coração (BHI) e inoculados em três cobaias por via intraperitoneal como descrito anteriormente (LABRUNA et al., 2008, 2011). Um dia após a inoculação, as larvas provenientes das três posturas restantes foram colocadas nas câmaras de tecido coladas ao dorso dessas três cobaias para se alimentarem.

As câmaras das cobaias foram verificadas três vezes ao dia e as larvas ingurgitadas foram coletadas e colocadas em incubadora a 23°C e com umidade relativa maior que 95%. Além disso, a temperatura das cobaias foi monitorada diariamente, sendo consideradas febris quando a temperatura retal fosse $\geq 39.5^{\circ}\text{C}$. Todas as três cobaias inoculadas apresentaram febre alta ($> 40^{\circ}\text{C}$), ao contrário das não inoculadas.

Após a muda das larvas para ninfas, um *pool* de ninfas provenientes das larvas alimentadas em cada uma das cobaias foi submetido à extração de DNA e à PCR convencional, como acima descrito. Como esperado, todas as amostras provenientes de larvas alimentadas nas cobaias não inoculadas se mostraram negativas, enquanto as alimentadas nas cobaias inoculadas se mostraram todas positivas.

As ninfas foram alimentadas em novas cobaias e, depois de ingurgitadas foram também alocadas nas condições previamente descritas. Apresentaram febre alta todas as cobaias, nas quais as ninfas do grupo infectado se alimentaram, ao contrário das cobaias nas quais as ninfas do grupo não infectado se alimentaram. Os adultos oriundos dessas ninfas foram utilizados nas infestações a seguir descritas.

3.2.2. Infestação dos cães

Foram utilizados quatro cães da raça Beagle provenientes de um biotério com a finalidade de criação desses animais para a pesquisa, os quais foram mantidos em baias individuais com água e com ração comercial *ad libitum* durante todo o estudo. Um dia antes do início da infestação foi coletada uma amostra de sangue de cada animal, as quais foram centrifugadas e os respectivos soros submetidos à RIFI, como descrito no item 4.1.2 utilizando-se antígenos de *R. rickettsii* cepa Taiacu (PINTER; LABRUNA, 2006), *Rickettsia parkeri* cepa At24 (SILVEIRA et al., 2007), *Rickettsia amblyommatis* cepa Ac37 (LABRUNA et al., 2004b), *Rickettsia rhipicephali* cepa HJ5 (LABRUNA et al., 2007b), e *Rickettsia bellii* cepa Mogi (PINTER; LABRUNA, 2006). Todas as amostras de soro não foram regentes em diluição 1:64.

No dia 12/03/2019 (D -1), foram coladas duas câmaras de tecido ao dorso de cada um dos quatro animais: a câmara anterior (A) e a câmara posterior (P). No dia seguinte à colagem das câmaras (D 0), os animais foram divididos em dois grupos: o grupo infectado, composto por três animais, os quais foram infestados na câmara A por dez machos de *A. aureolatum* infectados com *R. rickettsii*, provenientes da colônia infectada; e o grupo controle, composto por apenas um animal infestado na câmara A por dez machos de *A. aureolatum* adultos não infectados.

Pinter et al. (2004) observaram em seu estudo um período de alimentação de fêmeas de *A. aureolatum* de 9 a 14 dias. No estudo de Piranda et al. (2008), os cães infestados com adultos de *A. aureolatum* infectados com *R. rickettsii* desenvolveram bacteremia com início entre o sexto e o oitavo dia pós infestação, tendo duração de 2 a 6 dias. Considerando tais dados e com a finalidade de garantir que um número grande de fêmeas se alimentasse durante todo o período de bacteremia dos cães, realizou-se o seguinte esquema de infestações: (I) dois dias após a primeira infestação (D2) cada cão foi infestado com doze fêmeas não infectadas nas duas câmaras (A e P) e com dez machos também não infectados na câmara P, de modo que ao final houvesse 22 carrapatos em cada uma das duas câmaras; (II) sete dias após a primeira infestação (D7) foram colocadas mais cinco fêmeas não infectadas na câmara P de cada um dos quatro animais; e, (III) dois dias depois (D9) mais quatro fêmeas não infectadas nas duas câmaras dos quatro cães (**Figura 1**). Foram utilizadas duas câmaras em cada animal, sendo colocados indivíduos infectados em apenas uma delas para que fosse possível verificar se a eventual transmissão horizontal da *R. rickettsii* entre os carrapatos se daria por meio de transmissão sistêmica e/ou de transmissão não sistêmica (MORAES-FILHO et al., 2018).

As câmaras foram abertas diariamente para a remoção das fêmeas ingurgitadas, as quais foram colocadas em uma incubadora a 23°C e com umidade relativa maior que 95%. O estado clínico dos cães foi monitorado diariamente do dia em que foram coladas as câmaras até 25 dias após a primeira infestação. Durante o mesmo período foram coletadas amostras de sangue dos cães em dias alternados. As respectivas amostras de soro e sangue total foram armazenadas a -20°C para posterior realização da PCR e da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para *R. rickettsii*.

Figura 1 - Esquema de infestações experimentais em cães com carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados e não infectados com *Rickettsia rickettsii*. Grupo controle composto por um cão; grupo infectado composto por três cães. Cada cão possuiu duas câmaras de infestação (A e P) coladas a seu dorso.

3.2.3. Análises sorológicas

Todas as amostras de soro obtidas dos cães foram submetidas à RIFI utilizando antígenos de *R. rickettsii* cepa Taiacu (PINTER; LABRUNA, 2006) e um conjugado comercial marcado com fluoresceína anti IgG de cão produzido em coelho (IgG; Sigma Diagnostics, St. Louis, MO), como descrito no item 3.1.2.

3.2.4. Análises moleculares

Foram testados por meio da PCR todas as fêmeas após término da oviposição; *pools* de ovos e *pools* de larvas oriundas de todas as posturas das fêmeas; e, todas as amostras de sangue e tecido coletadas dos cães durante o estudo.

A extração de DNA das amostras de sangue e tecido foi feita por meio de *kit* comercial (DNeasy Tissue kit, Qiagen) conforme instruções do fabricante. Para a extração de DNA dos carrapatos, os adultos foram processados individualmente e os ovos e larvas em *pools* de 50 e

20 indivíduos, respectivamente. A extração se deu pela técnica de isotiocianato de guanidina, conforme previamente descrito (SANGIONI et al., 2005).

Todas as amostras de DNA obtidas foram inicialmente submetidas a PCR em tempo real (7500 Real Time PCR Systems apparatus – Applied Bio Systems, Foster City, CA, USA) utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) CS-5 e CS-6 que amplificam o fragmento de 147pb do gene da proteína citrato sintase (*gltA*) existente em todas as espécies do gênero *Rickettsia*, como previamente descrito por Labruna et al. (2004) (**Quadro 1**).

As amostras negativas nesta etapa foram processadas por PCR convencional a fim de se confirmar que a extração havia funcionado adequadamente, confirmando os resultados negativos da PCR em tempo real. Para tanto, utilizaram-se os *primers* 16s+1 e 16s-1 para amplificação de um fragmento de 460pb do gene mitocondrial 16s rRNA de carrapatos (MANGOLD et al., 1998), e os *primers* CYTB1 e CYTB2 para amplificação de um fragmento de 359pb do gene citocromo B (*cyt-B*) da mitocôndria de vertebrados (STEUBER et al., 2005) (**Quadro 1**). As amostras negativas nessa etapa foram excluídas das demais análises.

As amostras positivas na PCR em tempo real foram submetidas à PCR convencional utilizando-se os marcadores Rr190.70 e Rr190.701R, os quais amplificam o fragmento de 632pb do gene da proteína externa de membrana 190-kDa (*ompA*), presente somente nas riquetsias do Grupo da Febre Maculosa (REGNERY et al., 1991; ROUX et al., 1996) (**Quadro 1**).

Todos os produtos da PCR convencional foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% acrescido de 10% de corante SYBR® Safe (ThermoFisher Scientific) e usado tampão de corrida TBE 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA) à 110v/50mA. O gel era posteriormente visualizado sob luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphamager) (Sambrook et al. 1989).

Alguns produtos de PCR visualizados em gel de agarose foram selecionados e purificados utilizando o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation). Após a purificação, os nucleotídeos foram sequenciados utilizando-se o *kit* comercial BigDye™ Terminator (Applied Biosystems) de acordo com especificações do fabricante. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático modelo ABI 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystem/Perkin Elmer) segundo o manual de instruções do fabricante. As sequências obtidas foram editadas no pacote de programas Bioedit e submetidas à análise de similaridade com as sequências disponíveis no GenBank, através do programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (ALTSCHUL et al., 1990).

Além de serem submetidas ao protocolo para detecção de *Rickettsia* como descrito acima, as amostras de sangue dos cães foram também submetidas a dois outros protocolos de PCR em tempo real para detecção de *Ehrlichia canis* (gene *dsb*) e de *Rangelia vitalii* (gene *hsp70*) (DOYLE et al., 2005; SOARES et al., 2018), a fim de se garantir que os animais não tivessem sido coinfectados com um desses outros patógenos transmitidos por carrapatos. Para tanto foram selecionadas amostras coletadas durante o período febril de cada um dos cães do grupo infectado.

Quadro 1 - *Primers* utilizados nas reações de PCR

Gene alvo e pares de primers	Sequência dos primers (5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>gltA</i> CS-78 CS- 323	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401	Labruna <i>et al.</i> 2004a
<i>gltA</i> CS-5 CS-6	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT AGGGTCTTCGTGCATTCTT	147	Labruna <i>et al.</i> 2004a
16S rRNA mitocondrial 16S ⁺ 16S ⁻	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT	460	Mangold <i>et al.</i> 1998
Citocromo B mitocondrial CYT B1 CYT B2	CCATCCAACATCTCAGCATGATGAAA GCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	359	Steuber <i>et al.</i> 2005
<i>ompA</i> Rr 190.70 Rr 190.701	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	632	Regnery <i>et al.</i> 1991, Roux <i>et al.</i> 1996

3.2.5. Infestações em cobaias

As larvas de *A. aureolatum* oriundas de posturas positivas para *R. rickettsii* na PCR em tempo real foram alimentadas em cobaias provenientes de um biotério comercial a fim de se confirmar a transmissão vertical do agente da FMB. Para isso foram coladas câmaras de tecido no dorso dos animais e nelas foram colocadas cerca de 400 larvas de *A. aureolatum* para se alimentarem. A temperatura retal das cobaias foi verificada diariamente durante os 21 dias pós infestação e uma amostra de sangue foi coletada no dia da infestação e outra 21 dias depois. As amostras de sangue foram centrifugadas para obtenção do soro, sendo o mesmo congelado a -20°C para posteriormente ser submetido à RIFI como descrito no item 4.1.2.

3.3. ANÁLISES ESTATÍSTICAS E CONSTRUÇÃO DE MAPAS

Os dados reprodutivos das fêmeas de *A. aureolatum* foram comparados entre fêmeas do grupo infectado e fêmeas do grupo controle. O sucesso de oviposição foi comparado por meio do teste qui-quadrado, enquanto o peso das fêmeas ingurgitadas, o peso das massas de ovos e os valores de eficiência reprodutiva foram comparados por meio do teste t para duas amostras. Para a comparação entre proporções de cães sororreagentes para *R. rickettsii* obtidas no inquérito sorológico nas duas áreas do bairro foi também utilizado o teste qui-quadrado. Assumiu-se um nível de significância de 95% para todas as análises. A regressão logística, os testes de hipótese e as estimativas demográficas do presente estudo foram todas realizadas no software R (R CORE TEAM 2019). Foi utilizado um GPS (Garmin Etrex H Trilhas) para a obtenção das coordenadas geográficas de todos os pontos de coleta de amostras e de captura e recaptura fotográfica, as quais foram utilizadas para a construção dos mapas e para as análises espaciais, as quais foram realizadas utilizando-se o software QGIS 2.18 Las Palmas (QGIS DEVELOPMENT TEAM 2016).

4. RESULTADOS

4.1. INVESTIGAÇÃO DE VARIÁVEIS ASSOCIADAS A EXPOSIÇÃO DE CÃES À *R. RICKETTSII*

4.1.1. Análises sorológicas

Das 100 amostras de soro testadas, 35 eram de fêmeas, enquanto 65 eram de machos. De todas elas, 31 foram reagentes, das quais 10 eram de fêmeas e 21 de machos. Se considerarmos separadamente os 50 cães amostrados na área norte e os 50 na área sul, observamos uma soroprevalência significativamente maior na área sul (42%) do que na área norte (20%) ($p=0.017$). Os títulos observados variaram de 128 a 16384 (**Gráfico 1**). A distribuição espacial dos cães sororreagentes pode ser observada na **Figura 2**.

Gráfico 1 - Número de cães sororreagentes frente a antígenos de *Rickettsia rickettsii* agrupados de acordo com o título máximo observado

Figura 2 - Distribuição espacial de casos humanos de febre maculosa e de cães soropositivos e soronegativos para *Rickettsia rickettsii* no bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, estado de São Paulo

4.1.2. Avaliação de variáveis associadas à distribuição de cães sororreagentes para *R. rickettsii*.

A partir do modelo inicial de regressão logística, retiraram-se, através do método de *Backward Elimination*, as variáveis que mais contribuía para a colinearidade, avaliadas através do VIF (*Variance Inflation Factor*), e, em seguida, as variáveis sem significância estatística até que se mantivessem apenas as variáveis que contribuíssem significativamente

para a explicação do fenômeno (cães soropositivos para *R. rickettsii*). Com isso, foi possível chegar ao seguinte conjunto de variáveis: “frequência de acesso à rua”, “distância à principal via de acesso ao bairro” e “distância ao LPI de casos humanos”.

Como resultado final se obteve que o acesso frequente à rua (uma vez por semana ou mais) atribui um risco relativo de 3.21 em relação a animais que saem menos de uma vez por mês de casa. A cada 1 Km de distância da principal via de acesso ao bairro o risco relativo aumenta em 3.09 e, a cada 100 metros que a residência do animal se distancia do caso humano mais próximo, o risco relativo é reduzido em 0.62 (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Análise logística para soropositividade frente a antígenos de *Rickettsia rickettsii* em cães do bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, estado de São Paulo.

Variável	OR*	IC** 95%	p-valor
Frequência de acesso à rua	3,208	1,201 – 9,205	0,024
Distância à principal via de acesso ao bairro	3,094	1,391 – 7,424	0,008
Distância de LPI de casos humanos	0,621	0,381 – 0,948	0,039

*OR: Razão de chances (*Odds Ratio*)

**IC: Intervalo de confiança

4.1.3. Avaliação da dinâmica populacional canina

Foram realizadas quatro campanhas de captura-recaptura fotográfica nos dias 13 e 14 de novembro de 2018; nos dias 7 e 8 de fevereiro de 2019; 14 e 15 de maio de 2019; e, nos dias 12 e 14 de Agosto de 2019, as quais ocorreram de acordo com o método descrito no item 3.1.4 A última campanha não foi realizada em dias consecutivos, devido à fortes chuvas na área de coleta no dia 13 de Agosto. Os trajetos percorridos podem ser observados na **Figura 3**.

Figura 3 - Trajetos percorridos durante as campanhas de captura e recaptura fotográfica de cães e distribuição espacial de cães soropositivos e soronegativos para *Rickettsia rickettsii* no bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, estado de São Paulo

Ao todo foram fotografados 291 cães, 132 dos quais na área norte e 159 na área sul. A abundância estimada de cães para cada uma das 4 campanhas não apresentou diferença significativa entre as duas áreas. Contudo, há uma tendência de aumento do número de cães na área sul ao longo das campanhas, ao contrário da área norte, na qual há uma tendência de declínio. Já o número total de indivíduos a habitarem a área sul durante o intervalo de 9 meses do estudo mostrou-se significativamente maior do que o número total de cães a habitar a área norte no mesmo período, indicando uma maior entrada de novos indivíduos na primeira área em relação à segunda. (**Tabela 2 e Figura 4**). As estimativas para os parâmetros demográficos de interesse foram obtidas no software Rcapture utilizando-se o modelo *th* Chao por ser o modelo que apresentou melhor desempenho para a análise dos dados.

Tabela 2 - Estimativas de parâmetros demográficos de populações de cães com acesso não supervisionado à rua em duas áreas do bairro Recreio da Borda do Campo, município de Santo André, estado de São Paulo. Valores entre parênteses indicam intervalo de confiança de 95%

Parâmetro demográfico	Período*	Área Norte	Área Sul**
Probabilidade de captura	Campanha 1	0.44 (0.21 - 0.66)	0.53 (0.32 - 0.75)
	Campanha 2	0.650 (0.52 - 0.77)	0.59 (0.45 - 0.72)
	Campanha 3	0.72 (0.61 - 0.83)	0.59 (0.46 - 0.71)
	Campanha 4	0.64 (0.45 - 0.82)	0.46 (0.26 - 0.66)
Probabilidade de sobrevivência (e de não emigração) em relação à campanha anterior	Campanha 2	0.78 (0.62 - 0.94)	0.73 (0.55 - 0.90)
	Campanha 3	0.76 (0.61 - 0.91)	0.75 (0.58 - 0.93)
	Campanha 4	0.73 (0.45 - 1.00)	0.97 (0.48 - 1.0)
Abundância	Campanha 1	109.6 (48.9 - 170.3)	99.6 (55.2 - 143.9)
	Campanha 2	100.7 (81.7 - 119.7)	113.6 (87.9 - 139.3)
	Campanha 3	98.6 (84.2 - 113.0)	123.3 (98.3 - 148.3)
	Campanha 4	87.6 (58.6 - 116.5)	151 (80.6 - 221.3)
Nº de novos indivíduos a habitarem a área em relação à campanha anterior	Campanha 2	14.8 (0.0 - 66.5)	40.9 (0.0 - 82.4)
	Campanha 3	21.9 (3.5 - 40.3)	38.0 (11.0 - 65.0)
	Campanha 4	15.6 (1.9 - 29.3)	31.7 (2.2 - 61.2)
Nº total de novos indivíduos a habitarem a área durante todo o período do estudo	Campanha 1 a campanha 4	52.3 (0.0 - 109.0)	111.0 (53.1 - 168.0)
Nº total de indivíduos que habitaram a área durante todo o período do estudo	Campanha 1 a campanha 4	161.9 (141.8 - 182.1)	210.2 (182.9 - 237.4)

*Campanha 1: Novembro de 2018; campanha 2: Fevereiro de 2019; campanha 3: Maio de 2019; e, campanha 4: Agosto de 2019

Figura 4 - Conjunto de gráficos apresentando as estimativas de parâmetros demográficos de populações de cães com acesso não supervisionado à rua em duas áreas (Norte e Sul) no bairro Recreio da Borda do Campo, Município de Santo André, estado de São Paulo.

Estimativas com intervalo de confiança de 95% dos seguintes parâmetros: **A**: número total de cães a habitarem as áreas de estudo entre novembro de 2018 e agosto de 2019; **B**: Número total de novos cães a habitarem as áreas de estudo entre novembro de 2018 e agosto de 2019; **C**: abundância de cães nas áreas de estudo em cada uma das campanhas de captura (Novembro de 2018, fevereiro de 2019, maio de 2019 e agosto de 2019).

4.2 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

4.2.1. Cães

A primeira infestação dos cães foi realizada no dia 12 de março de 2019, sendo seguida de mais três infestações, como descrito no item 3.2.2. Os cães foram monitorados

diariamente, sendo considerados febris quando a temperatura retal fosse superior a 39,5°C. O cão número 2 começou a apresentar febre oito dias após a primeira infestação, enquanto os cães 3 e 4 iniciaram o período febril nove dias após a infestação. Os tempos de duração da febre variaram de 2 dias (cão 4) a 5 dias (cão 3) e a temperatura máxima variou de 39,6°C (cão 4) a 40,5°C (cão 3). O cão do grupo controle (cão 1), o qual não foi infestado com carrapatos infectados, não apresentou qualquer episódio de febre durante todo o período (Gráfico 2).

Gráfico 2 - Temperatura retal de cães avaliada durante 25 dias pós infestação com carrapatos infectados com *Rickettsia rickettsii* (cães 2, 3 e 4) ou não infectados (cão 1). A área sombreada representa o intervalo considerado normal para a espécie

Todos os cães do grupo infectado apresentaram hiporexia e apatia leve durante o período febril. Os cães 2 e 3 apresentaram ainda diarreia e descarga ocular. O cão 2 voltou a se alimentar e a se comportar normalmente após o término da febre, no entanto o cão 3 permaneceu apático, voltando a apresentar febre 3 dias após o término do primeiro período febril. Diante da não melhora do quadro clínico do cão 3, iniciou-se no dia 17 pós infestação tratamento com doxiciclina 5mg/Kg a cada 12h por via oral. 24h após o início do tratamento o animal apresentou ligeira melhora, apresentando-se mais ativo e com temperatura retal dentro da normalidade. No entanto, 12h depois o animal passou a apresentar tremores de cabeça e, no dia seguinte, já se encontrava em decúbito lateral, apresentava nistagmo, rigidez nos quatro membros e estado de consciência bastante diminuído. Diante da indisponibilidade de

doxiciclina injetável e da incapacidade do cão de deglutir, foi administrada uma dose de cloridrato de oxitetraciclina 10mg/Kg por via intramuscular (BREITSCHWERDT et al., 1991). No dia seguinte o cão apresentava o mesmo quadro clínico, passando a apresentar respiração agônica, sendo eutanasiado por meio da administração de pentobarbital sódico por via intravenosa. Foram coletadas amostras de cada um dos órgãos: fígado, baço, pulmão, duodeno, estômago, rins e cérebro; uma amostra de cada órgão foi congelada a -20°C para posterior realização da PCR, como descrito no item 3.2.4.

Curiosamente, 23 dias após a primeira infestação os cães 2 e 4 voltaram a apresentar temperatura retal maior que 39,5°C sem, entretanto, apresentarem qualquer outra manifestação clínica. A temperatura voltou aos parâmetros normais após três dias, sem, no entanto, ser esclarecido o seu agente causal (**Figura 5**).

Figura 5 - Tempo de duração das principais manifestações clínicas observadas em cães infestados por carrapatos infectados com *Rickettsia rickettsii* (cães 2, 3 e 4) ou não infectados (cão 1). A área sombreada representa o intervalo considerado normal para a espécie

Análises sorológicas: todas as amostras de soro dos cães foram submetidas a RIFI para *R. rickettsii* como descrito no item 3.1.2. Os cães 3 e 4 apresentaram títulos iguais ou maiores

que 64 a partir do sétimo dia pós infestação, enquanto o cão 2 apresentou a partir do décimo primeiro dia pós infestação. O maior título observado no cão 2 foi de 65 536, enquanto nos cães 3 e 4 o maior título obtido foi de 8 192. Todas as amostras do cão 1 não tiveram títulos maiores ou iguais a 64 mostrando que de fato apenas os cães do grupo infectado foram expostos a *R. rickettsii* (**Gráfico 3 e Tabela 3**).

Análises moleculares: Em nenhuma das 56 amostras de sangue total obtidas dos quatro cães, nem das oito amostras de tecido obtidas do cão nº3, foi possível detectar a presença de material genético de bactérias do gênero *Rickettsia* através da PCR em tempo real. Para confirmar os resultados negativos e descartar uma possível falha na extração de material genético dessas amostras, foi realizada PCR convencional para amplificação de um fragmento do gene citocromo B (*cyt-B*) da mitocôndria de vertebrados, obtendo-se resultados positivos para todas as amostras. Também as amostras testadas pelos protocolos de PCR em tempo real para detecção de *E. canis* e *R. vitalii* se mostraram negativas, excluindo a possibilidade de uma infecção por esses agentes.

Tabela 3 - Dados clínicos dos cães infestados com adultos de *Amblyomma aureolatum* infectados (cães 2, 3, 4) e não infectado (cão 1) com *Rickettsia rickettsii*

Cão	início da febre (DPI*)	Duração do período febril (dias)	Temperatura máxima (°C)	Título máximo na RIFI ^a	óbito
1	-	-	39.3	<64	não
2	8	4	39.9	65536	não
3	9	5	40.5	8192	sim
4	9	2	39.6	8192	não

*DPI: dia pós infestação

^a Foram coletadas amostras de sangue dos cães em dias alternados durante os 25 dias pós infestação, sendo os respectivos soros submetidos à RIFI para antígenos de *R. rickettsii*. O valor mostrado corresponde ao título final de anticorpos da amostra de soro com maior título dentre as amostras testadas.

Gráfico 3 - Resposta sorológica de cães frente a antígenos de *Rickettsia rickettsii* após infestação com carrapatos infectados avaliada por meio de reação de Imunofluorescência indireta (RIFI)

4.2.2. Carrapatos

Ao todo foram coletadas 99 fêmeas ingurgitadas, sendo 20 fêmeas do cão 1; 31 fêmeas do cão 2; 21 do cão 3; e, 27 do cão 4. O peso médio das fêmeas coletadas do cão 1 (grupo controle) foi de 785,1mg, já o peso médio das fêmeas coletadas dos cães 2, 3 e 4 (grupo infectado) foi de 885,7mg. No grupo controle 50% (10/20) das fêmeas realizaram oviposição, enquanto no grupo infectado foram 76% (60/79). O peso médio da postura das fêmeas do grupo controle foi de 458,4mg, enquanto o do grupo infectado foi de 448,2mg (**Tabela 4**). Não foi observada nenhuma diferença estatística entre o grupo infectado e o grupo controle para os parâmetros descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Dados reprodutivos de fêmeas de *Amblyomma aureolatum* alimentadas em cães infectados (cães 2, 3, 4) e não infectado (cão 1) com *Rickettsia rickettsii* e mantidas a 23°C e UR>95%

	Grupo controle		Grupo infectado		
	Cão 1	Cão 2	Cão 3	Cão 4	Total
Nº de fêmeas expostas	37	37	37	37	111
Nº de fêmeas ingurgitadas recuperadas	20	31	21	27	79
Peso das fêmeas ingurgitadas (mg) ^a	785.1[245.2]	989.5 [284.0]	823.2 [88.7]	838.7 [282.9]	895.4 [270.5]
Proporção de fêmeas que realizaram oviposição (%)	10/20 (50.0)	23/31 (74.2)	18/21 (85.7)	18/27 (66,7)	59/79 (74.7)
Peso da massa de ovos por fêmea (mg) ^a	458.4 [189.4]	463.4 [265.8]	456.0 [166.4]	422.5 [221.7]	448.2 [222.8]
CEI (peso da massa de ovos x 100/peso da fêmea ingurgitada) ^a	55.6 [15.5]	45.0 [24.6]	57.4 [14.4]	44.6 [23.7]	48.5 [22.2]

^a média [desvio padrão]

Análises moleculares: mais de 80% (47/57) das fêmeas alimentadas nos cães do grupo infectado se mostraram positivas na PCR convencional para um fragmento do gene da proteína externa de membrana (*ompA*), quando testadas ao final da postura. Dentre os *pools* de ovos oriundos dessas fêmeas, no entanto, apenas dois se mostraram positivos (2/48; 4,2%). Foram testados individualmente 20 ovos de cada uma das posturas positivas, no entanto, todos se mostraram negativos. Entre os *pools* de larvas não foi possível obter nenhuma amostra positiva. Como esperado, em nenhuma amostra de carrapatos do grupo controle foi detectada presença de bactérias do gênero *Rickettsia* (Tabela 5).

Sequenciamento: Foram selecionadas aleatoriamente nove amostras que foram positivas na PCR convencional para realização do sequenciamento, sendo sete delas de fêmeas e duas de pool de ovos. Foi possível obter sequências de oito delas, sendo todas 100% semelhantes a outras sequências de *R. rickettsii* disponíveis no Gene Bank (NC016913).

Tabela 5 - Detecção de *Rickettsia rickettsii* em fêmeas de *Amblyomma aureolatum* e em seus respectivos ovos e larvas de acordo com o cão e câmara de infestação na qual a fêmea se alimentou, bem como o resultado da infestação de cobaias com *pools* de larvas

Grupos dos cães	Cães (câmara de infestação)	Proporção de fêmeas pós oviposição positivas na PCR (%) ^a	Proporção de <i>pools</i> de ovos infectados (%) ^a	Proporção de <i>pools</i> de larvas infectadas (%) ^a	Proporção de cobaias sororreagentes para <i>R.</i> <i>rickettsii</i> após infestação com larvas (%) ^b
Grupo controle	1 (A)	0/4(0)	0/3 (0)	0/4 (0)	não realizada
	1 (P)	0/6 (0)	0/7 (0)	0/6 (0)	não realizada
	Total (A+P)	0/10 (0)	0/10 (0)	0/10 (0)	
Grupo infectado	2 (A)	8/9 (88.9)	0/9 (0)	0/6 (0)	não realizada
	2 (P)	13/14 (92.9)	1/13 (7.7)	0/13 (0)	1/1 (100.0)
	2 (A+P)	21/23 (91.3)	1/22 (4.5)	0/19 (0)	1/1 (100.0)
	3 (A)	8/10 (80.0)	0/10 (0)	0/9 (0)	0/1 (0)
	3 (P)	6/8 (75.0)	0/8 (0)	0/6 (0)	0/2 (0)
	3 (A+P)	14/18 (77.8)	0/18 (0)	0/15 (0)	0/3 (0)
	4 (A)	6/6 (100)	1/7 (14.3)	0/8 (0)	1/3 (33.3)
	4 (P)	7/8 (87.5)	0/10 (0)	0/9 (0)	1/5 (20.0)
	4 (A+P)	13/14 (92.9)	1/17 (5.9)	0/17 (0)	2/8 (25.0)
	Total (A)	22/25 (88)	1/26 (3.8)	0/23 (0)	1/4 (25.0)
	Total (P)	26/30 (86.7)	1/31 (3.2)	0/28 (0)	2/8 (25.0)
	Total (A+P)	48/55 (87.3)	2/48 (4.2)	0/47 (0)	3/12 (25.0)

^a n° de indivíduos ou *pools* positivos na PCR convencional/n° de indivíduos ou *pools* testados

^b cada uma das cobaias foi infestada com um único *pool* de larvas e teve amostras de sangue coletadas nos dias 0 e 21 pós infestação, sendo os respectivos soros submetidos à RIFI para antígenos de *R. rickettsii*

4.2.3. Infestação das cobaias

Para infestação das cobaias foram selecionadas larvas de 12 posturas, duas que haviam sido positivas na PCR convencional e mais 10 que haviam sido negativas e foram escolhidas de maneira aleatória. Das 12 cobaias infestadas, três apresentaram temperatura retal maior que 39,5°C entre oito e dez dias após a infestação. As mesmas três cobaias soroconverteram, apresentando títulos de anticorpos anti-*R.rickettsii* maiores que 1024 21 dias após a infestação. Nenhuma das cobaias, que não apresentaram febre, apresentou reatividade a *R. rickettsii* na diluição de soro a 1:64 (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Dados clínicos de cobaias infestadas com larvas de *Amblyomma aureolatum*, resultados das análises sorológicas das cobaias e resultado da PCR convencional para o grupo da febre maculosa realizada nos *pools* de ovos das posturas das respectivas larvas. Cada linha da tabela corresponde a uma única cobaia.

Nº do cão	Identificação das larvas	Câmara de alimentação nos cães	PCR dos <i>pools</i> de ovos	DPI* de início da febre	Temperatura máxima	óbito	Título máximo na RIFI ^a
2	2.16	P	positivo	8	40.4	não	>1024
	3.10	A	negativo	-	38.7	não	<64
3	3.2	P	negativo	-	39.0	não	<64
	3.6	P	negativo	-	38.9	não	<64
	4.3	A	positivo	-	38.6	não	<64
4	4.5	A	negativo	9	40.6	não	>1024
	4.10	A	negativo	-	38.2	não	<64
	4.5	P	negativo	-	38.9	não	<64
	4.9	P	negativo	-	38.8	não	<64
	4.10	P	negativo	-	38.8	não	<64
	4.11	P	negativo	10	40.7	não	>1024
	4.14	P	negativo	-	38.4	não	<64

*DPI: dia pós infestação

^a cada uma das cobaias foi infestada com um único *pool* de larvas e teve amostras de sangue coletadas nos dias 0 e 21 pós infestação, sendo os respectivos soros submetidos à RIFI para antígenos de *R. rickettsii*

5. DISCUSSÃO

No estudo de infecção experimental, todos os cães infectados apresentaram manifestações clínicas compatíveis com as observadas em casos naturais de FMB em cães e em outros estudos de infecção experimental com *R. rickettsii* (GASSER et al., 2001; PIRANDA et al., 2008; LABRUNA et al., 2009b; LEVIN et al., 2014), sendo marcada por febre, letargia, redução do apetite, alterações gastrintestinais, descarga ocular e manifestações neurológicas. Apesar de todos os indivíduos infectados serem da mesma raça, apresentarem idades semelhantes e o número de carrapatos infectados colocados em cada cão ser o mesmo, os quadros clínicos observados foram de graus de severidade bastante variados, indo de uma febre moderada em um dos cães, até manifestações neurológicas severas levando ao óbito de outro cão.

Os quadros clínicos apresentados pelos cães nesse estudo foram notadamente mais severos do que os quadros clínicos observados nos cães infectados via parasitismo por carrapatos do estudo de Piranda et al. (2008), apesar da cepa de *R. rickettsii* e a quantidade de carrapatos infectados utilizados nos dois estudos serem os mesmos. Levin et al. (2014) observaram em seu estudo que cães mais velhos apresentaram quadros clínicos mais graves que os cães mais jovens infectados com a mesma cepa de *R. rickettsii*. Assim, a diferença nos quadros clínicos poderia estar associada à idade dos cães, uma vez que Piranda et al. (2008) utilizaram cães de seis meses de idade, enquanto os animais utilizados no presente estudo tinham entre 2 e 3 anos de idade.

O fármaco de eleição para o tratamento de FMB em cães é a doxiciclina, sendo observada remissão dos sintomas entre 24h e 48h após início do tratamento (Breitschwerdt *et al.* 1997, 1999). Em nosso estudo, o tratamento com doxiciclina não impediu a evolução do quadro clínico de um dos cães, o qual evoluiu para um quadro neurológico severo e, por fim, foi eutanasiado. A resposta insatisfatória ao tratamento provavelmente se deve ao seu início tardio (dia 17 pós infestação), uma vez que, mesmo em cães que já apresentam sintomatologia neurológica, a administração de doxiciclina até 14 dias após a infecção costuma lograr total remissão dos sintomas (GASSER et al., 2001; LABRUNA et al., 2009b; LEVIN et al., 2014). As alterações gastrintestinais apresentadas pelo cão também podem ter contribuído para o fracasso do tratamento, uma vez que o fármaco foi administrado por via oral.

Os dois cães do grupo infectado que sobreviveram à infecção tiveram total remissão dos sintomas sem qualquer tipo de sequela. A recidiva da febre em ambos os animais 23 dias após a infestação permanece não esclarecida. É interessante notar que no estudo de Breitschwerdt et al. (1999), todos os grupos de cães experimentalmente infectados com *R. rickettsii* também tiveram uma recidiva da febre sem causa esclarecida cerca de dez dias após o primeiro pico. Adicionalmente, Souza et al. (2009) detectaram a presença de bactérias *R. rickettsii* viáveis no sangue de capivaras experimentalmente infectadas cerca de 15 dias após a primeira bacteremia e um dos cães experimentalmente infectados no estudo de Levin et al. (2014) apresentou uma aparente recidiva do quadro de infecção por *R. rickettsii* cerca de 30 dias após o primeiro pico febril. Com base nesses achados, podemos supor que o breve reaparecimento de sinais clínicos em animais infectados por *R. rickettsii* talvez não seja tão incomum e merece ter suas possíveis causas mais profundamente investigadas.

Os cães do grupo infectado apresentaram títulos altos para *R. rickettsii* poucos dias após a infestação, mostrando que todos eles haviam sido expostos à bactéria, ao contrário do cão do grupo controle. Além disso, todos eles desenvolveram uma bacteremia capaz de infectar novos carrapatos, uma vez que foi detectado DNA da *R. rickettsii* em mais de 80% das fêmeas alimentadas nos três cães. Foram detectadas fêmeas positivas que se alimentaram tanto na câmara A (câmara na qual foram colocados machos infectados e fêmeas não infectadas), quanto na câmara P (câmara na qual foram colocados apenas carrapatos não infectados), demonstrando que de fato houve transmissão sistêmica da *R. rickettsii*.

Resultados semelhantes foram obtidos por Piranda et al. (2011), que logrou detecção do agente da FMB em 100% das fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em cães infectados. No entanto, em seu estudo foi possível também detectar material genético de *R. rickettsii* no sangue dos cães (PIRANDA et al., 2008), o que não ocorreu em nosso estudo, no qual não foi possível detectar a presença de *R. rickettsii* em nenhuma amostra de sangue colhida.

Em outros estudos experimentais com cães foi possível detectar DNA riquetsial em amostras de sangue total durante um período de um a nove dias (PIRANDA et al., 2008; LEVIN et al., 2014). Em nosso estudo, as amostras de sangue foram coletadas em dias alternados, o que diminuiu a sensibilidade de nossa detecção. Além disso, Levin et al. (2014) notaram que os cães mais velhos tiveram períodos mais curtos de bacteremia detectável via PCR (1 a 3 dias), do que cães mais jovens (7 a 9 dias). Isso poderia indicar que os cães desse estudo, todos com mais de 2 anos de idade, poderiam ter de fato níveis detectáveis de *R. rickettsii* durante um período mais curto de tempo.

Por fim, estudos de infecção experimental com *R. rickettsii* em capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e gambás (*Didelphis aurita*) também não foram capazes de detectar a presença de *R. rickettsii* no sangue de boa parte dos animais infectados, apesar de todas terem desenvolvido bacteremia, comprovada por meio da inoculação de sangue em cobaias (HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ et al., 2020). É esperado que a concentração de *R. rickettsii* no sangue seja baixa em vertebrados infectados, uma vez que a mesma infecta células endoteliais, não sendo os nossos resultados, portanto, totalmente inesperados.

Labruna et al. (2011) verificaram em seu estudo que *R. rickettsii* tem efeitos deletérios sobre as fêmeas ingurgitadas de *A. aureolatum*, uma vez que foi observada maior mortalidade entre as fêmeas infectadas e uma menor massa de ovos produzidas pelas mesmas, em comparação às fêmeas não infectadas. Em nosso estudo, entretanto, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre as fêmeas do grupo infectado e as do grupo controle para os parâmetros biológicos avaliados.

Burgdorfer e Brinton (1975) observaram que os efeitos deletérios provocados pela *R. rickettsii* em fêmeas ingurgitadas de diferentes espécies de carrapatos estava diretamente relacionada ao nível de multiplicação da bactéria no tecido ovariano das fêmeas, o qual, por sua vez, estava ligado ao tempo decorrido da infecção da fêmea até o início da oviposição. Desse modo, fêmeas infectadas ainda nos estágios imaturos de vida, como ocorreu no experimento de Labruna et al. (2011) apresentariam uma massiva infecção por *R. rickettsii* no tecido ovariano, explicando o pior desempenho reprodutivo desses indivíduos. Ao contrário, fêmeas infectadas já na fase adulta, como ocorreu no presente estudo, provavelmente apresentariam um acometimento ovariano muito menos extenso, o que explicaria não haver diferenças significativas no desempenho reprodutivo entre elas e as fêmeas do grupo controle.

Enquanto Labruna et al. (2011) encontraram 100% da progênie de suas fêmeas infectadas, nós encontramos menos de 5% dos *pools* de ovos infectados por *R. rickettsii*. Essa baixa proporção de *pools* de ovos infectados estaria também relacionada à infecção tardia das fêmeas. O desenvolvimento dos ovócitos no ovário dos carrapatos é um processo assíncrono, com a existência de ovócitos em diferentes fases de desenvolvimento em um mesmo ovário, assim, a membrana vitelina, a qual impede a entrada da *R. rickettsii* nos ovócitos, não é formada em todos os ovócitos ao mesmo tempo (BURGDORFER; BRINTON, 1975). Em fêmeas infectadas nas fases imaturas, as bactérias são capazes de infectar as células germinativas antes destas formarem a membrana vitelina. Já a infecção durante a fase adulta não permite que isso ocorra a tempo em todos os ovócitos. Desse modo, ovos que são postos

nos primeiros dias da oviposição de fêmeas infectadas na fase adulta podem estar em sua maioria livres de infecção, ao contrário dos postos ao final da postura, os quais, por se desenvolverem mais tardiamente no ovário, têm maiores chances de estarem infectados com *R. rickettsii* (BURGDORFER; BRINTON, 1975).

As características da ovogênese dos carrapatos e da dinâmica de multiplicação da *R. rickettsii* no ovário de fêmeas infectadas na fase adulta resultam em uma massa de ovos heterogênea no que diz respeito à infecção por *R. rickettsii*. Essa heterogeneidade já havia sido demonstrada por Vallejo-Freire (1947). Em seu estudo, uma fêmea de *A. aureolatum* foi alimentada em uma cobaia infectada e a massa de ovos produzida por ela nas primeiras 48 horas de oviposição não continha ovos infectados, uma vez que, ao serem inoculados em cobaias, não produziram nenhum tipo de sinal de infecção, nem tampouco induziram o desenvolvimento de imunidade protetora contra uma infecção subsequente por *R. rickettsii*. Por outro lado, a massa de ovos produzida pela mesma fêmea nos seis dias subsequentes, ao ser inoculada em duas novas cobaias, produziu sinais característicos de uma infecção por *R. rickettsii*, sendo possível manter a bactéria por passagens seriadas nesses animais via inoculação de sangue dos mesmos.

A heterogeneidade da massa de ovos torna mais difícil a detecção de posturas que contenham ovos infectados, uma vez que a amostragem de um único *pool* de ovos pode não conter um único ovo positivo, especialmente se ele corresponder a ovos postos no início da oviposição. De mesmo modo, também se torna desafiador determinar qual a proporção de ovos infectados em uma postura, uma vez que os mesmos não estão distribuídos de maneira uniforme na massa de ovos.

Em nosso estudo, a análise molecular dos ovos foi capaz de detectar apenas dois *pools* de ovos infectados, o que nos levaria a crer que apenas 4,2% (2/48) das fêmeas teriam sido capazes de realizar transmissão transovariana da *R. rickettsii*. No entanto, no ensaio biológico, no qual cobaias foram infestadas com larvas oriundas de diferentes posturas, pudemos verificar que duas das dez posturas selecionadas aleatoriamente continham indivíduos infectados, ou seja, 20% das fêmeas cujas larvas foram testadas foram capazes de transmitir a infecção à sua progênie. A não detecção molecular de *R. rickettsii* nos *pools* de larvas testadas e também em nenhum ovo individualmente testado das posturas positivas nos impossibilitou estimar a proporção de indivíduos infectados nas posturas positivas, mas nos indica que essa proporção é baixa. Este resultado é corroborado pelos estudos prévios citados acima, que demonstraram uma transmissão transovariana apenas parcial, quando a fêmea do carrapato adquire a infecção na fase adulta.

Com esse estudo, pudemos demonstrar que fêmeas de *A. aureolatum* alimentadas em cães infectados por *R. rickettsii* são capazes de transmitir a bactéria de forma eficiente para parte de sua progênie, indicando que a transmissão horizontal da *R. rickettsii* por meio do hospedeiro vertebrado poderia dar origem a novas linhagens de carrapatos infectados, amplificando a infecção na população de *A. aureolatum*. No entanto, como a proporção de ovos infectados parece ser pequena, apesar de não ter sido possível estimá-la com precisão no presente estudo, e a abundância relativa de carrapatos *A. aureolatum* por cão também ser baixa (PINTER et al., 2004), seria interessante a elaboração de modelos matemáticos similares aos já realizados para as áreas de transmissão por *A. sculptum* (POLO et al., 2017, 2018) a fim de se avaliar se a atuação do cão como única espécie de hospedeiro amplificador nas áreas de transmissão por *A. aureolatum* seria suficiente para manter a bactéria na população de carrapatos ao longo de sucessivas gerações.

O inquérito sorológico realizado no Recreio da Borda do Campo mostrou que 31% dos animais foram sororreagentes frente aos antígenos de *R. rickettsii*, a maioria deles apresentando títulos altos (≥ 1024). Além disso, a soroprevalência na parte sul do bairro se mostrou maior que a da parte norte. A soroprevalência encontrada em nosso estudo foi semelhante a encontrada por Scinachi et al. (2017) na mesma área (37%), mas bastante inferior à soroprevalência de 70% encontrada por Moraes-Filho et al. (2009). No entanto, Moraes-Filho et al. (2009) coletaram amostras de sangue apenas de cães que habitavam o entorno dos locais prováveis de infecção (LPI) dos casos humanos de FMB, e não em todo o bairro, como realizado no presente trabalho.

Uma das variáveis analisadas em nosso estudo e que se mostrou associada à soropositividade dos cães foi a “distância ao LPI de casos humanos de FMB”, estando os cães positivos mais próximos do LPI. Essa distribuição não uniforme de cães positivos parece ser uma explicação mais sensata para a maior soroprevalência encontrada por Moraes-Filho et al. (2009), do que de fato uma redução real da soroprevalência no bairro, que poderia ter ocorrido entre os períodos de coleta dos dois trabalhos (2006 e 2015). Essa visão é reforçada pelo fato de que casos humanos continuaram a ocorrer na área durante esse período, mostrando que a bactéria continuou circulando na área durante esse intervalo de anos. A associação entre cães soropositivos e a proximidade com a localização de casos humanos de FMB reforçam o excelente papel do cão como sentinela para casos humanos de FMB em áreas com transmissão associada ao *A. aureolatum*, e seu papel fundamental no transporte de carrapatos infectados de dentro dos fragmentos de mata para o ambiente doméstico, como já discutido

em outros trabalhos (HORTA et al., 2007; PINTER et al., 2008; MORAES-FILHO et al., 2009; OGRZEWSKA et al., 2012; SCINACHI et al., 2017).

Além da “distância ao LPI de casos humanos de FMB”, as outras variáveis analisadas que mostraram associação com a soropositividade dos cães foram a “frequência de acesso não supervisionado à rua” e a “distância à principal via de acesso ao bairro”. A frequência de acesso não supervisionado à rua estar associada à exposição dos cães a carrapatos infectados é esperada, uma vez que o *A. aureolatum* não habita ambientes domésticos, sendo necessário que os cães adentrem fragmentos de mata para se exporem a ele e que cães que passam menos tempo restritos são os que têm maior probabilidade de visitar remanescentes florestais em áreas de Mata Atlântica (BIFFI, 2017). Nesse sentido, seria também razoável pensar que a proximidade da borda de fragmentos de mata também poderia estar associada à exposição de cães a *R. rickettsii*, o que não foi verificado em nossas análises.

Ribeiro et al. (2018) analisaram em seu estudo que a densidade demográfica de cães era uma das principais variáveis que explicava a invasão de remanescentes florestais por cães domésticos, ao contrário da distância das residências dos cães à borda do fragmento de mata. De mesmo modo, Scinachi et al. (2017) também não verificaram associação entre o número de residências a no máximo 500m de distância da borda do fragmento de mata mais próximo e a soroprevalência de cães para *R. rickettsii*. Ribeiro et al. (2018) discutiram que cães são capazes de percorrer longas distâncias e que a área de uso dos cães estaria relacionada a uma série de características individuais que favorecem ou não a ocupação de grandes áreas. Assim, independente da distribuição das residências de cães em relação ao remanescente florestal, quanto maior a densidade de animais em uma determinada área, maior o número de indivíduos com características que favorecem a invasão de fragmentos de mata.

Outra possível explicação para não encontrarmos associação entre a soropositividade dos cães e a distância de suas residências à borda do fragmento de mata pode estar na própria característica de nosso estudo. Nele avaliamos a distância dos cães a borda do fragmento de mata que cerca o bairro, no entanto, esta área tem uma particularidade: a matriz urbana não ocupa toda a área do bairro, sendo praticamente toda entremeada por pequenos fragmentos de mata, conforme previamente avaliado (SCINACHI et al., 2017). Esses pequenos fragmentos no meio da matriz urbana poderiam ser capazes de oferecer as condições necessárias para a manutenção das fases imaturas de *A. aureolatum*, não sendo necessário que os cães tenham acesso ao fragmento maior que circunda a área para entrarem em contato com os carrapatos.

A distância à principal via de acesso ao bairro (o Rodoanel), localizada no extremo norte da área de estudo, estar positivamente associada à soropositividade canina é um fato

interessante. Muitos moradores do bairro relataram que a área é conhecida por ser um local de abandono de cães e que os abandonos costumam ocorrer com mais frequência na parte sul do bairro, mais afastado do Rodoanel. Com efeito, no que se refere à dinâmica populacional dos cães, observou-se uma diferença no número total de animais a habitarem cada uma das áreas durante os nove meses do estudo, mostrando uma maior entrada de novos indivíduos na população na área sul (mais distante do Rodoanel) em relação a área norte, corroborando a percepção dos moradores do bairro.

A entrada de novos indivíduos e consequentemente o número total de animais a habitar a área foram os únicos parâmetros demográficos que se mostraram diferentes entre as duas áreas de estudo. A abundância de cães, apesar de apresentar uma tendência ao declínio na área norte e uma tendência a crescimento na área sul, não se mostrou significativamente diferente entre as duas áreas durante as quatro campanhas. De modo similar, López-Pérez et al. (2020) também não encontraram diferenças na densidade demográfica de cães entre áreas de alto e baixo risco para FMB no Norte do México. Por outro lado, observaram uma maior proporção de filhotes e maiores índices de fecundidade nas áreas de alto risco em relação às de baixo risco, indicando também uma maior introdução de novos animais nessa área.

A introdução de animais suscetíveis em uma população de hospedeiros amplificadores é essencial para a manutenção da *R. rickettsii* em uma população de carrapatos, uma vez que cada indivíduo desenvolve uma única bacteremia ao longo da vida. Considerando que o cão poderia ser um hospedeiro amplificador competente, a maior introdução de novos cães na área sul em relação à área norte poderia contribuir para a manutenção da bactéria na área e explicar a maior soroprevalência nos cães nessa parte do bairro.

Enquanto a introdução de novos indivíduos em uma população de animais silvestres se dá primordialmente pelo nascimento de novos filhotes, nas populações de cães, o principal responsável pela introdução de novos indivíduos em uma população é o transporte mediado por humanos, o qual pode se dar através do abandono, através da aquisição de novos animais ou pela mudança de residência dos próprios tutores (MORTERS et al., 2014; DIAS et al., 2015; SANTOS-BAQUERO et al., 2016). Os modelos de estimativa utilizados em nosso estudo não permitem a diferenciação da entrada de indivíduos em nascimentos e imigração. No entanto, tendo em conta o frequente relato de moradores do bairro sobre o constante abandono de cães na área, o grande número de novos indivíduos a entrar na população durante o estudo e a observação de apenas três filhotes durante todas as campanhas de captura, nos parece razoável pensar que a principal fonte de novos indivíduos nas populações de estudo consiste, de fato, no abandono de cães.

Populações de cães com uma alta taxa de renovação populacional, como a observada em nosso estudo, tornam o planejamento de qualquer intervenção, como vacinação ou desparasitização, bastante desafiador, uma vez que são necessárias intervenções muito mais frequentes para a obtenção do resultado esperado (HAMPSON et al., 2009; MORTERS et al., 2014). No caso da FMB, uma das medidas preventivas preconizadas é a distribuição de coleiras carrapaticidas para os cães de áreas endêmicas (VIEIRA et al., 2002). As coleiras têm um tempo de duração de 3 a 6 meses, exigindo por si só que as distribuições ocorram no mínimo duas vezes por ano. No entanto, considerando uma grande entrada de novos indivíduos, como a observada em nosso estudo, tal intervenção deveria ser ainda mais frequente, tornando a distribuição muito mais dispendiosa em mão de obra e custo. A redução da entrada de novos indivíduos por meio de campanhas de castração também não é simples, tendo se mostrado pouco ou nada eficaz na presença de altas taxas de abandono (AMAKU; DIAS; FERREIRA, 2010; BELO et al., 2017). Assim, compreender os padrões de entrada e saída de cães de uma determinada população, com o foco na ação humana, e não somente nos índices reprodutivos dos cães, nos parece ser primordial no planejamento de ações de controle e prevenção de zoonoses, nas quais o cão tem papel fundamental.

6. CONCLUSÕES

Com esse estudo, pudemos demonstrar que parte das fêmeas de *A. aureolatum* alimentadas em cães infectados por *R. rickettsii* são capazes de transmitir a bactéria de forma eficiente para parte de sua progênie, indicando que o cão poderia atuar como hospedeiro amplificador da *R. rickettsii* para essa espécie de carrapato. Como a taxa de infecção filial parece ser baixa, considerando os resultados obtidos nesse estudo, e como já foi demonstrado que a abundância relativa de carrapatos *A. aureolatum* por cão também é baixa, seria interessante a elaboração de modelos matemáticos similares aos já realizados para as áreas de transmissão por *A. sculptum*. Tais modelos permitiriam avaliar se a atuação do cão como único hospedeiro amplificador nas áreas de transmissão por *A. aureolatum* seria de fato suficiente para manter a bactéria na população de carrapatos ao longo de sucessivas gerações.

A partir das análises sorológicas foi possível verificar que uma maior frequência de acesso não supervisionado à rua, bem como habitar locais mais distantes da principal via de acesso ao bairro aumentam a probabilidade de um cão ser exposto à *R. rickettsii*. A maior prevalência de cães soropositivos na parte sul do bairro associada ao fato de a população de cães desta área sofrer uma maior introdução de novos indivíduos, possivelmente suscetíveis a *R. rickettsii*, reforçam a premissa de que cães poderiam ter um papel importante na manutenção da *R. rickettsii* nessas áreas.

Altas taxas de renovação populacional, como as observadas em nosso estudo, tem um grande impacto na composição da população e devem ser levadas em consideração na elaboração de estratégias de controle de zoonoses. Uma alta renovação populacional torna necessário que as intervenções sejam muito mais frequentes e constantes para que o resultado almejado seja alcançado, o que muitas vezes se torna inviável. Assim, torna-se imperativo procurar reduzir a taxa de entrada de novos indivíduos especialmente pela promoção de posse responsável e pela elaboração de outras estratégias para a redução de abandono de animais.

REFERÊNCIAS

AMAKU, M.; DIAS, R.A.; FERREIRA, F. Dynamics and control of stray dog populations. **Mathematical Population Studies**, v. 17, n. 2, p. 69-78, 2010.

ANGERAMI, R.N.; CÂMARA, M.; PACOLA, M.R.; REZENDE, R.C.; DUARTE, R.M.; NASCIMENTO, E.M.; COLOMBO, S.; SANTOS, F.C.P.; LEITE, R.M.; KATZ, G.; SILVA, L.J. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 5, p. 345-347, 2012.

ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. IX. O complexo Ovale do gênero *Amblyomma*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, n. 59, v. 2, p. 131-148, 1961.

ARZUA, M.; DA SILVA, M.A.N.; FAMADAS, K.M.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. **Experimental & applied acarology**, v.31, n.3-4, p. 283-296, 2003.

ARZUA, M.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 22, n. 3, p. 623-632, 2005.

BAILLARGEON, S.; RIVEST, L.P. Rcapture: Loglinear Models for Capture-Recapture in R. **Journal of Statistical Software**, v. 19, n. 5, p. 1-31, 2007.

BARBIERI, J.M.; DA ROCHA, C.M.; BRUHN, F.R.P.; CARDOSO, D.L.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Altitudinal assessment of *Amblyomma aureolatum* and *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae), vectors of spotted fever group rickettsiosis in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of medical entomology**, v.52, n. 5, p. 1170-1174, 2015

BELO, V.S.; STRUCHINER, C.J.; WERNECK, G.L.; TEIXEIRA NETO, R.G.; TONELLI, G.B.; DE CARVALHO JÚNIOR, C.G.; RIBEIRO, R.A.N.; DA SILVA, E.S. Abundance, survival, recruitment and effectiveness of sterilization of free-roaming dogs: A capture and recapture study in Brazil. **PLoS One**, v.12, n. 11, e0187233, 2017

BIFFI, V.L. **Atributos individuais, formas de manejo e contexto ambiental: quais fatores determinam a chance de cachorros visitarem remanescentes florestais?** 2017. 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2010. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/sociais/populacao/2098-np-censo-demografico/9662-censodemografico-2010.html?&t=microdados>>. Acesso em: janeiro de 2018.

BRASIL. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. 2007-2015. Disponível em: <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892116&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/febremaculosa>>. Acesso em: maio de 2020.

BREITSCHWERDT, E.B.; DAVIDSON, M.G.; AUCOIN, D.P.; LEVY, M.G.; SZABADOS, N.S.; HEGARTY, B.C.; KUEHNE, A.L.; JAMES, R.L. Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 35, n. 11, p. 2375-2381, 1991.

BREITSCHWERDT, E.B.; DAVIDSON, M.G.; HEGARTY, B.C.; PAPICH, M.G.; GRINDEM, C.B. Prednisolone at anti-inflammatory or immunosuppressive dosages in conjunction with doxycycline does not potentiate the severity of *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 41, n. 1, p. 141-147, 1997.

BREITSCHWERDT, E.B.; PAPICH, M.G.; HEGARTY, B.C.; GILGER, B.; HANCOCK, S.I.; DAVIDSON, M.G. Efficacy of doxycycline, azithromycin, or trovafloxacin for treatment of experimental Rocky Mountain spotted fever in dogs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 43, n.4, p. 813-821, 1999.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.26, n. 6, p. 61-72, 1975.

DIAS, E. O cão como provável reservatório do vírus da febre maculosa brasileira. **Brasil Medico**, v. 51, p. 1245-1247, 1937.

DIAS, R.A.; BAQUERO, O.S.; GUILLOUX, A.G.A.; MORETTI, C.F.; DE LUCCA, T.; RODRIGUES, R.C.A.; CASTAGNA, C.L.; PRESOTTO, D.; KRONITZKY, Y.C. GRISI-FILHO, J.H.H.; FERREIRA, F.; AMAKU, M. Dog and cat management through sterilization: implications for population dynamics and veterinary public policies. **Preventive veterinary medicine**, v. 122, n. 1-2, p. 154-163, 2015.

DOYLE, C.K.; LABRUNA, M.B.; BREITSCHWERDT, E.B.; TANG, Y.W.; CORSTVET, R.E.; HEGARTY, B.C.; BLOCH, K.C.; LI, P.; WALKER, D.H.; MCBRIDE, J.W. Detection of medically important *Ehrlichia* by quantitative multicolor TaqMan real-time polymerase chain reaction of the *dsb* gene. **The Journal of Molecular Diagnostics**, v. 7, n. 4, p. 504-10, 2005.

DÜRR, S.; DHAND, N.K.; BOMBARA, C.; MOLLOY, S.; WARD, M.P. What influences the home range size of free-roaming domestic dogs? **Epidemiology & Infection**, n. 145, v. 7, p. 1339-1350, 2017.

GASSER, A.M.; BIRKENHEUER, A.J.; BREITSCHWERDT, E.B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a retrospective study of 30 cases. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 37, n.1, p. 41-48, 2001.

GOMES, L.S. Typho exanthematico de São Paulo. **Brazil-Medico**, v. 47, p. 919-921, 1933.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.B. 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. 841-45, 2005.

GUGLIELMONE, A.A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A.J.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B.; MARTINS, J.R.; VENZAL, J.M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J.E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas 1772) and *Amblyomma ovale* (Koch 1844): hosts, distribution and 16s rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273-288, 2003.

GUILLEN, A.C. **Avaliação da competência de aves passeriformes *Turdus sp* como hospedeiro amplificador da bactéria *Rickettsia rickettsii* para carrapatos da espécie *Amblyomma aureolatum* em condições de laboratório**. 2014. 56p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2014.

HAMPSON, K.; DUSHOFF, J.; CLEAVELAND, S.; HAYDON, D.T.; KAARE, M.; PACKER, C.; DOBSON, A. Transmission dynamics and prospects for the elimination of canine rabies. **PLoS biology**, v. 7, n. 3, e1000053, 2009.

HORTA, M.C.; LABRUNA, M.B.; PINTER, A.; LINARDI, P.M.; SCHUMAKER, T.T. *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.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R.A.; SAITO, T.B.; ROSA, S.C.; OGRZEWALSKA, M.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.9, n. 1, p. 109-118, 2009.

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

LABRUNA, M.B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J.L.; GENNARI, S.M. Seasonal dynamics of ticks (Acari:Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.

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, 2004a.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; POPOV, V.; WALKER, D.H. Rickettsia bellii and Rickettsia amblyommii in Amblyomma ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 41, p. 1073-1081, 2004b

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. **VectorBorne and Zoonotic Diseases**, v. 7, n. 2, p. 249-255, 2007a.

LABRUNA, M.B.; PACHECO, R.C.; RICHTZENHAIN, L.J.; SZABÓ, M.P.J. Isolation of Rickettsia rhipicephali and Rickettsia bellii from Haemaphysalis juxtakochi ticks in the state of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 869-73, 2007b.

LABRUNA, M.B.; OGRZEWALSKA, M.; MARTINS, T.F.; PINTER, A.; HORTA, M.C. Comparative susceptibility of larval stages of Amblyomma aureolatum, Amblyomma cajennense, and Rhipicephalus sanguineus to infection by Rickettsia rickettsii. **Journal of medical entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008.

LABRUNA, M.B. Ecology of Rickettsia in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 156-166, 2009.

LABRUNA, M.B.; KAMAKURA, O.; MORAES-FILHO, J.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C. Rocky Mountain spotted fever in dogs, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 15, n. 3, p. 458, 2009b.

LABRUNA, M.B.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, J.F.; MARTINS, T.F.; SOARES, H.S.; MORAES-FILHO, J.; NIERI-BASTOS, F.A.; ALMEIDA, A.P.; PINTER, A. Experimental

infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 829-34, 2011.

LABRUNA, M.B. Brazilian Spotted Fever: The Role of Capybaras. In: MOREIRA, J.R.; FERRAZ, K.M.P.M.B.; HERRERA, E.A.; MACDONALD, D.W. **Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species**. New York: Springer Science Business Media, 2013., p. 371-383.

LEMONS, E.R.; ALVARENGA, F.B.; CINTRA, M.L.; RAMOS, M.C.; PADDOCK, C.D.; FEREBEE, T.L.; ZAKI, S.R.; FERREIRA, F.C.C.; RAVAGNANI, R.C.; MACHADO, R.D.; GUIMARÃES, M.A.A.M.; COURA, J.R. Spotted fever in Brazil: a seroepidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of São Paulo. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 4, p. 329-334, 2001.

LEVIN, M.L.; KILLMASTER, L.F.; ZEMTSOVA, G.E.; RITTER, J.M.; LANGHAM, G. Clinical presentation, convalescence, and relapse of Rocky Mountain spotted fever in dogs experimentally infected via tick bite. **PLoS One**, v. 9, n. 12, e115105, 2014.

LÓPEZ-PÉREZ, A.M.; OROZCO, L.; ZAZUETA, O.E.; FIERRO, M.; GOMEZ, P.; FOLEY, J. An exploratory analysis of demography and movement patterns of dogs: New insights in the ecology of endemic Rocky Mountain-Spotted Fever in Mexicali, Mexico. **Plos one**, v. 15, n. 5, e0233567, 2020.

LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H.; MCINTOSH, D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 8, n. 4, p. 657-665, 2017.

MANGOLD, A.J.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16s rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, p. 478-484, 1998.

MATOS, M.R.D.; ALVES, M.C.G.P.; REICHMANN, M.D.L.A.; DOMINGUEZ, M.H. Sao Paulo Pasteur Institute Technique for estimating a canine population. **Cadernos de saude publica**, v. 18, n. 5, p. 1423-1428, 2002.

MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; GUTMANN, T.B.; BARBOSA, S.O.; GONZÁLES, M.A.R.M.; MURARO, M.A.; CECÍLIO, S.R.M.; LABRUNA, M.B. New epidemiological data on Brazilian Spotted fever in an endemic area of the state of São Paulo, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 73-78, 2009.

MORAES-FILHO, J.; COSTA, F.B.; GERARDI, M.; SOARES, H.S.; LABRUNA, M.B. *Rickettsia rickettsii* co-feeding transmission among *Amblyomma aureolatum* ticks. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 11, p. 2041-2048, 2018.

MORTERS, M.K.; MCKINLEY, T.J.; RESTIF, O.; CONLAN, A.J.; CLEAVELAND, S.; HAMPSON, K.; WHAY, H.R.; DAMRIYASA, I.M.; WOOD, J.L. The demography of free-roaming dog populations and applications to disease and population control. **Journal of Applied Ecology**, v. 51, n. 4, p. 1096-1106, 2014.

NASSER, J.T.; LANA, R.C.; SILVA, C.M.S.; LOURENÇO, R.W.; SILVA, D.C.C.; DONALÍSIO, M.R. Urbanization of Brazilian spotted fever in a municipality of the Southeastern region: epidemiology and spatial distribution. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, n. 2, p. 299-312, 2015.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D.G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; COSTA, F.B.; PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1283-300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; MARTINS, T.F.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infections in ticks from wild birds in Paraguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 2, p. 83-89, 2014.

OGRZEWALSKA, M.; PINTER, A. Ticks (Acari: Ixodidae) as ectoparasites of Brazilian wild birds and their association with rickettsial diseases. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 53, n. 1, p. 1-31, 2016.

PACHECO, R.C.; ARZUA, M.; NIERI-BASTOS, F.A.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L.J.; BARROS BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in ticks (Acari: Ixodidae) collected on birds in southern Brazil. **Journal of medical entomology**, v. 49, n. 3, p. 710-716, 2012.

PARKER, R.R.; PHILIP, C.B.; JELLISON, W.L. Rocky mountain spotted fever. Potentialities of tick transmission in relation to geographic occurrence in the United States. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, p. 341-78, 1933.

PAROLA, P.P.; LABRUNA, M.B.; RAOULT, D. Tick-Borne Rickettsioses in America: Unanswered Questions and Emerging Diseases. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 1, p. 40-50, 2009.

PAROLA, P.; PADDOCK, C.D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M.B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M.Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER,

P.E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 4, p. 657-702, 2013.

PEREZ, C.A.; ALMEIDA, A.F.; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V.H.; BALESTRIN, D.C.; GUIMARÃES, M.S.; COSTA, J.C.; RAMOS, L.A.; ARRUDA-SANTOS, A.D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C.P.; BARROS-BATTESTI, D.M. 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, n. 4, p. 210-17, 2008.

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

PINTER, A. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa brasileira em um foco endêmico no estado de São Paulo**. 2007. 86 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

PINTER, A.; HORTA, M.C.; PACHECO, R.C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. **Cadernos de saúde pública**, v. 24, n. 2, p. 247-252 2008.

PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia belli* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523-29, 2006.

PINTER, A.; FRANÇA, A.C.; SOUZA, C.E.; SABBO, C.; NASCIMENTO, E.M.M.; SANTOS, F.C.P.; KATZ, G.; LABRUNA, M.B.; HOLCMAN, M.M.; ALVES, M.J.C.P.; HORTA, M.C.; MASCHERETTI, M.; MAYO, R.C.; ANGERAMI, R.N.; BRASIL, R.A.; LEITE, R.M.; APARECIDA, S.S.; SOUZA, L.; COLOMBO, S.; OLIVEIRA, V.L.M. Febre Maculosa Brasileira. **Suplemento Bepa**, v. 8, n. 1, p. 32-51, 2011.

PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H.; PINTER, A.; SAITO, T.B.; PACHECO, R.C.; HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 7, p. 696-701, 2008.

PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; CANÇADO, P.H.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the

bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 1, p. 29-36, 2011.

PIZA, J.T.; MEYER, G.R.; GOMES, L.S. Typho Exanthematico De São Paulo. *Sociedade Impressora Paulista*, p. 138-156. 1932.

POLO, G.; ACOSTA, C.M.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 6, e0005613, 2017.

POLO, G.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F. Basic reproduction number for the Brazilian Spotted Fever. **Journal of theoretical biology**, v. 458, p. 119-124, 2018.

QGIS DEVELOPMENT TEAM (2016). QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. URL <http://qgis.org>.

R CORE TEAM (2019) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; UCHOA, F.; DE AZEVEDO SERPA, M.C.; BINDER, L.C.; RODRIGUES, A.C.; SZABÓ, M.P.; FOGAÇA, A.; SOUZA, C.E.; LABRUNA, M.B. Clinical and serological evaluation of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) successively exposed to an *Amblyomma sculptum*-derived strain of *Rickettsia rickettsii*. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-15, 2020.

REGNERY, R.L.; SPRUILL, C.L.; PLIKAYTIS, B.D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576–1589, 1991.

RIBEIRO, F.S.; NICHOLS, E.; MORATO, R.G.; METZGER, J.P.; PARDINI, R. Disturbance or propagule pressure? Unravelling the drivers and mapping the intensity of invasion of free-ranging dogs across the Atlantic forest hotspot. **Diversity and Distributions**, v. 25, n. 2, p. 191-204, 2019.

RIVEST, L.P.; BAILLARGEON, S. (2019). Rcapture: Loglinear Models for Capture-Recapture Experiments. R package version 1.4-3. URL <https://CRAN.R-project.org/package=Rcapture>.

ROUX, V.; FOURNIER, P.E.; RAOULT, D. Differentiation of spotted fever group rickettsiae by sequencing and analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified

DNA of the gene encoding the protein rOmpA. **Journal of clinical microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2058-2065, 1996.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2ed, Michigan, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.

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.

SANTOS-BAQUERO, O.; AKAMINE, L.A.; AMAKU, M.; FERREIRA, F. Defining priorities for dog population management through mathematical modeling. **Preventive veterinary medicine**, v. 123, p. 121-127, 2016.

SÃO PAULO. Fundação Sistema Estadual de Análise de Dados. Índice Paulista de Vulnerabilidade Social. 2010. Disponível em: <<http://ipvs.seade.gov.br/view/index.php>>. Acesso em: maio de 2018.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica “Prof Alexandre Vranjac”. 2020. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/febre-maculosa/dados-estatisticos>>. Acesso em: maio de 2020.

SARAIVA, D.G.; SOARES, H.S.; SOARES, J.F.; LABRUNA, M.B. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 9, p. 1504-1510, 2014.

SCINACHI, C.A.; TAKEDA, G.A.C.G.; MUCCI, L.F.; PINTER, A. Association of the occurrence of Brazilian spotted fever and Atlantic rain forest fragmentation in the São Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**, v. 166, p. 225-233, 2017.

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, p. 1111–1113, 2007.

SLATER, M.R. The role of veterinary epidemiology in the study of free-roaming dogs and cats. **Preventive veterinary medicine**, v. 48, n. 4, p. 273-286, 2001.

SOARES, J.F.; SOARES, H.S.; BARBIERI, A.M.; LABRUNA, M.B. 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, n. 2, p. 139-151, 2012.

SOARES, J.F.; COSTA, F.B.; GIROTTO-SOARES, A.; DA SILVA, A.S.; FRANÇA, R.T.; TANIWAKI, S.A.; DALL'AGNOL, B.; RECK, J. HAGIWARA, M.K.; LABRUNA, M.B. Evaluation of the vector competence of six ixodid tick species for *Rangelia vitalii* (Apicomplexa, Piroplasmorida), the agent of canine rangelirosis. **Ticks and Tick Borne Diseases**, v. 9, n. 5, p. 1221-34, 2018.

SOUZA, C.E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F.C.; 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, n. 1-2, p. 116-121, 2009.

SOUZA, C.E.; PINTER, A.; DONALISIO, M.R. Risk factors associated with the transmission of Brazilian spotted fever in the Piracicaba river basin, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48, n. 1, p. 11- 17, 2015.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MACHADO, R.Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A.M.; DONATELE, D.M.; PINHEIRO, S.R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K.M.; YOSHINARI, N.H. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 201-206, 2010.

STTEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, v. 97, p. 247-254, 2005.

TIRIBA, A.C. Geografia médica das riquetsioses. In: LACAZ, C.S.; BARUSSI, R.G.; SIQUEIRA, W. **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo: Edgard Blucher/Edusp, 1972, p. 388-397.

TORRES, P.C.; PRADO, P.I. Domestic dogs in a fragmented landscape in the Brazilian Atlantic Forest: abundance, habitat use and caring by owners. **Brazilian Journal of Biology**, v. 70, n. 4, p. 987-994, 2010.

VALLEJO-FREIRE, A. Transmissão do vírus da febre maculosa mexicana por *Amblyomma striatum* Koch, 1944. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 20, p. 107-112, 1947.

VENZAL, J.M.; FÉLIX, M.L.; OLMOS, A.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. A collection of ticks (Ixodidae) from wild birds in Uruguay. **Experimental & applied acarology**, v. 36, n. 4, p. 325-331, 2005.

VIEIRA, A.M.L.; SOUZA, C.D.; LABRUNA, M.B.; MAYO, R.C.; SOUZA, S.S.L.; CAMARGO-NEVES, V.L.F. Manual de vigilância acarológica, Estado de São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde-Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN São Paulo). São Paulo: Editora do Estado, 2002. 60 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION; WORLD SOCIETY FOR THE PROTECTION OF ANIMALS (WHO/WSPA). **Guidelines for dog population management**. Geneva: World Health Organization, 1990.

YOUNG, J.K.; OLSON, K.A.; READING, R.P.; AMGALANBAATAR, S.; BERGER, J. Is wildlife going to the dogs? Impacts of feral and free-roaming dogs on wildlife populations. **BioScience**, v. 61, n. 2, p. 125-132, 2011.

ANEXO A - QUESTIONÁRIOS APLICADOS AOS TUTORES DE CÃES**Questionário 1**

Numero do Cão: _____ Nome: _____

Nome do Tutor: _____

Endereço: _____

Idade: _____ Sexo: _____ Raça: _____

Há quanto tempo vive no bairro? _____

Onde o cão é criado? ☐ dentro de casa ☐ quintal/dentro de casa ☐ quintal

Acesso à rua: ☐ diário ☐ semanal ☐ mensal ☐ raro ☐ ausente

Questionário 2

Nº do entrevistado: _____ Data: _____

Endereço: _____

Nome (opcional): _____

Sexo: masculino () feminino ()

Idade (anos): _____ Há quanto tempo vive no local (anos): _____

1-Você já ouviu falar sobre uma doença chamada febre maculosa?

- () sim
() não
() não sabe informar

Se sim, o tratamento é efetivo?

- () sim
() não
() não sabe informar

2-Você conhece ou conheceu alguém que teve febre maculosa?

- () sim
() não
() não sabe informar

6-Como a febre maculosa é transmitida?

- () carrapato
() mosquito
() não sabe informar
()

outro _____

3-Quais os sintomas da febre maculosa?

- () febre
() dor de cabeça
() dores no corpo
() manchas na pele
() não sabe informar
() outros

7-De onde vem o transmissor da febre maculosa?

- () da mata
() da cidade
() do lixo
() do esgoto
() do ar
() dos ratos
() das aves
() dos cães
() das capivaras
() dos cavalos
() não sabe informar
()

outros _____

4-A febre maculosa pode matar?

- () sim
() não
() não sabe informar

5-Existe tratamento para evitar a morte pela febre maculosa?

- () sim
() não
() não sabe informar

8-Como podemos prevenir a febre maculosa?

- () evitando carrapatos

- () evitando contato com cães
() evitando contato com matas
() evitando contato com capivaras
() outros
-
-

9-Você tem cães?

- () sim
() não

Se sim,
quantos? _____

10-Algum de seus cães tem acesso às
matas?

- () sim
() não
() não sabe informar

11-É comum ver carrapatos nos seus cães?

- () sim

- () não
() não sabe informar

12-Com que frequência você aplica
produtos carrapaticidas nos seus cães?

- () nunca
() não me lembro
() muito raramente
() uma vez por ano
() duas vezes por ano
() três vezes por ano
() quatro ou mais vezes por ano
() todos os meses
() não sabe informar

13-Sua casa já teve visitas educativas sobre
febre maculosa pela vigilância sanitária?

- () sim
() não
() não sabe informar

Se sim, com que frequência? _____