

Universidade de São Paulo
Faculdade de Saúde Pública

Claudia Araujo Scinachi

**Avaliação da competência de cães domésticos como hospedeiros
amplificadores da bactéria *Rickettsia rickettsii* para carrapatos
Amblyomma aureolatum e modelagem espacial ecológica preditiva
para ocorrência de Febre Maculosa Brasileira no Estado de São
Paulo**

São Paulo

2022

Claudia Araujo Scinachi

**Avaliação da competência de cães domésticos como hospedeiros
amplificadores da bactéria *Rickettsia rickettsii* para carrapatos
Amblyomma aureolatum e modelagem espacial ecológica preditiva
para ocorrência de Febre Maculosa Brasileira no Estado de São
Paulo**

Tese de doutorado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Saúde
Pública da Faculdade de Saúde Pública da
Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Saúde Pública

Orientador: Adriano Pinter dos Santos

Versão Corrigida

São Paulo

2022

Ficha Catalográfica

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação

Ficha elaborada pelo Sistema de Geração Automática a partir de dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bibliotecária da FSP/USP: Maria do Carmo Alvarez - CRB-8/4359

Scinachi, Claudia Araujo

Avaliação da competência de cães domésticos como hospedeiros amplificadores da bactéria *Rickettsia rickettsii* para carrapatos *Amblyomma aureolatum* e modelagem espacial ecológica preditiva para ocorrência de Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo / Claudia Araujo Scinachi; orientador Adriano Pinter dos Santos. -- São Paulo, 2022.

101 p.

Tese (Doutorado) -- Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, 2022.

1. Febre Maculosa Brasileira. 2. Modelagem. 3. Hospedeiro amplificador. 4. *Rickettsia rickettsii*. 5. *Amblyomma aureolatum*. I. Pinter dos Santos, Adriano, orient. II. Título.

Folha de Avaliação

Discente: Claudia Araujo Scinachi

Título: Avaliação da competência de cães domésticos como hospedeiros amplificadores da bactéria *Rickettsia rickettsii* para carrapatos *Amblyomma aureolatum* e modelagem espacial ecológica preditiva para ocorrência de Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo

Tese de doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo.

Área de concentração: Saúde Pública

Orientador: Adriano Pinter dos Santos

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Julgamento 1º membro da banca

Julgamento 2º membro da banca

Julgamento 3º membro da banca

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Adriano Pinter dos Santos pela oportunidade, pela compreensão e pela generosidade em dividir seu conhecimento ao longo de todos esses anos durante o mestrado e o doutorado.

Às minha queridas companheiras de jornada Gabriela, Michellin e Daniele, que sorte contar com o apoio e amizade de vocês.

Um agradecimento especial a Francisco Uchoa (in memorian) por toda a contribuição durante o experimento.

A todos os funcionários e alunos da Sucen de Mogi-Guaçu e da sede em São Paulo, obrigada por me receberem com tanto carinho.

Ao Jonas, Lina, Carolina e Marcelo pelo auxílio e atenção nos meus dias na FMVZ.

Ao André Luis Acosta e Franciso D´Albertas pelas contribuições nas análises de modelagem e regressão.

A banca de qualificação deste doutorado (Luis Felipe Mucci, Paula Prist, Marcelo Bahia Labruna, Francisco Chiaravalloti) pelas contribuições e sugestões no início do projeto.

A Sucen e FMVZ pelo suporte para a condução do experimento, análises moleculares e sorológicas.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil CAPES – pelo financiamento parcial deste trabalho (Código 001).

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento da bolsa de estudos (Processo nº 2017/05255-8).

A minha mãe, por todo o amor, carinho e dedicação.

Ao meu marido Michael, pelo apoio durante todo esse processo, e por se fazer presente nos pequenos gestos.

Aos animais que participaram do estudo, minha eterna gratidão.

DEDICATÓRIA

A todos aqueles que se dedicam ao desenvolvimento da ciência no Brasil.

RESUMO GERAL

SCINACHI, C. A. **Avaliação da competência de cães domésticos como hospedeiros amplificadores da bactéria *Rickettsia rickettsii* para carrapatos *Amblyomma aureolatum* e modelagem espacial ecológica preditiva para a ocorrência de Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo.** 2022. Tese (Doutorado em Saúde Pública – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022).

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma zoonose transmitida por vetores que tem como agente patogênico, bactérias da espécie *Rickettsia rickettsii*. Na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), o vetor incriminado na transmissão é o carrapato *Amblyomma aureolatum*, que depende de características ambientais típicas do bioma Mata Atlântica para sobreviver. Cães domésticos são os principais hospedeiros do estágio adulto do carrapato em áreas de matriz urbana próxima a áreas de mata fragmentada, e participam do ciclo da doença ao carrear carrapatos infectados da mata para o ambiente antrópico. Além disso, são hospedeiros amplificadores do agente e contribuem para o aumento do número de carrapatos infectados na natureza. Com o objetivo de elucidar as lacunas em relação a FMB na RMSP, o presente estudo testou a hipótese de que cães domésticos atuariam como hospedeiros amplificadores da bactéria *R.rickettsii* para carrapatos da espécie *A. aureolatum* após um segundo contato com o agente. Os resultados mostraram que apesar de apresentarem uma resposta imunológica, com aumento no título de anticorpos, os cães não foram capazes de gerar novas linhagens de carrapatos infectados. Esse estudo determinou, por meio de modelagem espacial, quais as áreas mais ou menos propensas a apresentarem casos de FMB levando em consideração as condições necessárias para ocorrência do vetor *A. aureolatum* e os aspectos ecológicos que facilitam a interação do vetor com seus hospedeiros no ambiente. As variáveis ambientais de altitude e temperatura mostraram-se de maior influência para a distribuição do vetor enquanto o aumento do perímetro de borda e redução de áreas de mata favorecem a ocorrência de casos de FMB. Este estudo traz novos dados sobre a ecoepidemiologia da Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo e chama atenção para a importância dos cães domésticos no ciclo da doença que ocorre na Região Metropolitana do estado. Ações de prevenção com foco na população de cães se mostram de extrema importância para a redução da incidência da doença e melhoria das condições de saúde da população.

Palavras-chave: Febre Maculosa Brasileira, modelagem, hospedeiro amplificador, cães, *Rickettsia rickettsii*, *Amblyomma aureolatum*.

ABSTRACT

SCINACHI, C. A. **Evaluation of domestic dogs as competent amplifier hosts of the bacterium *Rickettsia rickettsii* for *Amblyomma aureolatum* ticks and predictive spatial ecological modeling for the occurrence of Brazilian Spotted Fever in the State of São Paulo.** 2022. Tese (Doutorado em Saúde Pública – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

Brazilian Spotted Fever (BSF) is a vector-borne zoonosis whose agent is the bacteria *Rickettsia rickettsii*. In the São Paulo Metropolitan Region (SPMR), the vector responsible for the disease transmission is the tick *Amblyomma aureolatum*, which depends on environmental characteristics of the Atlantic Forest biome to survive. Domestic dogs are the main hosts of the adult stage of the tick in areas of urban matrix close to fragmented forest, and participate in the disease cycle by carrying infected ticks from the forest to the anthropic environment. Furthermore, they can amplify the bacteria and contribute to increase the number of infected ticks in nature. In order to elucidate the gaps in relation to BSF in the SPMR, this study tested the hypothesis that dogs could act as amplifying hosts of *R. rickettsii* for *A. aureolatum* ticks after a second contact with the agent. The results showed that the dogs could not generate new infected tick strains despite an immune response with increased antibody titers. This study also determined, through spatial modeling, which areas are more likely to present cases of BSF, taking into account the necessary conditions for *A. aureolatum* occurrence and the ecological aspects that facilitate the interaction of the vector with its hosts in the environment. The environmental variables of altitude and temperature showed to have the greatest influence on vector distribution, while the increase in edge perimeter and decrease in forest cover favored the occurrence of BSF. This study brings new data on the ecoepidemiology of Brazilian Spotted Fever in the State of São Paulo and draws attention to the importance of domestic dogs in the disease cycle in the Metropolitan Region of the state. Prevention actions focused on dog population are extremely important to reduce disease incidence and improve the human population's health conditions.

Keywords: Brazilian Spotted Fever, modeling, amplifying hosts, dogs, *Rickettsia rickettsii*, *Amblyomma aureolatum*.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AIC	Do inglês “Akaike Information Criteria” – Critério de Informação de Akaike
AUC	Do inglês “Area Under the Curve”
BSF	Do inglês “Brazilian Spotted Fever”
BLASTn	Do inglês, “Basic Local Alignment Search Tool – Nucleotide”
B.O.D	Do inglês “Biochemical Oxygen Demand” – Demanda Bioquímica de Oxigênio
°C	Graus Celsius
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CVE	Centro de Vigilância Epidemiológica
DNA	Do inglês “Deoxyribonucleic Acid”- Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Do inglês “Ethylenediamine Tetraacetic Acid” – Ácido etilendiamino tetraacético
ESP	Estado de São Paulo
EUA	Estados Unidos da América
ExoSAP	Do inglês “Exonuclease” e “Shrimp Alkaline Phosphatase”
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMMR	Febre Maculosa das Montanhas Rochosas
GIS	Do inglês “Geographic Information System” – Sistema de Informação Geográfico
GFM	Grupo da Febre Maculosa
<i>gltA</i>	Gene Citrato Sintase
GT	Grupo do Tifo
<i>htrA</i>	Do inglês “High-temperature requirement A”
IC	Intervalo de confiança
Km	Quilômetros
LECOS	Do inglês “Landscape Ecology Statistics”
LL	Do inglês “Log likelihood”
M	Molar
min	Minutos
ml	Mililitros
MEM	Do inglês “Minimum Essential Medium”
<i>ompA</i>	Do inglês “Outer Membrane Protein A” – Gene da Proteína Externa de Membrana A’
PBS	Do inglês “Phosphate Buffered Saline” - Buffer Salino Fosfato
PCR	Do inglês “Polymerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase

pb	Pares de base
pH	Potencial hidrogeniônico
Q-GIS	Quantum Gis
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RMSP	Região Metropolitana de São Paulo
ROC	Do inglês “Receiver Operating Characteristic”
rpm	Rotações por minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
SINAN	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
SP	São Paulo
SPMR	Do inglês “São Paulo Metropolitan Region”
SRTM	Do inglês “Shuttle Radar Topography Mission”
SUCEN	Superintendência de Controle de Endemias
Taq	DNA polimerase termoestável extraída da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris Borato EDTA
™	Do inglês “Trade mark”- Marca Comercial
µl	Microlitros
µg	Microgramas
USP	Universidade de São Paulo
Vero	Linhagem celular de rim de macaco verde africano
VIF	Do inglês “Variance Inflation Factor” – Fator de Inflação de Variância
%	Por cento
®	Marca registrada

LISTA DE GRÁFICOS, FIGURAS e TABELAS

CAPÍTULO 1

Table 1: Genes used in molecular analysis to <i>R. rickettsii</i> detection.....	47
Graphic 1: Guinea pigs (1 and 2) temperature evolution per day post-infestation.....	51
Graphic 2: Dogs (1 and 2) temperature evolution per day post-infestation.....	52
Graphic 3: Dogs antibody titer evolution during the experiment.....	53

CAPÍTULO 2

Table 1: Bioclimatic and elevation variables obtained from Worldclim data base.....	67
Figure 1: Potential distribution of the vector <i>A. aureolatum</i> in Atlantic Rainforest biome in São Paulo State.....	70

CAPÍTULO 3

Figure 1: <i>A. aureolatum</i> occurrence in the Atlantic Forest biome in the State of São Paulo divided between presence or absence of BSF cases.....	83
Figure 2: Forest areas in São Paulo State extracted from Mapbiomas collection 4,1.....	84
Table 1: Landscape ecology metrics.....	84
Table 2: Results of the selected models ordered by the Akaike evaluation (smallest to largest) corrected for small samples (AICc), difference between the AICc values for each model ($\Delta AICc$), weight for each model and the loglikelihood (LL).....	86
Graphic 1: Variables that showed statistical significance in the linear mixed models.....	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	16
2. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO	21
REFERÊNCIAS	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. CAPÍTULO 1.....	26
3.1.1. Cães.....	26
3.1.2. Colônia de carrapatos.....	27
3.1.3. Bactéria <i>Rickettsia rickettsii</i>	27
3.1.4. Infecção de carrapatos com <i>R. rickettsii</i>	27
3.1.5. Infecção experimental dos cães.....	28
3.1.6. Extração de DNA.....	29
3.1.7. Reação em Cadeia de Polimerase (PCR).....	29
3.1.8. Eletroforese.....	30
3.1.9. Sequenciamento genético.....	31
3.1.10. Sorologia (RIFI).....	31
3.2. CAPÍTULO 2.....	32
3.2.1. Dados de ocorrência.....	32
3.2.2. Dados ambientais.....	33
3.2.3. Modelo de distribuição de espécies.....	35
3.3. CAPÍTULO 3.....	36
3.3.1. Área de estudo.....	36
3.3.2. Febre Maculosa Brasileira e variáveis exploratórias.....	37
3.3.3. Análise estatística.....	39
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
4.1. CHAPTER 1.....	40
4.2. CHAPTER 2.....	62
4.3. CHAPTER 3.....	78

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
ANEXO A.....	96
ANEXO B.....	97
ANEXO C.....	100
ANEXO D.....	101

1.INTRODUÇÃO GERAL

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma doença originária do continente americano e de notificação compulsória desde 2001. A transmissão de seu agente etiológico, a bactéria *Rickettsia rickettsii*, ocorre por meio de carrapatos vetores que pertencem ao gênero *Amblyomma* (LABRUNA, 2009).

A primeira descrição detalhada da doença ocorreu em 1929 e foi feita na cidade de São Paulo por José Toledo Piza, do Hospital de Isolamento Emílio Ribas com colaboração de Juvenal Ricardo Meyer e Luis de Salles Gomes, ambos do Instituto de Bacteriologia. Nesse período (1929-1931) notou-se um aumento de casos de uma doença até então desconhecida, que se diferenciava do tifo exantemático clássico. Assim, inicialmente o agravo recebeu o nome de “Typho Exantemático de São Paulo”, até que, em 1932, Piza verifica a semelhança desta doença com a Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (FMMR) que ocorria nos Estados Unidos da América (EUA), hipótese confirmada em estudos subsequentes sobre o agente da doença. (PIZA; MEYER; GOMES, 1932; TRAVASSOS; DIAS, 1939).

Nos EUA a primeira publicação sobre a FMMR foi feita por Edward E. Maxey, em 1899. Em continuidade aos estudos sobre essa enfermidade, o patologista Howard Taylor Ricketts fez contribuições fundamentais para o melhor entendimento do modo de infecção do agente da doença, até então desconhecido, além de ter identificado o carrapato *Dermacentor andersoni* como vetor e demonstrado a transmissão transovariana e perpetuação transestadial do agente. Em 1919, Wolback, após descrever o agente etiológico nomeia o agente hoje conhecido como *R. rickettsii* (RICKETS, 1909; BURGDORFER, 1977).

A Febre Maculosa foi também descrita no, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia e Argentina recebendo diferentes denominações de acordo com sua localização (BUSTAMANTE;VARELA, 1943; PATINO; AFANADOR; PAUL, 1937; RODANICHE, 1953; FUENTES, 1979; PADDOCK *et al*, 2008; LABRUNA *et al*, 2011; HIDALGO, FACCINI-MARTINEZ; VALBUENA, 2013).

No Brasil, os casos da doença foram relatados do final da década de 1920 até a década de 1940 quando houve um aparente silêncio epidemiológico. No fim da década de 80 novos casos voltaram a ser relatados (LABRUNA, 2009; SÃO PAULO, 2020). Durante as primeiras descrições de casos dessa doença, as altas taxas de letalidade observadas chamavam atenção. Vieira e Mesquita (1933) citam taxas por

volta de 75%. Isso ocorre principalmente por conta do diagnóstico tardio e consequente demora no início do tratamento da doença que, em sua fase inicial, apresenta sintomas inespecíficos similares a dengue, gripe, leptospirose e meningite meningocócica (ANGERAMI *et al*, 2006; OLIVEIRA *et al*, 2016).

O período de incubação da doença varia de cinco a quatorze dias (média de sete dias). O quadro clínico inicial se caracteriza por febre de início agudo, mal-estar, cefaleia, calafrios, mialgia, artralgia, anorexia, vômito e dor abdominal. Alguns casos apresentam exantema, considerado como sinal diagnóstico maior, com início nos punhos e tornozelos, disseminando-se posteriormente para todo o corpo. Com a evolução do quadro, os pacientes evoluem para necrose e gangrena nas extremidades, hemorragia e coagulação intravascular disseminada. Casos graves também podem apresentar complicações respiratórias renais e neurológicas. O diagnóstico da doença é feito por meio de método sorológico de Imunofluorescência Indireta (RIFI) considerado padrão ouro para a detecção de riquetsioses (VALBUENA, 2010; ANGERAMI *et al*, 2012; HIDALGO; FACCINI-MARTINEZ; VALBUENA, 2013).

A bactéria *R. rickettsii*, agente etiológico da FMB, é considerada a riquetsiose mais patogênica do mundo e tem sua distribuição restrita às Américas. Os carrapatos são considerados reservatórios e vetores naturais desse agente (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; LABRUNA, 2009).

O gênero *Rickettsia* pode ser dividido em quatro grupos distintos de acordo com suas características moleculares e filogenéticas: o grupo do tifo (GT) composto por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; o grupo da febre maculosa (GFM) com mais de 15 espécies descritas incluindo *R. rickettsii* e *Rickettsia parkeri*; o grupo ancestral formado por *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*; e o grupo transicional composto pela *Rickettsia akari*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia australis*. Hoje existem cerca de 30 espécies desse gênero relatadas ao redor do mundo (LABRUNA *et al*, 2007; PACHECO *et al*, 2012; PAROLA *et al*, 2013; BLANTON, 2019; DIOP; RAOUT; FOURNIER, 2019).

No Brasil, as espécies de importância para saúde humana são *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Enquanto a primeira é responsável pela maioria dos casos e apresenta alta letalidade, a segunda foi incriminada na transmissão de uma Febre Maculosa branda em algumas regiões do país (SPOLODORIO *et al*, 2010; SILVA *et al*, 2011; BARBIERI *et al*, 2014; KRAWCZAK *et al*, 2016). O termo Febre Maculosa Brasileira é habitualmente utilizado como referência a doença causada por *R. rickettsii*.

O Estado de São Paulo é a unidade federativa com maior número de casos relatados desde a implementação do sistema de notificação deste agravo. Dados atualizados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo (CVE), através de dados coletados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), divulgaram o número de 1040 casos de FMB entre os anos de 2007-2021 com 549 óbitos (letalidade de 54,4%), (SÃO PAULO, 2021).

Nesse local os casos de FMB ocorrem em regiões que apresentam ecoepidemiologia distintas. Apesar do mesmo agente etiológico, os hospedeiros e vetores que participam do ciclo da doença variam. No interior do Estado, os casos estão relacionados ao vetor da espécie *Amblyomma sculptum* enquanto na Região Metropolitana de São Paulo (RMSP), em áreas de ocorrência do bioma Mata Atlântica, os casos têm relação com a espécie *Amblyomma aureolatum* e estão restritos a área sul, incluindo os municípios de São Paulo, Diadema, São Bernardo, Santo André, Mauá, Ribeirão Pires e Mogi das Cruzes (PINTER *et al*, 2008; OGRZEWALSKA *et al*, 2012).

O papel da espécie *A. aureolatum* na epidemiologia da FMB foi levantado desde o início dos estudos da doença no Brasil (GOMES, 1933; FONSECA 1935), e assumiu mais destaque com passar do tempo e aprofundamento dos dados científicos. Hoje, os relatos de casos humanos de FMB, associados a essa espécie, se restringem a RMSP, apesar de sua abrangência geográfica se estender pelo sul e sudeste brasileiro (LABRUNA *et al*, 2011; GUGLIELMONE *et al*, 2003; GUGLIELMONE *et al*, 2006; OGRZEWALSKA *et al*, 2016).

Esse vetor é altamente competente na transmissão transovariana e perpetuação transestadial do agente (Labruna *et al*, 2011) e o estágio adulto, é o único que parasita o homem (PINTER *et al*, 2008).

O carrapato da espécie *A. aureolatum* é um artrópode de ocorrência autóctone em áreas de Floresta ombrófila densa, pertencente ao bioma Mata Atlântica. No Estado de São Paulo, essas áreas, que possuem por características marcantes a elevada umidade relativa do ar e temperaturas médias amenas correspondem as regiões de topo da Serra do Mar, Serra da Mantiqueira e maciço de Paranapiacaba além de relatos de ocorrência na Serra do Japi, Serra do Tapeti, Serra da Bocaína, Serra da Cantareira e regiões limítrofes. Por ser altamente dependente das características ambientais acima citadas, a ocorrência dessa espécie está associada aos remanescentes de floresta da região (PINTER *et al*, 2004).

O processo de fragmentação da mata, decorrente das alterações antrópicas no bioma Mata Atlântica, tem influência na ocorrência de casos nessa região. A fragmentação leva a redução da riqueza e abundância de espécies que atuam como hospedeiros silvestres do vetor, favorecendo espécies antrópicas como o cão doméstico. A intensificação do contato entre esse hospedeiro e a matriz urbana, elevam o risco de parasitismo humano por carrapatos e conseqüentemente o risco de ocorrência de casos de FMB. Hoje sabe-se que o cão doméstico exerce papel fundamental na epidemiologia da FMB na RMSP. Além de carreadores de carrapatos de áreas de mata para o ambiente antrópico são considerados animais sentinelas para a detectar a circulação do agente etiológico (OGRZEWALSKA *et al*, 2012; SCINACHI *et al*, 2017).

Em estudo conduzido por Binder e colaboradores (2021) foi demonstrado que o cão doméstico tem papel de amplificador da bactéria *R. rickettsii* para o carrapato *A. aureolatum*. Diferentemente do que acontece com a espécie *Rhipicephalus sanguineus* (PIRANDA *et al*, 2008), a fêmea de *A. aureolatum*, após se alimentar em um cão riquetsêmico pode se infectar e transmitir o agente etiológico transovariamente em quantidade suficiente para manter novas populações infectadas na natureza. Este estudo refuta o postulado de Cooksey e colaboradores (1990), em que se afirma que somente hospedeiros vertebrados de estágios imaturos do carrapato poderiam manter o ciclo natural de *R. rickettsii* no ambiente, visto que a transmissão transovariana não aconteceria em uma infecção do carrapato fêmea em sua fase adulta. O estudo de Binder e colaboradores (2021) demonstrou que o carrapato *A. aureolatum* é um exceção ao postulado por Cooksey e que o papel do cão doméstico é ainda mais importante para a epidemiologia da FMB. Sendo assim, torna-se necessário compreender se esses animais podem exercer a função de amplificadores mais de uma vez em seu período de vida ou se a primeira infecção é capaz de conferir proteção imunológica que impeça que o mesmo indivíduo desempenhe novamente o papel de amplificador.

A bactéria *R. rickettsii* estimula uma reação imunológica no hospedeiro vertebrado que leva a uma resposta imune protetiva contra novas infecções, como demonstrado em capivaras em estudo de Hernandez e colaboradores (2020). Determinar se o mesmo ocorre com cães domésticos é fundamental para compreender os mecanismos da doença em áreas endêmicas da RMSP.

Além disso, estudos com foco na ecoepidemiologia da FMB e nos fatores ambientais que envolvem sua ocorrência podem auxiliar a vigilância epidemiológica na melhor compreensão dos processos da doença, auxiliando no planejamento de ações e programas direcionados aos fatores de maior risco e que necessitam de maior atenção do poder público, garantindo assim, uma maior proteção à saúde humana com a prevenção e controle desse agravo.

2. OBJETIVO GERAL E ESPECÍFICO

O objetivo geral do presente estudo foi analisar os aspectos da ecologia e epidemiologia da FMB que ocorre na RMSP ampliando o conhecimento sobre a doença nessa região. A análise abordou aspectos dos hospedeiros amplificadores do agente etiológico, assim como os fatores ecológicos que podem influenciar a ocorrência do vetor e da doença. Os objetivos específicos seguem a divisão em três capítulos para sua melhor compreensão:

CAPÍTULO 1 – Analisar o papel do cão doméstico como hospedeiro amplificador do agente etiológico da FMB, para carrapatos da espécie *A. aureolatum*, na RMSP, durante um segundo contato com o agente etiológico.

CAPÍTULO 2- Determinar por meio de modelagem ecológica, utilizando algoritmo do software Maxent, áreas de potencial ocorrência do vetor *A. aureolatum*, com base nos dados de ocorrência da espécie no Estado de São Paulo e em dados ambientais tais como temperatura, umidade e altitude.

CAPÍTULO 3 - Realizar análise preditiva de risco de ocorrência de FMB com base em métricas de paisagem de importância para a ecoepidemiologia da doença. Variáveis como área de floresta, perímetro de borda e conectividade são aspectos importantes da paisagem que modulam a ocorrência da doença.

REFERÊNCIAS

ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F. C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S. B.; SILVA, L. J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from an Endemic Area in Southeastern Brazil, clinical aspects. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1078, 252-254, 2006.

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

BARBIERI, A. R. M.; MORAES-FILHO, J. NIERI-BASTOS, F. A.; SOUZA, J. C.; SZABÓ, M. P.J.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Rickettsia sp strain Atlantic rainforest in a spotted fever- endemic area of southern Brazil. **Tick and tick-borne diseases**, v.5, 848-853, 2014.

BINDER, L.C; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; SERPA, M. C. A.; MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; SCINACHI, C. A.; LABRUNA, M. B. Domestic dogs as amplifying hostes of *Rickettsia rickettsii* for *Amblyomma aureolatum* ticks. **Tick and Tick-borne Diseases**, v.12, 2021.

BLANTON, L. S. The rickettsioses: a practical update. **Infect Dis Clin N Am**, 213-229, 2019.

BURGDORFER, W. Tick-borne diseases in the United States :Rocky Mountain spotted fever and Colorado tick fever : a review. **Acta Tropica**, v.34, 103-126, 1977.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias em Mexico (tifo murinho, tifo clássico y fiebre manchada). **Rev Inst Salub Enf Trop** , v. 8, 3-14, 1947.

COOKSEY, L. M; HAILE, D. G.; MOUNT, G. A. Computer Simulation of Rocky Mountain Spotted Fever Transmission by the American dog tick (Acari:Ixodidae). **J. Med. Entomol**, v. 27, 671-680, 1990.

DIOP, A.; RAOULT, D.; FOURNIER, P. E. Paradoxical evolution of rickettsial genomes. **Tick and tick-borne diseases**, v.10, 462-469, 2019.

FONSECA, F. Notas de acareologia XI: Validade da espécie e cyclo evolutivo de *Amblyomma striatum* Kock, 1844 (*Acarina, Ixodidadae*). **Memorias do Instituto Butantan**, v.9, 1935.

FUENTES, L. G. First case of Rocky Mountain Spotted Fever in Costa Rica, Central America. **Rev Latinoam Microbiol**, v. 21, 167-172, 1979.

GOMES, L. S. Thyfo exanthematico de São Paulo. **Brasil Médico**, v. 17, n. 52, 919-921, 1933.

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

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZALES-ACUÑA, D.; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp Appl Acarol**, v.40, 83-100, 2006.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; UCHOA, F.; SERPA, M. C. A.; BINDER, L. C.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B. Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as amplifying hosts of *Rickettsia rickettsii* to *Amblyomma sculptum* ticks: Evaluation during primary and subsequent exposures to *R. rickettsii* infection. **Tick and Tick-borne Diseases**, v.11, 2020.

HIDALGO, M.; FACCINI-MARTINEZ, A. A.; VALBUENA, G. Rickettsiosis transmitidas por garrapatas em las Américas: avances clínicos y epidemiológicos, y retos en el diagnóstico. **Biomédica** v. 33 (supl. 1), 161-78, 2013.

KRAWCZAK, F. S.; MUÑOZ-LEAL, S.; GUZTZAKEY, A. C.; OLIVEIRA, S. V.; SANTOS, F. C. P.; ANGERAMI, R. N.; MORAES-FILHO, J.; SOUZA, J. C.; LABRUNA, M. B. Case Report: *Rickettsia sp* Strain Atlantic Rainforest Infection in a Patient from a Spotted Fever-Endemic Area in Southern Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v.95, n.3, 551-553, 2016.

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. A. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v.7, n.2, 2007

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, 1166, 156-166, 2009.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLTZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUSA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. *Rickettsioses* in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v.16, n.2, mai-ago, 2011.

MCDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural History of *Rickettsia rickettsii*. **Ann. Rev. Microbiol**, v.40, 287-309, 1986.

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**, 1283-1300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; SCHWARCZ, K.; BAJAY, M. M.; BAJAY, S. K.; PINHEIRO, J. P.; ZUCCHI, M. I.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Characterization of genetic variability

and population structure of the tick *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.53, n.4, 843-850, 2016.

OLIVEIRA, S. V.; GUIMARÃES, J. N.; RECKZIEGEL, G. C.; NEVES, B. M. C.; ARAÚJO-VILGES, K. M.; FONSECA, L. X.; PINNA, F. V.; PEREIRA, S. V. C.; CALDAS, E. P.; GAZETA, G. S.; GURGEL-GONSALVES, R. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **J Ven Anim Tox includ Trop Dis**, v.22, 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, 710-716, 2012.

PADDOCK, C. D.; FERNÁNDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMMER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKI, S. R. et al. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **Am J Trop Med Hyg**, v.78, 687-692, 2008.

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, outubro, 2013.

PATINO, L.; AFANADOR, A.; PAUL, J. H.; A Spotted Fever in Tobia, Colombia. **Am J Trop Med Hyg**, v. 17, 639-653, 1937.

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, maio, 2004.

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. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, 247-252, 2008.

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, L. S. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o tifo exantemático de São Paulo. São Paulo: **Sociedade Imprensa Paulista**, 11-119, 1932.

RICKETTS, H. T. Some Aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as Shown by Recent Investigations. **Medical Record**, v.76, 843-855, 1909.

RODANICHE, E. C.; Natural infection of the tick *Amblyomma cajennense* with *Rickettsia rickettsia* in Panama. **Am J Trop Med Hyg**, v.2, 696-699, 1953.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof Alexandre Vranjac". **Dados estatísticos- Febre Maculosa**. Disponível em < <http://www.cve.saude.sp.gov.br/>> Acesso em: agosto, 2021.

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 Sao Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**. v.166, p.225-233, 2017.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A. G.; FAVACHO, A. R. M.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R. S.; KO, A. I. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. *Emerging infectious diseases*, v.17, n. 2, 275-278, 2011.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. v.16, n.3, março, 2010.

TRAVASSOS, J.; DIAS, E. Identidade imunológica do vírus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1939.

VALBUENA, G. Patogénesis de las infecciones producidas por rickettsias em las Americas. **Rev. MVZ**, Córdoba, v.15, n. 1: 2004-2006, 2010.

VIEIRA, F. B; MESQUITA, M. Alguns aspectos epidemiológicos do “Tifo Exantemático de São Paulo”. Trabalho apresentado á sessão de Biologia do Congresso Medico promovido pela Associação Paulista de Medicina. **Revista de Higiene e Saúde Pública**, 1933.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Para facilitar a compreensão dos dados, este item está dividido em três partes, seguindo os capítulos presentes em Resultados e Discussão.

3.1 CAPÍTULO 1

A infestação das cobaias e dos cães, bem como a manutenção da colônia de carrapatos foram conduzidas no Infectório Experimental da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) de Mogi Guaçu –SP. O estudo obteve aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Superintendência de controle de Endemias CEUA-SUCEN Nº 0003 (ANEXO A).

As análises moleculares foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da SUCEN de São Paulo - SP.

As análises sorológicas foram realizadas no Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP.

3.1.1 Cães

Para a execução do experimento foram utilizados dois cães da raça Beagle (C1 e C2) previamente desafiados pela bactéria *R. rickettsii*, através de infecção via carrapatos *A. aureolatum* adultos infectados durante a fase imatura, sendo a primeira infecção dos animais confirmada por teste sorológico de imunofluorescência indireta e sinais clínicos característicos de infecção (BINDER *et al*, 2021). Os títulos sorológicos dos cães, no dia zero do início do experimento foram respectivamente 8192 – Cão 1 e 4096 – Cão 2. O início do experimento ocorreu após doze meses da primeira exposição do Cão 1 e dezessete meses da primeira exposição do Cão 2. Os cães sorologicamente positivos e previamente desafiados pelo agente foram novamente expostos a bactéria, através do contato com os carrapatos *A. aureolatum* adultos infectados para determinar a resposta sorológica frente a uma nova infecção e a competência como amplificador e fonte de infecção para carrapatos fêmeas susceptíveis. Antes do início do estudo, os cães foram avaliados clinicamente e apresentaram bom estado de saúde sem alterações fisiológicas. Durante todo o

processo os animais foram mantidos em ambiente limpo, com oferta de água *ad libitum* e ração comercial uma vez ao dia.

3.1.2 Colônia de Carrapatos

Os carrapatos utilizados no estudo foram obtidos a partir de três espécimes de fêmeas da espécie *A. aureolatum* coletadas de cão proveniente do município de Atibaia- SP. As fêmeas ingurgitadas foram mantidas em incubadora B.O.D a 23° C e umidade relativa do ar acima de 95%, condições consideradas ideais para essa espécie conforme descrito por Pinter e colaboradores (2004).

Um *pool* de ovos resultante das posturas de cada fêmea foi submetido à extração de DNA e em seguida a Reação em cadeia da polimerase (PCR) . O resultado foi negativo para infecção por bactérias do gênero *Rickettsia*. Assim, larvas provenientes das três posturas foram agrupadas e alimentadas em cobaia saudável. As ninfas foram separadas em dois grupos, sendo um grupo alimentado em cobaias infectada pela bactéria e outro grupo alimentado em cobaia saudável, formando um grupo de carrapatos infectados e outro de não infectados. Os carrapatos adultos provenientes dos dois grupos foram utilizados na infestação dos cães.

3.1.3. Bactéria *Rickettsia rickettsii*

Foram utilizadas bactérias da espécie *R. rickettsii* cepa Taiacu, isolada de carrapatos da espécie *A. aureolatum*, em estudo realizado em Mogi das Cruzes, São Paulo (PINTER;LABRUNA, 2006).

3.1.4 Infecção de carrapatos com *R. rickettsii*

Cobaias foram utilizadas na alimentação dos estágio imaturos dos carrapatos uma vez que esse modelo animal é comprovadamente eficiente na alimentação de carrapatos dessa espécie (LABRUNA *et al*, 2011)

Somente uma cobaia foi utilizada para a alimentação das larvas de carrapatos (cobaia não infectada). Após a ecdise das larvas, duas cobaias foram utilizadas para a alimentação das ninfas (grupo infectado e não infectado). Ambas tiveram a temperatura retal aferida uma vez ao dia durante o período de infestação.

Para a obtenção do grupo de carrapatos infectados uma cobaia foi inoculada por via intraperitoneal com 1 ml de homogenizado de órgãos de cobaia infectada por *R. rickettsii* um dia antes do início da infestação por carrapatos (Dia 0) (Labruna *et al*, 2008).

Para ambos os processos de alimentação (larvas e ninfas), as cobaias foram alocadas em gaiolas de grade metálica com água á vontade e ração comercial fornecida duas vezes ao dia. As gaiolas foram colocadas dentro de caixas plásticas de laterais atingindo a metade da altura das gaiolas e fita adesiva dupla face (28mm) foi colada na borda das caixas para evitar que os carrapatos fossem perdidos.

Após a liberação dos carrapatos as caixas eram checadas duas vezes ao dia (período da manhã e período da tarde) para coleta das larvas ou das ninfas que se desprendiam após o ingurgitamento. As gaiolas eram limpas após cada checagem .

Os carrapatos coletados em cada estágio foram colocados em frascos plásticos (um frasco por cobaia, para cada dia de coleta) e os frascos mantidos em dessecadores de vidro em incubadora B.O.D nas mesmas condições descritas anteriormente .

3.1.5 Infecção experimental dos cães

Após a obtenção dos carrapatos adultos, cada um dos dois cães recebeu uma câmara de infestação que foi fixada ao seu dorso e em cada uma foram liberados cinco machos infectados e oito fêmeas não infectadas. Um colar Elizabetano foi colocado em cada animal para evitar a remoção da câmara com os carrapatos. Os animais passaram por acompanhamento clínico com aferição de temperatura diariamente pelo período de dezoito dias, além de coleta de sangue venoso com intervalo de alguns dias. O sangue foi centrifugado por 5 min a 3.000 rpm levando ao processo de separação coágulo sanguíneo e soro. O primeiro foi utilizado na Reação de Cadeia da Polimerase, enquanto o segundo foi utilizado na realização de sorologia por meio da técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) a fim de determinar a evolução no título de anticorpos.

As câmaras era checadas diariamente para coleta dos carrapatos. As fêmeas foram mantidas em incubadora BOD a 23 °C e 95% de umidade a fim de completarem o ciclo de oviposição. Os machos foram acondicionados em microtubos plásticos e mantidos em freezer a -20 °C para posterior análise molecular.

Uma parte das larvas provenientes das posturas das fêmeas (20µg) foram acondicionadas nas mesmas condições dos machos e a alíquota restante de larvas foi alimentada em cobaias não infectadas. O sangue dessas cobaias foi coletado, centrifugado e armazenado em freezer a -20° C para posterior análise sorológica. Esse procedimento tinha o objetivo de determinar a possível transmissão vertical do agente ao final do experimento.

3.1.6 Extração de DNA

Amostras de carrapatos (machos adultos e larvas) e coágulos sanguíneos dos cães foram individualmente processadas para extração de DNA genômico.

A extração foi realizada utilizando-se o kit comercial DNeasy® Blood and Tissue Kit da Qiagen (Maryland, EUA) seguindo o protocolo para isolamento de DNA insetos, sangue e tecido, segundo as recomendações do fabricante.

Os carrapatos adultos foram individualmente processados em microtubos plásticos de 1,5ml enquanto as larvas foram processadas em *pools* de 20 µg. Em cada microtubo foram adicionadas microesferas (*beads*) de aço com a função de maceração de amostras e lise mecânica de tecidos mais resistentes. Os tubos foram colocados em equipamento de agitação de alta intensidade (FastPrep™ 96) a 1400 rpm por 2min no caso dos carrapatos adultos e 30s para as larvas. O líquido sem resquícios de material sólido foi transferido para novos microtubos plásticos dando continuidade ao processo de extração.

3.1.7 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

Para a realização da PCR foram utilizados três primers. Os primeiros primers CS-5 e CS-6 amplificam um fragmento de 147 pares de base do gene citrato sintase (*glfA*) que esta presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia*. Uma vez reagentes, as amostras foram submetidas à PCR utilizando-se os primers que amplificam um fragmento de 532 pares de bases do gene *ompA*, presente na membrana externa das espécies de riquetsias do grupo da febre maculosa e um fragmento de 562 pares de base do gene codificador da proteína 17kDA (*htrA*) também presente em espécies do grupo da febre maculosa (Quadro 1). Para cada

reação também foram utilizados controles positivos (DNA de *R. rickettsii*) e negativos (água ao invés da amostra) para a validar a amplificação do material.

O volume total dos reagentes para cada amostra, incluindo os controles foi de 25 µl sendo:

Água Nuclease free (8,5 µl)

Green Taq® (12,5 µl)

Primer forward a 10mM (1,0 µl)

Primer reverse a 10mM (1,0 µl) e

DNA ou água no caso do controle negativo (2 µl)

Tabela 1: Genes utilizados na análise molecular para detecção de *R. rickettsii*.

Gene	Primers	Especificidade	Sequência dos primers (5' – 3')	Referência
<i>gltA</i>	CS-5	Gênero <i>Rickettsia</i>	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTCGAT	Labruna et al 2004
	CS-6		AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	
<i>ompA</i>	Rr190.70p	Grupo da Febre Maculosa	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	Regnery et al, 1991
	Rr190.602n		AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	
<i>htrA</i>	17k-5	<i>Rickettsia spp</i>	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	Labruna et al, 2004b
	17k-3		TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC	

Após a realização da PCR, os produtos foram armazenados em microtubos plásticos e acondicionados a -4° C até sua utilização no processo de eletroforese em gel de agarose.

3.1.8 Eletroforese

Para realização da eletroforese, foi utilizada agarose a 2% em pó (0,6g) diluído em 30 ml de TBE 0,5X (Tris-Borato-EDTA) e 5 µl de GelRed. Para cada amostra,

incluindo os controles, utilizou-se o volume de 5 µl. O marcador de massa molecular utilizado foi Ladder Ludwig 100pb DNA, 2 µl de GelRed e 2 µl de GelBlue. A leitura do gel foi realizada em luz ultravioleta em fotodocumentador BIORAD. Os carrapatos que se mostraram reagentes para o gene *ompA* tiveram o fragmento amplificado submetido à reação de sequenciamento genético.

3.1.9 Sequenciamento genético

Anteriormente ao processo de sequenciamento os produtos da PCR foram purificados com a utilização de 10µl de produto e 4µl de ExoSAP® (Affymetrix, Santa Clara, Califórnia, EUA) que tem a função de degradar o excesso de primers e nucleotídeos provenientes da PCR utilizando as enzimas Exonuclease e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP).

Para o sequenciamento foi utilizado o kit Big Dye Terminator 3,1v Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). Os reagentes e seus respectivos volumes para cada amostra estão descritos a seguir:

Sequencing Buffer 5X (1,0 µl)

Água up (4,5 µl)

Primer 10 µM (0,5 µl)

BigDye (2,0 µl)

Produto de PCR (2,0 µl)

O DNA foi precipitado e sequenciado pelo método Sanger. As sequências obtidas foram editadas no programa ChormasPro e o resultado foi submetido a análise do programa BLASTn (U.S National Library of Medicine) para determinar similaridades com espécies de riquétsias depositadas no GenBank.

3.1.10 Sorologia (RIFI)

O ensaio sorológico foi realizado na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, em laboratório de alto nível de segurança, utilizando-se lâminas com antígenos de *R. rickettsii* cultivados em células Vero como descrito em por Labruna e colaboradores (2007).

Os soros dos dois cães e das cobaias foram descongelados e testados para determinação individual do título de anticorpos anti-*Rickettsia*, conforme protocolo adaptado e recomendado pelo National Center for Infectious Diseases /EUA.

Células infectadas por *R. rickettsii* foram cultivadas em laboratório em garrafas de cultivo com células Vero, e meio MEM (Minimum Essencial Medium) enriquecido com Soro Fetal Bovino (SFB) a 5%. Após cerca de 3 dias encubadas em estufa, a temperatura de 28°C, as células foram fixadas em lâminas de vidro e coradas (GIMENEZ, 1964) para visualização das riquetsias no interior das células. O meio líquido das garrafas foi centrifugado (3000 rpm por 5 minutos), sendo o sedimento resultante desse processo suspenso em salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS) contendo 0,2% de azida sódica. Dez microlitros dessa suspensão foram aplicadas a cada orifício das lâminas para antígenos, os quais foram secos ao ar em fluxo laminar, fixados em acetona por 10 minutos e estocadas a -20° C até o momento do uso.

Os soros foram analisados inicialmente numa diluição de 1/64 com PBS pH 7,4. Quando apresentado resultado positivo para a diluição de 1/64 os soros foram novamente analisados para determinação do título máximo de anticorpos. Quinze microlitros de soro diluído foram adicionados a cada orifício da lâmina com o antígeno específico (*R. rickettsii*) que foi incubada por 30 minutos à 37° C em câmara úmida. As lâminas foram então submergidas para lavagem em PBS pH 7,4 por 15 minutos. O passo seguinte foi a aplicação do conjugado anti-anticorpo IgG de cão ou de cobaia, que foi deixado para incubação em estufa a 37° C por mais 30 minutos, quando as lâminas foram lavadas sendo submergidas em PBS pH 7,4 + Azul de Evans por mais 15 minutos. Após secagem a temperatura ambiente as lâminas foram montadas com duas gotas de glicerina tamponada e cobertas por lamínula, para serem lidas em microscópio de fluorescência sob luz ultravioleta com objetiva para aumento de 40 vezes. Nesta reação, títulos iguais ou superiores a 1/64 foram considerados positivos.

3.2 CAPÍTULO 2

3.2.1 Dados de ocorrência

Os dados georreferenciados sobre a presença de carrapatos da espécie *A. aureolatum* no Estado de São Paulo foram obtidos através da base de dados do GBIF – Sistema Global de Informação sobre Biodiversidade, da Coleção Nacional de

Carrapatos “Danilo Gonçalves Saraiva” (FMVZ-USP) e do SpeciesLink que contém informações de coleções entomológicas da Fiocruz, Sinbiota-Fapesp e Instituto Butantan. Além disso, realizou-se levantamento bibliográfico da ocorrência do vetor por meio de artigos científicos.

Os dados iniciais passaram por um processo de avaliação crítica com a exclusão de dados obsoletos, devido as mudanças ambientais no tempo e espaço, e de dados suspeitos que não apresentavam confirmação científica da identificação do táxon, classificados como baixo valor preditivo positivo. Anteriormente ao estudo de Aragão e Fonseca (1961) as espécies *A. aureolatum* e *A. ovale* eram consideradas sinonímias e havia dificuldade na identificação e separação entre ambas. Dessa forma, baseados nos conhecimentos atuais sobre a distribuição da espécie, os pontos de ocorrência que não correspondiam as áreas sabidamente ocupadas pela espécie foram removidos. Além disso, alguns pontos passaram por edição para reposicionamento de coordenadas. Isso porque algumas coordenadas foram depositadas com base nos centróides dos municípios, dado que normalmente não corresponde às paisagens ocupadas pela espécie. Para que os dados ficassem o mais próximo possível da realidade os pontos foram posicionados na área de mata mais próxima em até 1 km do centróide, uma vez que essa espécie está, necessariamente, associada a Mata Atlântica. Esse processo foi realizado utilizando o plugin QuickMapServices do Quantum GIS (Q-GIS) versão 3.16.9. Devido à importância epidemiológica da espécie e pelo fato de ser a única área onde comprovadamente existem casos humanos associados a esse vetor, os dados de ocorrência computados se restringiram a área do ESP.

3.2.2.Dados ambientais

Os dados ambientais foram obtidos por meio da base do Worldclim versão 2.1 (FICK; HIJMANS, 2017) de onde foram selecionados para a análise as dezenove variáveis bioclimáticas e de elevação (Tabela 1) na resolução de 30 segundos (1km x 1km), que apresentam melhor qualidade. Os dados de elevação derivam dos dados do SRTM – Shuttle Radar Topography Mission. As variáveis bioclimáticas derivam de dados mensais de temperatura e precipitação a fim de gerar novas variáveis biologicamente mais significativas e apresentam tendências anuais, sazonalidade e fatores ambientais extremos ou limitantes.

Tabela 1: Variáveis bioclimáticas e de elevação obtidas da base de dados do Worldclim.

Sigla	Variável ambiental
BIO1	Temperatura Média Anual
BIO2	Variação diária média (média mensal (max temp - min temp))
BIO3	Isotermalidade (BIO2/BIO7) ($\times 100$)
BIO4	Sazonalidade da temperatura (desvio padrão $\times 100$)
BIO5	Temperatura máxima no mês mais quente
BIO6	Temperatura mínima no mês mais frio
BIO7	Variação anual da temperatura (BIO5-BIO6)
BIO8	Temperatura média no trimestre mais úmido
BIO9	Temperatura média no trimestre mais seco
BIO10	Temperatura média no trimestre mais quente
BIO11	Temperatura média no trimestre mais frio
BIO12	Precipitação anual
BIO13	Precipitação do mês mais úmido
BIO14	Precipitação do mês mais seco
BIO15	Sazonalidade da precipitação (coeficiente de variação)
BIO16	Precipitação do trimestre mais úmido
BIO17	Precipitação do trimestre mais seco
BIO18	Precipitação do trimestre mais quente
BIO19	Precipitação do trimestre mais frio
ALT	Elevação

Após o download dos dados do Worldclim foi necessário criar novos arquivos no formato raster, para cada variável ambiental, utilizando como base a área de interesse do estudo (área de Mata Atlântica no Estado de São Paulo -IBGE) e que podem ser ocupadas pelo vetor. O mapa do IBGE engloba as formações florestais e ecossistemas estabelecidos pela Lei da Mata Atlântica (Lei nº 11.428 de 2006, segundo decreto nº 6.660 de 21 de novembro de 2008). Os arquivos foram convertidos para *.ASC//* para que pudessem ser lidos pelo programa Maxent.

As variáveis ambientais foram então analisadas pelo método de VIF (Fator de inflação de Variância) para detecção de variáveis com maior colinearidade. A análise foi realizada no software Rstudio versão 4.1.1. Dentre as variáveis com maior correlação foram selecionadas aquelas com maior relevância para ecologia do vetor, baseado no conhecimento adquirido sobre a espécie. Os dados foram selecionados de acordo com o conhecimento prévio sobre as condições que influenciam a biologia da espécie vetora, especialmente temperatura, umidade e altitude (PINTER *et al*, 2004; BARBIERI *et al*, 2015).

A colinearidade é comum e esperada em análises ecológicas com diversas variáveis preditoras, porém variáveis que apresentam uma grande parcela da mesma informação não devem ser utilizadas em conjunto na mesma análise (DORMAN *et al* 2013).

3.2.3 Modelo de distribuição de espécies

Para determinar os fatores ambientais de maior influência na distribuição do vetor optou-se pela utilização do programa Maxent- Modelo de Entropia Máxima para Distribuição de Espécies, versão 3.4.1 (PHILIPS; ANDERSON; SCHAPIRE 2006).

Através do Maxent é possível estimar a probabilidade de distribuição para uma espécie alvo encontrando a distribuição com entropia máxima (a mais próxima do uniforme), sujeita a restrições impostas pelas informações disponíveis em relação a distribuição observada da espécie e das condições ambientais sobre a área de estudo. A distribuição estimada deve estar de acordo com o que se conhece sobre as condições ambientais onde a espécie tem sido observada. (ELITH *et al*, 2006; PHILLIPS; ANDERSON. SCHAPIRE 2006; PEARSON, 2007).

Esse modelo oferece uma série de vantagens que fazem com que seu uso seja cada vez mais frequente: necessita apenas de dados de presença em conjunto com dados ambientais; utiliza variáveis categóricas e contínuas e tem uma definição matemática concisa facilmente interpretável (PHILLIPS;ANDERSON;SCHAPIRE, 2006).

Os parâmetros para análise foram definidos no formato padrão (default) com 10 repetições bootstrap. Dados duplicados foram removidos da análise para permitir um melhor ajuste dos dados e reduzir o viés amostral. A área de estudo utilizada como

base foi o mapa de extensão do bioma Mata Atlântica no Estado de São Paulo uma vez que essa é a área que pode ser ocupada pelo vetor.

A avaliação do modelo foi feita através da análise estatística da característica de operação do receptor “Receiver Operating Characteristic” (ROC) através da área sob a curva “Area Under the Curve” (AUC) que fornece valores de curva que variam entre 0-1. Os valores mais próximos de 1.0 indicam que o modelo é um bom preditor da distribuição da espécie em comparação com uma seleção aleatória enquanto valores próximos de 0.5 indicam modelos não melhores que uma seleção ao acaso (ALLOUCHE; TSOAR; KADMON, 2006; ELITH *et al*, 2006).

3.3 CAPÍTULO 3

3.3.1 Área de estudo

As análises conduzidas foram realizadas em áreas do Estado de São Paulo, sob influência do bioma Mata Atlântica, onde os casos de FMB relacionados ao vetor *A. aureolatum* são descritos (Figura 1). Segundo a Fundação SOS Mata Atlântica, o Estado possui cerca de 22,9% (3,9 milhões de hectares) de sua mata original que sofreu grandes impactos da degradação florestal e consequente fragmentação ao longo do tempo. Apesar de nos últimos anos ter se observado uma redução das taxas de desmatamento, os impactos desse processo na interação entre as espécies e o ambiente são preocupantes. (TABARELLI *et al*, 2010).

Os dados espaciais de ocupação do bioma Mata Atlântica no Estado de São Paulo tem como referência o mapa do IBGE da área de aplicação da Lei da Mata Atlântica (Lei nº 11.428 de 2006, segundo decreto nº 6.660 de 21 de novembro de 2008) que delimita as formações florestais e ecossistemas associados ao bioma incluindo: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; Floresta Estacional Decidual; campos de altitude; áreas das formações pioneiras, conhecidas como manguezais, restingas, campos salinos e áreas aluviais; refúgios vegetacionais; áreas de tensão ecológica; brejos interioranos e encaves florestais, representados por disjunções de Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Aberta, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual; áreas de estepe, savana e savana-estépica; e

vegetação nativa das ilhas costeiras e oceânicas (FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2021).

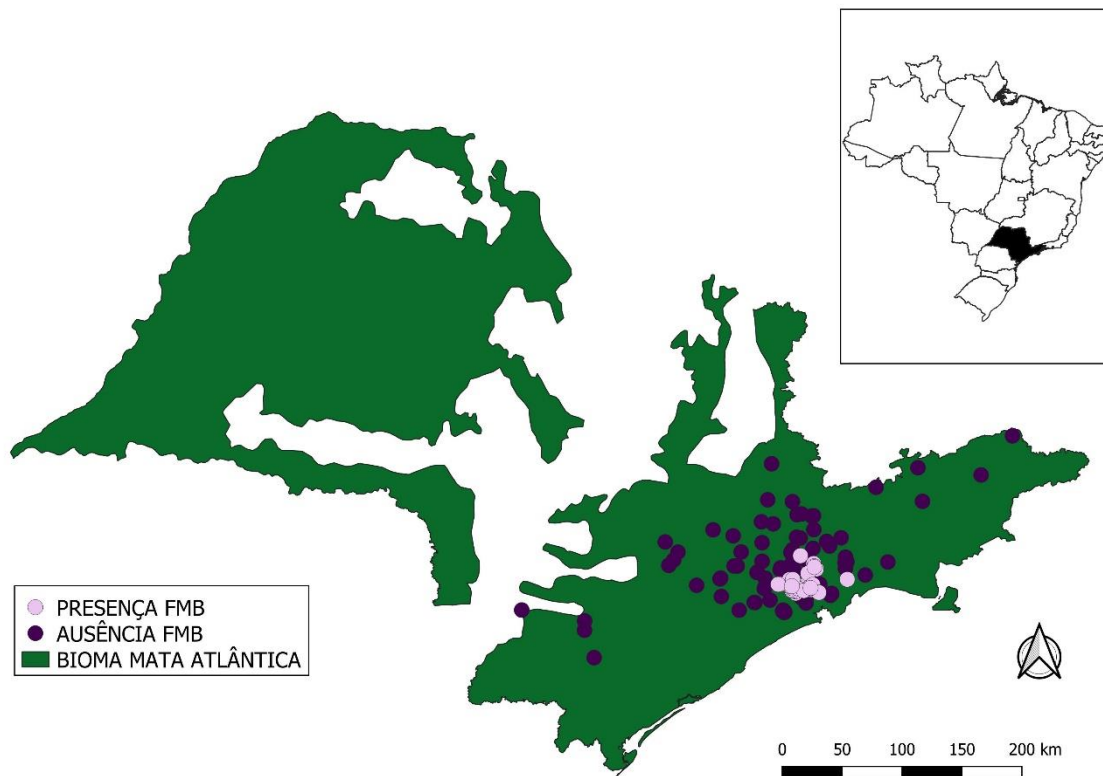


Figura 1: Ocorrência de *A. aureolatum* no bioma Mata Atlântica no Estado de São Paulo dividida entre presença ou ausência de casos de FMB.

3.3.2 Febre Maculosa Brasileira e variáveis exploratórias

Para a realização das análises de paisagem foram utilizados os dados de ocorrência do vetor *A. aureolatum* divididos entre locais com e sem ocorrência de casos de Febre Maculosa Brasileira relacionados a esse vetor (Figura 1).

Essa abordagem foi escolhida com o objetivo de determinar possíveis diferenças entre métricas de paisagem na áreas estudadas uma vez que o vetor tem uma distribuição mais abrangente do que as áreas de ocorrência da doença. Scinachi e colaboradores (2017) ao estudar nove áreas com diferentes perfis de fragmentação na Região Metropolitana de São Paulo verificaram uma associação positiva entre o aumento da fragmentação da floresta e a sorologia positiva de cães. Neste estudo procurou-se estender a análise para toda a área ocupada pelo vetor utilizando como comparativo os dados de prevalência da doença.

Os dados de ocorrência de FMB somaram um total de 77 pontos enquanto os dados de ausência somaram um total de 86 pontos.

O cálculo das métricas foi realizado utilizando o plugin LECOS-Landscape Ecology Statistics no software Quantum GIS versão 3.16.9. O plugin se baseia em métricas extraídas do software FRAGSTATS (Spatial Pattern Analysis Program for Categorical Maps- MCGARIGAL; CUSHMAN; ENE, 2012) e inclui funções para cálculo de métricas de paisagem.

Inicialmente um buffer de 2km foi gerado partir de cada ponto com base no estudo de Scinachi e colaboradores (2017) e que leva em consideração o quanto cães adentram as áreas de mata a partir da borda. Outro buffer de 10 km foi calculado para cálculo de métricas de conectividade. As métricas foram então calculadas com base nos dados de cobertura florestal do bioma Mata Atlântica, proveniente da coleção 4.1 do projeto Mapbiomas (2018) adaptado para o Estado de São Paulo (Figura 2).

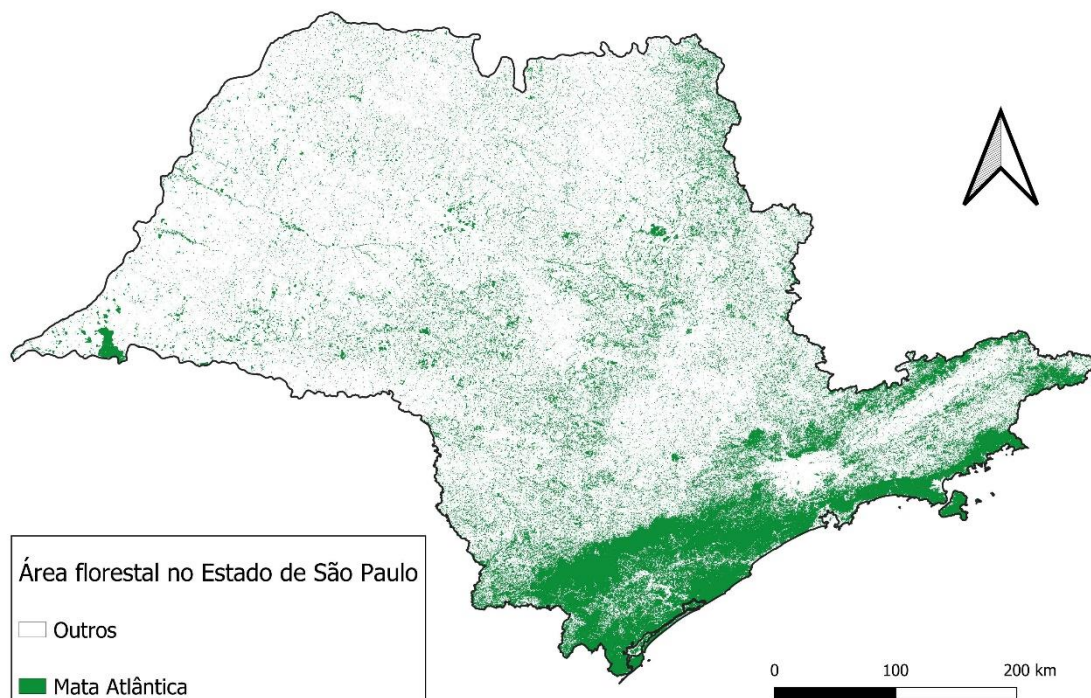


Figura 2: Áreas de floresta extraídas da coleção Mapbiomas versão 4.1.

Tabela 1: Métricas de ecologia da paisagem.

SIGLA	MÉTRICA
-------	---------

CV	Cobertura Florestal
PB	Perímetro de borda
DB	Densidade de borda
NF	Número de fragmentos
DE	Distância euclidiana do vizinho mais próximo
CV10	Cobertura vegetal 10km

3.3.3 Análise estatística

Para a análise estatística foi utilizado o modelo de regressão linear misto utilizando o software R. versão 4.1.1. Inicialmente foi realizada uma análise de colinearidade entre as variáveis preditoras. Os dados com correlação superior a 0,7 não foram utilizados em conjunto no mesmo modelo. Uma série de modelos “full” foi feita combinando as variáveis não correlacionadas. A partir disso, uma função foi utilizada para gerar diversos modelos com diferentes combinações de variáveis. Os melhores modelos foram selecionados a partir do critério de avaliação de Akaike corrigido para pequenas amostras (AICc). Quanto menor o valor de AIC, maior a qualidade do modelo. As variáveis foram consideradas significativas quando o intervalo de confiança (95%IC) não cruzava o zero.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CHAPTER 1: Experimental infection of dogs previously challenged by *Rickettsia rickettsii* and transmission to *Amblyomma aureolatum* ticks

ABSTRACT

In São Paulo Metropolitan Region, the etiological agent of Brazilian Spotted Fever (BSF) is transmitted by ticks of the species *Amblyomma aureolatum*. Domestic dogs are the primary hosts of the adult tick stage in urban matrix areas close to fragmented forests, carrying infected ticks from the forest to the anthropic environment. They are considered sentinels for detecting the agent's circulation through serological tests, also being susceptible to infection. In addition, dogs can amplify the infectious agent, increasing the number of infected ticks in the environment. This study aimed to test the hypothesis that domestic dogs could act as amplifying hosts of *R. rickettsii* for *A. aureolatum* ticks after a second contact with the agent. The results showed that the dogs could not generate new infected tick strains despite the immune response with increased antibody titers. Host-related measures should be one of the surveillance focuses in areas where BSF cases occur. Disseminating information regarding responsible ownership could help reduce dog contact with possible infested areas by limiting their access to the street. Furthermore, population control programs are important to reduce the number of susceptible animals in the population.

KEYWORDS: Brazilian Spotted Fever, *Rickettsia rickettsii*, *Amblyomma aureolatum*, dogs, amplifying hosts.

INTRODUCTION

Brazilian Spotted Fever (BSF) is an infectious, febrile, and acute disease that is noteworthy for its high lethality in some regions of Brazil, despite its low incidence of cases. Its etiological agent is the bacterium *Rickettsia rickettsii*, which is considered the most pathogenic among *Rickettsia* and is transmitted to vertebrate hosts by ticks of the genus *Amblyomma*. So far, Spotted Fevers are the only zoonosis transmitted by ticks in Brazil (BURGDORFER, 1977; LABRUNA, 2009).

The first description of this disease occurred in the United States, where it was named Rocky Mountain Spotted Fever -RMSF (RICKETS, 1909). In Brazil, the first records date to 1929 in the State of São Paulo, which presents the highest number of reported cases (PIZA;MEYER;GOMES, 1932; TRAVASSOS; DIAS, 1939: SÃO PAULO, 2021). The main vectors in the state are ticks of the species *A. sculptum* and *A. aureolatum*, the latter being the vector in the São Paulo Metropolitan Region (SPMR), in areas under the influence of the Atlantic Forest biome (PINTER;LABRUNA, 2006; OGRZEWALSKA *et al*, 2012).

This species was described in 1772 by Pallas in a study performed in the city of Teresópolis, Rio de Janeiro (ARAGÃO;FONSECA 1961). The immature stages usually parasitize passerine birds and some small rodents (ARZUA *et al*, 2003; GUGLIELMONE *et al*, 2003; LABRUNA *et al*, 2011a; OGRGEWALSKA *et al*, 2012; LUZ *et al*, 2017). The adult stage has wild carnivores as primary hosts in preserved areas and the domestic dog (*Canis familiaris*) as the main host in anthropized areas. Humans are accidentally infected when parasitized dogs transport the adult tick stages to human dwellings adjacent to forest remnants (GOMES, 1933; FONSECA, 1935; ARAGÃO ,1936; ARAGÃO;FONSECA, 1961; GUGLIELMONE *et al*, 2003; LABRUNA *et al*, 2005; PINTER; LABRUNA , 2006; MORAES-FILHO *et al*, 2009; SABATINI *et al*, 2010; OGRGEWALSKA *et al*, 2012; SCINACHI *et al*, 2017).

Gomes (1933), in one of the first experimental studies on the probable vector involved in the BSF occurrence, obtained specimens of *A. aureolatum* from a dog in an area with BSF human cases. Later, in 1937, Emmanuel Dias raised important questions about the importance of the domestic dog in the disease's epidemiology beyond tick vertebrate host. Aragão and Fonseca in 1961 described the species *A. aureolatum* as highly associated with domestic dogs.

The vector is susceptible to the etiological agent and presents high vector competence, with 100% transovarial transmission rates and transstadial perpetuation in ticks infected in the immature phase (LABRUNA *et al* 2011a). Binder *et al* (2021) found 25% of transovarial transmission in females that became infected in adulthood.

The bacteria *Rickettsia rickettsii* seems to present a deleterious effect on ticks, resulting in higher mortality of infected females, lower oviposition rate, and reduced egg mass compared to non-infected groups (LABRUNA *et al*, 2008; LABRUNA *et al*, 2011a). Thus, low infection rates are detected in ticks populations in nature (<12%) (PINTER; LABRUNA, 2006; LABRUNA *et al*, 2011a; OGRZEWALSKA *et al*, 2012; SCINACHI *et al*, 2017), highlighting the need for horizontal transmission through amplifier hosts to generate new infected tick strains (LABRUNA *et al*, 2011; SOARES *et al*, 2012).

The amplification process occurs when the vertebrate host develops a rickettsemia that persists for days or weeks, allowing the infection of new ticks that feed on them and thus initiating a new cohort of infected specimens (BURGDORFER, 1977; MCDADE; NEWHOSE, 1986). Several studies on the role of vertebrates as *Rickettsia rickettsii* amplifiers were performed in Brazil, most of them focused on the species *Amblyomma sculptum* (SOUZA *et al*, 2009; HORTA *et al*, 2010; UENO *et al*, 2016; HERNANDEZ *et al*, 2020).

According to Cooksey *et al.* (1990), hosts of adults ticks are inefficient in amplifying the bacterium since the transovarial pathogen transmission usually is low or absent when the primary tick infection occurs in the adult stage. It may be due to the lack of enough time for the bacteria to colonize the ovaries to allow a high level of transmission to their progeny. Labruna (2009) listed five requirements that a vertebrate host must present in order to be considered an efficient amplifier for *R. rickettsia*: be abundant in the disease's endemic area; be a primary host of the tick vector; be susceptible to infection by the etiological agent; develop rickettsemia capable of infecting other ticks that feed on that host and present a high rate of population renewal, with constant insertion of susceptible animals in the population.

Passerine birds of the genus *Turdus*, hosts of the *A. aureolatum* immature stages, did not demonstrate an amplifying role of the agent in a study performed by Guillen (2004) which raised the question of whether another group of birds or domestic dogs could be amplifiers hosts.

Besides transporting infected ticks, dogs develop an immune response against the bacterium and are considered sentinels for detecting the agent's circulation in the environment through serological surveys. High rates of bacterial circulation in dogs may indicate a higher risk of human parasitism and, consequently, a higher risk of human BSF cases (PADDOCK *et al*, 2002; NICHOLSON; GORSON; DEMMA, 2006; SCINACHI *et al*, 2017).

Several studies refer to the domestic dog as a tick host involved in Spotted Fever epidemiology. These animals are frequently parasitized in the USA by *D. variabilis*, commonly known as the American dog tick (LEVIN *et al*, 2014). Demma *et al.* (2005), in a study of human cases in Arizona, were able to associate the *R. rickettsii* transmission by ticks of the species *R. sanguineus*. All patients with the disease symptoms reported previous contact with dogs, raising the hypothesis that dogs act as amplifying hosts since all tick stages primarily parasitize the domestic dog, which may have been the source of infection for these arthropods.

These animals are susceptible to infection by the bacteria *R. rickettsii*, and the infection is usually mild, with nonspecific symptoms such as fever, diarrhea, vomiting, lethargy, and anorexia. Respiratory, ocular, skin, and neurological symptoms, although less frequent, have also been reported. (BADGER, 1933; LISSMAN; BENACK, 1980; BREITSCHWERDT *et al*, 1991; PIRANDA *et al*, 2008; GASSER; BIRKENHEUER; BREITSCHWERDT, 2001; LABRUNA *et al*, 2009b; LEVIN *et al*, 2014; BINDER *et al*, 2021).

The dog's role as a possible *R. rickettsii* amplifying host in Brazil was demonstrated by Piranda *et al.* (2011). It was observed that dogs have a response to the infection capable to infect ticks of the species *Rhipicephalus sanguineus s.l.* In addition, when evaluating the role of susceptible dogs as amplifiers of *R. rickettsii* for *A. aureolatum* ticks, Binder *et al.* (2021) found that dogs could transmit the agent to uninfected groups despite the low rates of infected ticks at the end of the experiment. In that case, the agent's transmission levels are likely to be reduced because the infection occurs in adulthood.

Continuing the experiment performed by Binder *et al.* (2021), this study aimed to evaluate the ability of previously infected domestic dogs as amplifier hosts for *A. aureolatum* ticks. The goal was to determine whether serologically positive dogs could act as amplifiers after a second contact with the agent.

MATERIAL AND METHODS

Animal infestations (dogs and guinea pigs) and the maintenance of the tick colony was performed at the Experimental Infectory at the Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) in Mogi-Guaçu, São Paulo, Brazil. The study was approved by the SUCEN's Committee on Animal research and Ethics (CEUA-SUCEN N° 0003) (ANEXO A).

Molecular analyzes were performed at the Molecular Biology Laboratory of SUCEN, in São Paulo, Brazil. Also, serological analyzes were performed at the Preventive Veterinary Medicine and Animal Health Department of the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia of the University of São Paulo (USP), Brazil.

Dogs

The experiment was performed with two male Beagles (D1 and D2) previously challenged by the bacteria *R. rickettsii* through *A. aureolatum* adult ticks infected in the immature stage. Indirect immunofluorescence assay and characteristic clinical signs of infection (BINDER et al, 2021) confirmed the first infection. The serological titers were respectively 8192 – Dog 1 and 4096 – Dog 2. The experiment began twelve months after the first exposure of Dog 1 and seventeen months after the first exposure of Dog 2. Serologically positive dogs previously challenged by the agent were exposed to the bacteria for a second time through *A. aureolatum* infected adult ticks in order to determine the immune response facing a new infection and the competence as amplifier and source of infection of the agent to susceptible ticks females. Before the study, the dogs were clinically evaluated, being healthy and without physiological abnormalities. The animals were kept in a clean environment during the experiment, with water *ad libitum* and commercial food offered once a day.

Ticks colony

The ticks in this study derived from three *A. aureolatum* females collected from dogs in Atibaia, São Paulo. The engorged females were kept in a B.O.D incubator at an ideal temperature (23° C) and relative humidity above 95%, as described by Pinter et al. (2004).

A set of eggs resulting from the oviposition of each female was submitted to DNA extraction and then to Polymerase chain reaction (PCR). The result was negative for *Rickettsia* infection. Thus, immature larvae specimens from the three postures were grouped and fed on a healthy guinea pig. The nymphs were separated into two groups, one group fed on a guinea pig infected with the bacteria and another group fed on a healthy guinea pig forming an infected and a non-infected group. The adult ticks from both groups were used to infest the dogs.

***Rickettsia rickettsii* bacteria**

This study used the bacteria *R. rickettsii* Taiaçu strain, isolated from *A. aureolatum* ticks, in a study performed in Mogi das Cruzes, São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006).

Infection of ticks with *R. rickettsii*

Immature stages fed on guinea pigs since this animal model is proven to be an efficient host for the tick species (LABRUNA *et al*, 2011a).

Only one guinea pig was used to feed the tick larvae (non-infected guinea pig). After larvae ecdysis, two guinea pigs were used to feed the nymphs (infected and uninfected groups). Both had their rectal temperature checked once a day during the infestation period.

A guinea pig was inoculated intraperitoneally with 1 ml of *R. rickettsii* infected guinea pig organs homogenate to obtain the infected group one day before the tick infestation (Day 0) (LABRUNA *et al*, 2008).

For both feeding processes (larvae and nymphs), the guinea pigs were placed in wire mesh cages with water *ad libitum* and commercial food, provided twice a day. The cages were placed inside plastic boxes which sides reached half the height of the cages. Also, double-sided adhesive tape (28mm) was glued to the edge of the boxes to prevent ticks escape.

After releasing the ticks, the boxes were checked twice a day (in the morning and the afternoon) to collect larvae or nymphs detached after engorgement. The cages were cleaned after each check.

Ticks collected at each stage were placed in plastic containers (one container per guinea pig, for each collection day), which were kept in glass desiccators in a B.O.D incubator under the same conditions described above.

Canine experimental infection

After obtaining the adult ticks, each of the two dogs received an infestation chamber that was fixed to its back, and in each one, five infected males and eight uninfected females were released.

An Elizabethan collar was placed on each animal to prevent the removal of the tick's chamber. The animals underwent clinical follow-up with daily temperature measurement for 18 days and venous blood collection every few days. The blood was centrifuged for five minutes at 3,000 rpm to separate the blood clot and serum. The first was used in the Polymerase Chain Reaction, while the second was tested through Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) technique to determine the antibody titer evolution.

The chambers were checked daily to collect ticks. Detached engorged female ticks were kept in a B.O.D incubator at 23 °C and 95% humidity to complete the oviposition cycle. Male ticks were placed in plastic microtubes and kept in a freezer at -20 °C for further molecular analysis.

A portion of the larvae from the females' eggs (20µg) were placed under the same conditions as the males, and the remaining larvae were fed on uninfected guinea pigs. Then, the guinea pigs' blood was collected, centrifuged, and stored in a freezer at -20° C for further serological analysis. This procedure was intended to determine the possible vertical transmission of the agent at the end of the experiment.

DNA extraction

Tick samples (adult males and larvae) and blood clots from dogs were individually processed for genomic DNA extraction.

The extraction was performed using the commercial kit DNeasy® Blood and Tissue Kit from Qiagen (Maryland, USA), following the protocol for insect DNA isolation, blood, and tissue, according to the manufacturer's recommendations.

Adult ticks were individually processed in 1.5 ml plastic microtubes while larvae were processed in 20 µg pools. In each microtube steel microspheres (beads) were used to macerate and mechanically lyse resistant tissues. The tubes were placed in high-intensity agitation equipment (FastPrep™ 96) at 1400 rpm for 2 min for adult ticks and 30 s for larvae. The liquid without any solid material was transferred to new plastic microtubes, continuing the extraction process.

Polymerase Chain Reaction (PCR)

Three primers were used to perform the PCR. The first CS-5 and CS-6 primers amplify a 147 bp fragment of the citrate synthase gene (*gltA*) present in all genus of *Rickettsia*. Once reagent, the samples were submitted to PCR using primers that amplify a 532 bp fragment of the *ompA* gene, which is present in the outer membrane of the spotted fever group species, and a 562 bp fragment of the gene encoding the 17kDA protein (*htrA*), also present in spotted fever species (Table 1). Positive (*R. rickettsii* DNA) and negative controls (water instead of the sample) were also used for each reaction to validate the amplification.

The total volume of reagents for each sample, including controls, was 25 µl, being:

Nuclease free water (8.5 µl)

Green Taq® (12.5 µl)

10mM (1.0 µl) forward primer

10mM (1.0 µl) reverse primer and

DNA or water in case of negative control (2 µl)

Table 1: Genes used in molecular analysis to *R. rickettsii* detection

Gene	Primers	Specificity	Primers sequencing(5' – 3')	References
<i>gltA</i>	CS-5	<i>Rickettsia</i>	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTCGAT	Labruna et al 2004
	CS-6		AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	
<i>ompA</i>	Rr190.70p		ATGGCGAATATTTCTCCAAA	

	Rr190.602n	Spotted Fever Group	AGTGCAGCATTTCGCTCCCCCT	Regnery et al, 1991
<i>htrA</i>	17k-5	<i>Rickettsia spp</i>	GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA	Labruna et al, 2004b.
	17k-3		TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC	

After performing the PCR, the products were stored in plastic microtubes and conditioned at -4° C until their use in the electrophoresis process.

Electrophoresis

Two percent of agarose powder (0.6g) was diluted in 30 ml of 0.5X TBE (Tris-Borate-EDTA) and five μ l of GelRed to perform the electrophoresis. For each sample, including controls, a volume of 5 μ l was used. The molecular mass marker used was Ladder Ludwig 100pb DNA, 2 μ l of GelRed, and 2 μ l of GelBlue. The gel interpretation was performed under ultraviolet light in a BIORAD photo documenter. Ticks reactive to the *ompA* gene had the amplified fragment submitted to the genetic sequencing reaction.

Genetic sequencing

Before the genetic sequencing process, the PCR products were purified using 10 μ l of the product and 4 μ l of ExoSAP® (Affymetrix, Santa Clara, California, USA), which degrades the excess of PCR primers and nucleotides using the Exonuclease and Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) enzymes. The Big Dye Terminator 3.1v Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA) was used for sequencing. The reagents and their respective volumes for each sample are described below:

Sequencing Buffer 5X (1.0 μ l)

Up water (4.5 μ l)

10 μ M Primer (0.5 μ l)

BigDye (2.0 μ l)

PCR product (2.0 µl)

DNA was precipitated and sequenced by the Sanger method. The sequences obtained were edited in the ChormasPro program, and the result was submitted to analysis by the BLASTn program (US National Library of Medicine) to determine similarities with *Rickettsia* species in GenBank.

Serology (IFA)

Serological testing was performed at the Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - USP, in a high-security laboratory using slides with *R. rickettsii* antigens grown in Vero cells (LABRUNA *et al.* 2007).

The two dogs and guinea pigs sera were tested for individual determination of the anti-*Rickettsia* antibody titer according to a protocol adapted and recommended by the National Center for Infectious Diseases, USA.

Cells infected by *R. rickettsii* were cultivated in the laboratory in culture bottles with Vero cells and MEM (Minimum Essential Medium) enriched with 5% Fetal Bovine Serum (FBS). After about three days incubated at 28°C, the cells were fixed on glass slides and stained (GIMENEZ, 1964) to visualize the bacteria inside the cells. The liquid from the bottles was centrifuged (3000 rpm for 5 minutes), and the resulting sediment was suspended in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.2% of sodium azide. Ten microliters of this suspension were applied to each slide orifice for antigens, which were air-dried in a laminar flow, fixed in acetone for 10 minutes, and stored at -20° C until the moment of use.

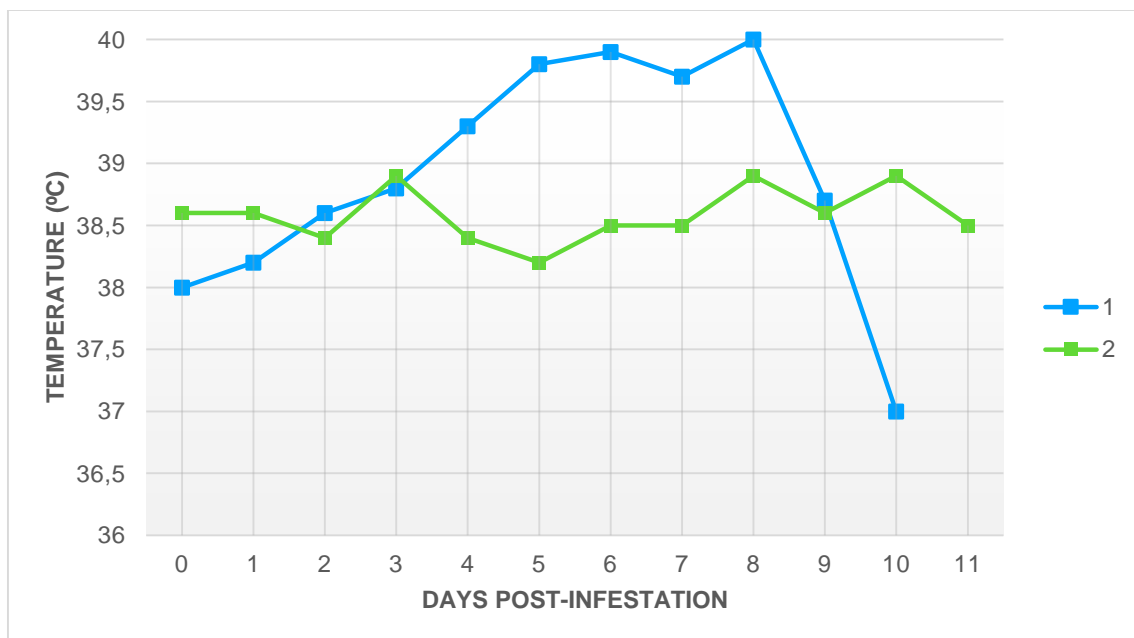
Sera were initially analyzed at a 1/64 dilution with PBS pH 7.4. When a positive result was presented, the sera were analyzed again to determine the maximum antibody titer. Fifteen microliters of diluted serum were added to each slide orifice with the specific antigen (*R. rickettsii*) and incubated for 30 minutes at 37° C in a humid chamber. The slides were then submerged for washing in PBS pH 7.4 for 15 minutes. The next step was the IgG anti-dog or guinea pig antibody conjugate application, which was left to incubate at 37° C for another 30 minutes. Then, the slides were washed and submerged in PBS pH 7.4 + Evans blue for another 15 minutes. After drying at room temperature, the slides were set with two drops of buffered glycerin and covered with

a coverslip to be read in a fluorescence microscope under ultraviolet light with an objective of 40 times magnification. In this reaction, titers equal to or greater than 1/64 were considered positive.

RESULTS

Guinea pigs infestation

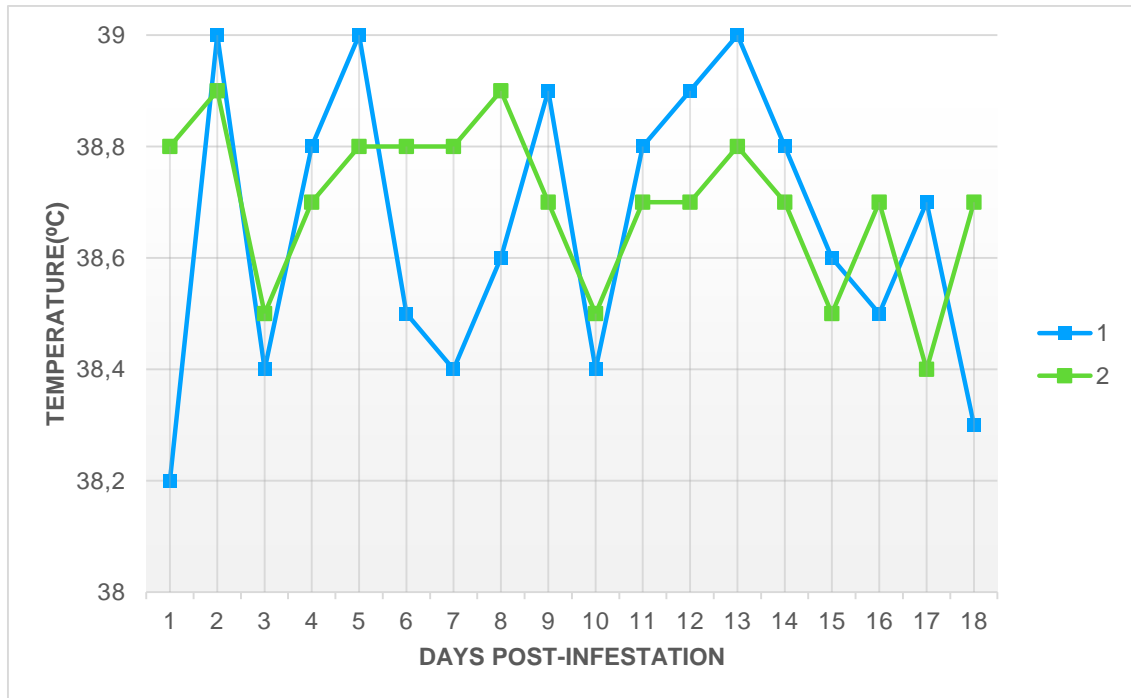
The graph with the temperatures of the guinea pigs' used to compose infected and non-infected groups of ticks is shown below. Animals with temperature above 39.5°C were considered febrile. The infected guinea pig, as expected, responded to the infectious agent with fever onset the fourth day of infestation. The infected guinea pig showed clinical signs of ocular secretion, followed by prostration, and died by the ninth day after infestation.



Graphic 1: Guinea pigs (1 and 2) temperature evolution per day post-infestation.

Canine experimental infection

Only animals with a temperature above 39.5 °C were considered febrile, which was not observed during the 18 days of temperature measurement. No other clinical signs were observed. After infesting the dogs, ten females ticks (five on each dog) and eight male ticks (three on D1 and five on D2) were recovered. Among females, seven concluded oviposition (three from D1 and four from D2), from which larvae were obtained and used to fed on guinea pigs (one guinea pig for each oviposition).



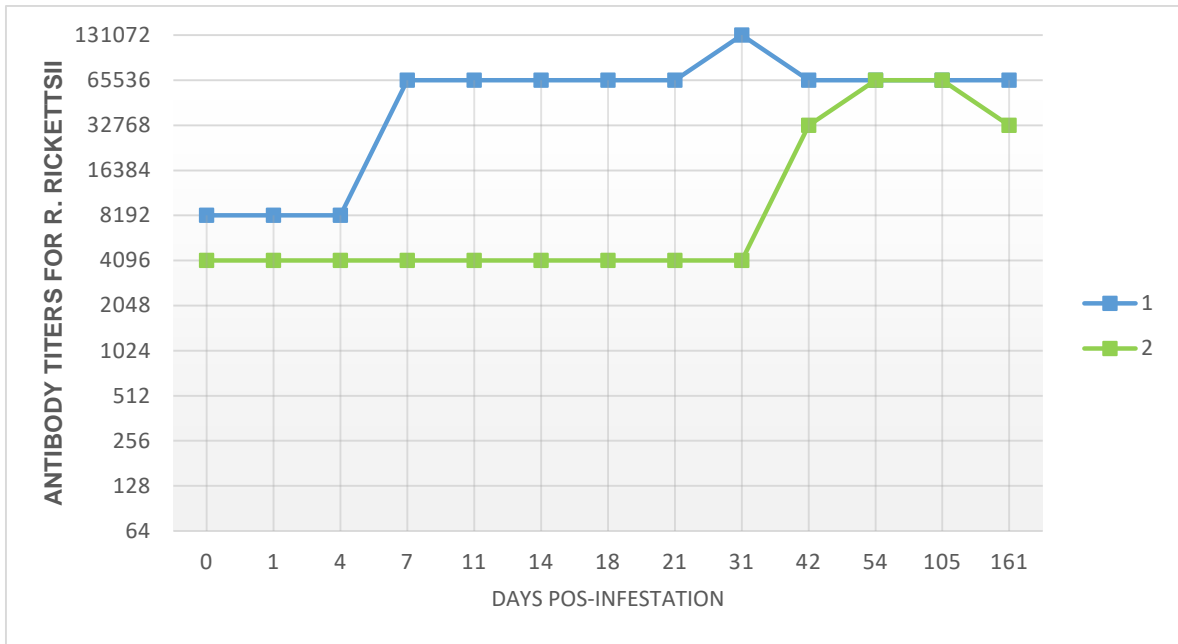
Graphic 2: Dogs (1 and 2) temperature evolution per day post-infestation.

Molecular analysis

All eight recovered male ticks were PCR positive for all genes. Two samples (one from each dog) were selected for genetic sequencing, which resulted in 100% similarity with *R. rickettsii* available in GenBank. The larvae submitted to the PCR test were negative, as well as the dogs' blood clots.

Serological analysis

Serum samples from the two studied dogs showed an increase in antibody titer after a second contact with the etiologic agent. The highest title observed is 131.072 in D1 and 65.536 in D2 (Graphic 3). Serum from the seven guinea pigs used to feed the larvae was negative in the IFA.



Graphic 3: Dogs antibody titer evolution during the experiment.

DISCUSSION

No dogs in the study presented detectable rickettsemia in the blood collected and submitted to molecular PCR tests. In other experimental infection studies, except for Piranda (2008), there was difficulty in detecting the circulating bacteria in the evaluated hosts' blood. The rickettsemia was confirmed by the hosts' blood inoculation into susceptible guinea pigs that developed a molecular response and, in some cases, clinical response to the agent, or by proof of horizontal and/or vertical transmission from the agent to the ticks (SOUZA *et al*, 2009; HORTA *et al* 2010; UENO *et al*, 2016; HERNANDEZ *et al*, 2020; BINDER *et al* 2021).

The animals did not show any clinical signs suggestive of new infection by the agent, and the temperature remained within limits considered normal for the species. These results were similar to a study performed by Hernandez *et al.* (2020b), where capybaras were successively infected by the bacteria *R. rickettsia* and no animal showed clinical signs or fever in the second contact with the agent.

In experimental studies of primary infection in dogs, clinical signs varied from fever, lethargy, and anorexia to gastrointestinal, ocular, and even neurological alterations (BADGER, 1933; BREITSCHWERDT *et al*, 1991; PIRANDA *et al*, 2008; LEVIN *et al*, 2014; BINDER *et al*, 2021). There is no evidence of clinical differences between the studies where the infection happened due to an agent inoculation (BREITSCHWERDT *et al*, 1991; BADGER, 1933) and the others through tick infestation. In the studies with dogs performed in Brazil, fever was a typical symptom in infected animals (PIRANDA *et al*, 2008; BINDER *et al*, 2021), which may be related to the higher pathogenicity of the used strain.

In studies performed with capybaras and opossums (SOUZA *et al*, 2009; HORTA *et al* 2010), no clinical signs or febrile periods suggestive of infection were detected, although rickettsemia was confirmed. In contrast, Hernandez *et al* detected important clinical signs in four out of five capybaras analyzed in their study.

The response to the infection proves to be varied even in individuals of the same species. The canine clinical response seems common, although the few reports in veterinary clinical routine due to lack of laboratory diagnosis to detect the circulation of *R. rickettsii* in dogs (PADDOCK, *et al*, 2002; LABRUNA *et al*, 2009b).

Both animals showed an increase in antibody titers after infestation. It demonstrates that although there was no bacteremia, there was an immune response in

a secondary contact with the etiological agent. Hernandez et al. (2020) also detected an increase in antibody titer in secondary infections in capybaras.

By the end of the infestation, the male ticks remained responsive in the PCR, while all the larval group resulted from the females oviposition tested negative. Larvae that fed on guinea pigs at the end of the experiment were also unable to generate a response in the hosts that did not present serological evidence of infection by the agent.

The confirmation of the agent's vertical transmission by the passage in guinea pigs proved to be an important method since, in the study by Binder et al. (2021), only 4% of females were able to perform transovarial transmission when the egg pools were analyzed by PCR. After feeding the larvae on guinea pigs, it was verified that 25% of the females transmitted the agent to their offspring.

The results obtained in this study demonstrate that dogs become immune and do not develop bacteremia in subsequent contact with the infectious agent. The negative results of the larvae demonstrate the absence of vertical transmission, necessary for infected ticks population renewal in the environment. Likewise, Hernandez et al. (2020) did not detect amplification in analyzes of secondary infection in capybaras.

Binder *et al*, indicated that naive dogs could amplify the agent, but at low levels, demonstrating that infection in adulthood restricts the possibility of transovarial transmission to females, contradicting the model proposed by Cooksey (1990), proposing that only hosts of immature stage could act as amplifiers.

Despite the low amplification of *R. rickettsii* by dogs, the high vector competence of *A. aureolatum* seems to be sufficient to keep the bacteria circulating in the environment with the insertion of newly infected individuals into the population, as long as *Rickettsia* naive dogs are insert into de canine population (newborn or naive adults), keeping a minimal level number of susceptible animals in order to generate the rickettsial horizontal amplification process among the *A. aureolatum* tick population. The low anthropophily, associated with a lower infestation intensity in dogs by *A. aureolatum*, do not sustain often. On the other hand, studies performed with *A. sculptum* ticks have shown a very low vector competence, what can explain why there are relatively few human infection rates, once the amplifier host presents intense infestation and the human parasitism is highly reported. The role of *R. sanguineus* in BSF epidemiology is still unclear. Studies in South America have showed

morphological, genetic and biological differences among *R. sanguineus* populations suggesting the presence of two species in the Neotropics (SZABÓ *et al*, 2005; MORAES-FILHO *et al*, 2011; SZABÓ; PINTER; LABRUNA, 2013; NAVA *et al*, 2015). Despite being infected with the agent, there seems to be no competence to keep the bacteria circulating for successive generations after feeding on infected dogs. Due to its low anthropophily, this species may have a secondary role when associated with the concomitant *A. aureolatum* parasitism, but yet to be demonstrated.

The interaction between tick species, their hosts' and the etiological agent is a determining factor in BSF epidemiological scenario, resulting in a low incidence of cases. However, the frequent alterations in the landscape composition, resulted from human interference in the environment, has favored the agent, enhancing hosts' proliferation (LUZ *et al*, 2019) and raising an alert regarding the need for surveillance of these populations. Ribeiro *et al* (2018) highlight the importance of dogs in the invasion of Atlantic forest fragments and draw attention to the necessity of dogs management strategies.

The high density of dogs in endemic areas in the SPMR requires actions focused on information dissemination regarding responsible ownership to prevent these animals from having access to vector circulation areas. Population control campaigns are also important given that only susceptible dogs are a risk factor for *R. rickettsii* circulation.

REFERENCES

- ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.31, n.4, 759-845, 1936.
- ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia IX: O complexo ovale do gênero *Amblyomma*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.59, n. 2, 1961.
- ARZUA, M.; 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 and Applied Acarology**, v.31, 283-296, 2003.
- BADGER, L. F.: Rocky Mountain Spotted Fever: Susceptibility of the dog and sheep to the virus. **Public Health Reports**, v.48, n.27, 791-795, 1933.
- BINDER, L.C; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; SERPA, M. C. A.; MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; SCINACHI, C. A.; LABRUNA, M. B. Domestic dogs as amplifying hostes of *Rickettsia rickettsii* for *Amblyomma aureolatum* ticks. **Tick and Tick-borne Diseases**, v.12, 2021.
- BREITSCHWEDT, 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. **American Society for Microbiology**, v.35, n.11, 2375-2381, 1991.
- BURGDORFER,W. Tick-borne diseases in the United States :Rocky Mountain spotted fever and Colorado tick fever : a review. **Acta Tropica**, v.34, 103-126, 1977.
- COOKSEY, L. M; HAILE, D. G.; MOUNT, G. A. Computer Simulation of Rocky Mountain Spotted Fever Tranmission by the American dog tick (Acari:Ixodidae). **J. Med. Entomol**, v. 27, 671-680, 1990.
- DEMMA, L. J; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.;DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L. MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain Spotted Fever from an Unexpected Tick Vector in Arizona. **N Engl J Med**, v.352, 587-594, 2005.
- DIAS, E. O cão como provável reservatório do vírus da Febre Maculosa Brasileira. **Brasil Medico**, v. 51, 1245–1247, 1937.
- FONSECA, F. Notas de acareologia XI: Validade da espécie e cyclo evolutivo de *Amblyomma striatum* Kock, 1844 (*Acarina, Ixodidadae*). **Memorias do Instituto Butantan**, v.9, 1935.
- FRIGERI, E. **Invasion by domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) in the Atlantic Forest: effects of habitat lost and agriculture intensification**. Dissertação

(Mestrado em ciências)- Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

GASSER, A. M.; BIRKENHEUER, A. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Canine Rocky Mountain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. **J Am Anim Hosp Assoc**, v. 37, n.1, 41–48, 2001.

GIMÉNEZ, D. F. Staining *Rickettsiae* in yolk-sac cultures. **Stain Technology**, v.39, n.3, 135-140, 1964.

GOMES, L. S. Thyfo exanthematico de São Paulo. **Brasil Médico**, v. 17, n. 52, 919-921, 1933.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MAARTINS, J. R.; VENZAL, J. M.; ARZUA, M. KEIRANS, J. E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v.113, 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.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo, 2014.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; UCHOA, F.; SERPA, M. C. A.; BINDER, L. C.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B. Capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) as amplifying hosts of *Rickettsia rickettsii* to *Amblyomma sculptum* ticks: Evaluation during primary and subsequent exposures to *R. rickettsii* infection. **Tick and Tick-borne Diseases**, v.112020.

HERNÁNDEZ-RAMÍREZ, A.; UCHOA, F.; SERPA, M. C. A.; BINDER, L.; RODRIGUES, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; 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 rickettsia*. **Sci Rep**, v.10, n.924, 2020b.

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZWAŁSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of the Opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia belli* and *Rickettsia parkeri* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, n.10, p 959-967, 2010.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T. BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.; CAMARGO, L.M.; CAMARGO E. P.; POPOV, V. WALKER, D. H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia* SBrazil. **J. Med. Entomol**, v. 41, n. 6, 1073-1081, novembro, 2004.

LABRUNA, M. B.; MCBRIDE, J. W.; BOUYER, D. H.; CAMARGO, L. M. A.; CAMARGO, E. P.; WALKER, D. H. Molecular evidence for a Spotted Fever group

Rickettsia species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Entomological Society of America**, v.41, n.3, 533-537, 2004b.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JACOMO, A. H. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS JR, T. S.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H. F.; GOMES, A. A. B.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C. R. BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F. V.; MORATO, R. L. G.; ALHO, C. J. R.; PINTER, A.; PATRICIA, M. F.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, 149-163, 2005.

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, n.3, 869-873, fevereiro, 2007.

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 rickettsia*. **Journal of Medical Entomology**, v.45, n.6, 1156-1159, 2008.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Ann. N.Y. Acad. Sci**, 1166, 156-166, 2009a.

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, 458-460, 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**, CDC, v. 17, n. 5, 829-834, 2011.

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. **PlosOne**, v.9, n.12, 2014.

LISSMAN, B. A.; BENACH, J. L. Rocky Mountain Spotted Fever in dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 176, n.10, 994-995, 1980.

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 Tick-Borne Dis**. v.8, n.4 657–665,2017.

LUZ, H. R.; COSTA, F. B.; BENATTI, H. R.; RAMOS, V. N.; SERPA, M. C. A.; MARTINS, T. F. et al. Epidemiology of capybara-associated Brazilian spotted fever. **PLoS Negl Trop Dis**, v.3, n.9, 2019.

MCDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural History of *Rickettsia rickettsii*. **Ann. Rev. Microbiol**, v.40, 287-309, 1986.

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-Bourne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n.1, 2009.

MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Genetic analysis of ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* group in Latin America. **ActaTrop.** V. 117. 51-55, 2011.

NAVA, S.; ESTRADA-PEÑA, A.; PETNEY, T.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; VENZAL, J. M.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. The taxonomic status of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806). *Vet. Parasitol.* v.208, 2-5, 2015.

NICHOLSON, W. L.; GORSON, R.; DEMMA, L. J. Spotted Fever Group Rickettsial Infection in Dogs from Eastern Arizona. How Long Has It Been There?. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1078, 519–522, 2006.

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**, 1283-1300, 2012.

PADDOCK, C. D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D. B.; BERG, J. M.; JOSEPH, R. J.; ZAKI, S. R.; CHILDS, J. E. Short Report: Concurrent Rocky Mountain Spotted Fever in a dog and its owner. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 66, n.2, 197–199, 2002.

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, maio, 2004.

PINTER, A; LABRUNA, M. B.; Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v.1078, 523-529, 2006.

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. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103, n.7, 696-701, 2008.

PIRANDA, E. M. Experimental Infection of *Rhipicephalus sanguineus* Ticks with the Bacterium *Rickettsia rickettsia* Using Experimentally Infected Dogs. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**. v.11, n.1, 2011.

PIZA, J. T.; MEYER, J. R.; GOMES, L. S. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o tifo exantemático de São Paulo. São Paulo: **Sociedade Imprensa Paulista**, 11-119, 1932.

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, 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**, 2018.

RICKETTS, H. T. Some Aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as Shown by Recent Investigations. **Medical Record**, v.76, 843-855, 1909.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M.B. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their Rickettsia in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, 913-916, 2010.

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 Sao Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**. v.166, p.225-233, 2017.

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, 139-151, 2012.

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 *Hydrocoerus hydrochaeris* by *Rickettsia Rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v.161, 116-121, 2009.

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.. GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Vet. Parasitol.** v.130, 131–140, 2005.

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

TRAVASSOS, J.; DIAS, E. Identidade imunológica do vírus de Minas Gerais, São Paulo e das Montanhas Rochosas. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1939.

UENO, T.E.H.; COSTA, F. B.; MORAES-FILHO, J.; AGOSTINHO, W. C.; FERNANDES, W. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii*. **Parasites and Vectors**, v.9, 2016.

4. 2 CHAPTER 2: Distribution modeling of *Amblyomma aureolatum*, vector of the Brazilian Spotted Fever in the São Paulo Metropolitan Region, Brazil.

ABSTRACT

Ticks of the species *Amblyomma aureolatum* are vectors of the Brazilian Spotted Fever in the São Paulo Metropolitan Region, Brazil. This species depends on ideal temperature, humidity, and altitude conditions, occurring in localities with forest remnants of the Atlantic Forest. Climatic and environmental factors influence the occurrence and maintenance of different species in some geographic locations. Because of that, modeling tools have been developed and used for better understanding this distribution. This study aimed to determine the potential areas occupied by the species *A. aureolatum* through species distribution modeling using the software *Maxent*. Our results confirmed previous data observed in the field, demonstrating the greater influence of altitude and temperature variables on the species. The areas of Dense Ombrophilous Forest within the Atlantic Forest biome showed a high probability of occurrence of the species. Understanding the determinant factors for the occurrence of vectors in different landscapes can help comprehend its biology, ecology, and interactions with the environment. The analysis of abiotic factors, although partial, significantly contributes to determining alert areas or as a basis for the analysis of the distribution of diseases transmitted by vectors.

Keywords: *Amblyomma aureolatum*, modeling, Maxent, species distribution.

INTRODUCTION

Ticks are ectoparasites responsible for transmitting several diseases of medical and veterinarian importance, only behind mosquitoes in disseminating health-related grievances. They belong to the phylum Arthropoda, class Arachnida, order Parasitiformes, suborder Ixodida, and are divided into three families (Ixodidae, Argasidae, and Nuttalliellidae) (KLOMPEN *et al.*, 1996; HIDALGO;FACCINI-MARTINEZ;VALBUENA, 2013).

Amblyomma belongs to the Ixodidae family and is the most dominant genus in the Brazilian Ixodidae fauna (BARROS-BATTESTI, 2006), embracing the species responsible for the transmission of the bacteria *Rickettsia rickettsii* in the State of São Paulo, Brazil. This locality presents the most significant number of notified cases between the country's national unities, presenting an average lethality of up to 50% (SÃO PAULO, 2021).

In the state's central region, the cases are related to the vector of the species *Amblyomma sculptum*. In areas under the influence of the Atlantic Forest biome in the São Paulo Metropolitan Region (SPMR), cases are related to *A. aureolatum* and are restricted to the southern area, including the São Paulo, Diadema, São Bernardo, Santo Antré, Mauá, Ribeirão Pires, and Mogi das Cruzes municipalities (PINTER *et al.*, 2008; OGRZEWALSKA *et al.*, 2012).

Amblyomma aureolatum was already described in Argentina, Brazil, Paraguay, and Uruguai (GUGLIELMONE *et al.*, 2006). Previous descriptions in Surinam and French Guiana need more detailed studies for its confirmation (ORGZEWALSKA *et al.*, 2016). The vector distribution depends on specific conditions of temperature, humidity, and altitude. Studies in the State of São Paulo demonstrate the association of the species with areas presenting environmental temperatures of around 23°C, relative humidity above 95%, and high altitudes, usually above 700 meters (PINTER *et al.*, 2004; SABATINI *et al.*, 2010; BARBIERI *et al.*, 2015).

Vector populations, including ticks, are intrinsically dependents on the environment and ecological factors for its occurrence and dispersion. Climate can significantly influence these arthropods distributions since they are ectothermics and spend much of their life cycle in the environment (ESTRADA-PEÑA, 2008; CHABOT-COUTURE;NIGMATULINA; ECKHOFF, 2014; BERMUDEZ *et al.*, 2016; ACEVEDO-GUTIERREZ *et al.*, 2018; BOORGULA *et al.*, 2020). Thus, spatial ecology is an

important tool to investigate the factors determining these species' distribution (COLA *et al*, 2017; ATKINSON *et al*, 2012).

By studying species distribution, it is crucial to understand the concept of ecological niche. The first and most important definitions were made by Grinnell (1917) and Elton (1927). Hutchinson (1957) performed a detailed analysis of the previous concepts and defined the terms "fundamental niche" and "realized niche." In summary, the fundamental niche is broader, presenting the ideal abiotic conditions for the occurrence of a particular species but not necessarily being occupied by it. On the other hand, the realized niche is the part of the fundamental niche in which biotic interactions between species is also considered (SOBERON, 2007; SOBERON; NAKAMURA, 2009).

Soberon and Peterson (2005) mentioned four classes of factors essential for the modulation of the species occurrence: abiotic factors (climate, temperature, humidity), biotic factors (mutualism, predation, competition), accessible areas for dispersion and adaptive capacity of the species to the new conditions. These factors interact dynamically and complexly and result in the species geographic distribution in the natural environment. The same authors suggest the BAM diagram for the species distribution, consisting of three conditions for the species occurrence in a particular environment: Biotic-Abiotic-Movement. Besides environmental factors and interactions occurring in such environments, the species must occupy and stay in these environments. Considering vectors, such as ticks, the host presents the role of carriers and can help in the species dispersion.

The better comprehension of these interactions is one of the main focuses of landscape ecology. It can generate meaningful data to evaluate the distribution of rare or threatened species, create programs of biodiversity conservation and species reintroduction, predict species invasions or extinctions, determine the impact of climate change, land use, and other environmental changes on species distribution, and determine the dispersion of vectors and infectious diseases (GUISAN;ZIMMERMAN, 2000; ELITH *et al*, 2006).

Thus, in the last decades, the use of species distribution modeling or ecological niche modeling has been growing significantly. The access to occurrence data in online platforms, the development of geographic information systems (GIS), and the computational development using machine learning tools contributed to this expansion (AUSTIN, 2002; SOBERON, 2010; ELITH *et al*, 2011).

Many models with different approaches are available, and the ability of these models to better represent reality depends on the available information regarding the focal species. In summary, these methods can predict the potential species distribution by extrapolating the known occurrence data for unknown areas (GUISAN; THUILLER, 2005; ALLOUCHE *et al.*, 2006). The modeling results correspond to a prediction based on the species niche data, and the projected area represents the potential distribution of the species based on the environmental layers used in the modeling (PHILLIPS; DUDÍK, 2008). This study aimed to determine through species distribution modeling the potential occurrence area of *A. aureolatum*, vector of the BSF in the SPMR, Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Occurrence data

Georeferenced data on the presence of *A. aureolatum* ticks in the State of São Paulo were obtained through GBIF (Global Biodiversity Information Facility), National Tick Collection “Danilo Gonçalves Saraiva” (FMVZ-USP) and SpeciesLink database. Specieslink contains information on the entomological collections of Fiocruz, Sinbiota-Fapesp, and Instituto Butantan. Bibliographic research on the vector occurrence by analyzing scientific articles was also performed.

Initial data went through a critical evaluation with the exclusion of outdated points due to environmental changes in time and space, and suspicious data that didn't present scientific confirmation of taxa identification, having a low positive predicted value. Before Aragão and Fonseca (1961) study, *A. aureolatum* and *A. ovale* were considered synonyms and the differentiation between species was doubtful. Thus, the occurrence points that did not correspond to areas where the species is known to occur were removed. In addition, some coordinates were repositioned since they were based on the municipalities' centroids, which usually do not correspond to landscapes occupied by the species. These coordinates were repositioned in the nearest forest area within 1 km from de centroid, since this species is necessarily associated with the Atlantic Forest. This process was performed using the QuickMapServices plugin of the Quantum GIS (Q-GIS) v. 3.16.9. Only data from the State of São Paulo was considered due to the epidemiological importance of the species and because this is the only area with confirmed human cases associated with this vector.

Environmental data

Environmental data were obtained considering the WorldClim v. 2.1 database (FICK; HIJMANS, 2017), considering the elevation raster and the 19 bioclimatic variables available (Table 1) in 30 arc-sec resolution (1km x 1km). Elevation data are derived from the Shuttle Radar Topography Mission data. Bioclimatic variables are derived from monthly precipitation and temperature data to generate biologically

relevant variables, presenting annual tendencies, seasonality, and extreme or limiting environmental factors.

Table 1: Bioclimatic and elevation variables obtained from Worldclim data base.

Code	Bioclimatic Variable
BIO1	Annual Mean Temperature
BIO2	Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))
BIO3	Isothermality (BIO2/BIO7) (* 100)
BIO4	Temperature Seasonality (standard deviation *100)
BIO5	Max Temperature of Warmest Month
BIO6	Min Temperature of Coldest Month
BIO7	Temperature Annual Range (BIO5-BIO6)
BIO8	Mean Temperature of Wettest Quarter
BIO9	Mean Temperature of Driest Quarter
BIO10	Mean Temperature of Warmest Quarter
BIO11	Mean Temperature of Coldest Quarter
BIO12	Annual Precipitation
BIO13	Precipitation of Wettest Month
BIO14	Precipitation of Driest Month
BIO15	Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)
BIO16	Precipitation of Wettest Quarter
BIO17	Precipitation of Driest Quarter
BIO18	Precipitation of Warmest Quarter
BIO19	Precipitation of Coldest Quarter
ALTITUDE	Elevation

After downloading the WorldClim data, new raster files were generated for each environmental variable considering the study area (Atlantic Forest in the State of São Paulo - IBGE) and the area potentially occupied by the vector. The IBGE map includes forest formations and ecosystems established by the Atlantic Forest Law (Law nº 11.428 of 2006, according to decree nº 6.660 of November 21 , 2008).

The files were converted to *ASCII* to be used in the Maxent software.

A Variance Inflation Analysis (VIF) was performed to detect collinearity between environmental variables. The analysis was performed in Rstudio v. 4.1.1. The most ecologically relevant variables were selected among those with the greatest correlation based on the knowledge available for the species. Data was selected considering the conditions influencing the vector's biology, especially temperature, humidity, and altitude (PINTER *et al*, 2004; BARBIERI *et al*, 2015). Collinearity is usual and expected in ecological analyses with different predictor variables. However, variables presenting mostly similar information should not be used together in the same analysis (DORMAN *et al*, 2013).

Species Distribution Modeling

The Software Maxent – Maximum Entropy Model for Species Distribution v. 3.4.1. was used to determine the environmental factors that most influence vector's distribution (PHILLIPS; ANDERSON; SCHAPIRE, 2006). Through Maxent, it is possible to estimate the distribution probability of a target species by finding the distribution with maximum entropy (i.e., closest to a uniform distribution), which is subjected to restrictions imposed by the available information regarding the environmental conditions and observed distribution in the study area. The estimated distribution must follow the current knowledge on the environmental conditions of the localities where the species has been observed (ELITH *et al.*, 2006; PHILLIPS; ANDERSON; SCHAPIRE, 2006; PEARSON, 2007).

This model offers several advantages that make its use more frequent: it needs only presence data and a set of environmental variables; it uses categorical and continuous variables; and presents a concise and easily interpretable mathematical definition (PHILLIPS; ANDERSON; SCHAPIRE, 2006). The analysis parameters were defined in the standard format (default) with ten bootstrap repetitions. Duplicated data were removed from the analysis to allow a better data adjustment and reduce the sample bias. The study area used was based on the map of São Paulo's Atlantic Forest extension since this is the area potentially occupied by the vector.

The model evaluation was performed using the Receiver Operating Characteristic (ROC) by calculating the Area Under the Curve (AUC), which returns values varying between 0.0-1.0. Values close to 1.0 indicate that the model is a good predictor of the species distribution compared to a random selection, while values

close to 0.5 indicate that the models are not better than a random selection (ALLOUCHE; TSOAR; KADMON, 2006; ELITH *et al.*, 2006).

All maps were generated through the software QGIS v. 3.16.9., which consists of a GIS application of public access. The projection system of choice was Sirgas 2000, a reference system for the Americas.

RESULTS

After the exclusion of non-informative data, there were 174 occurrence points for the species in the State of São Paulo. Maxent used 115 occurrence points after remove duplicate presence records to reduce data overfitting. The map resulting from the Maxent analysis with the potential distribution area of the vector *A. aureolatum* considering the bioclimatic and altitude variables and the species' occurrence data is represented below (Figure 1). The result presented is an average of the ten model replication.

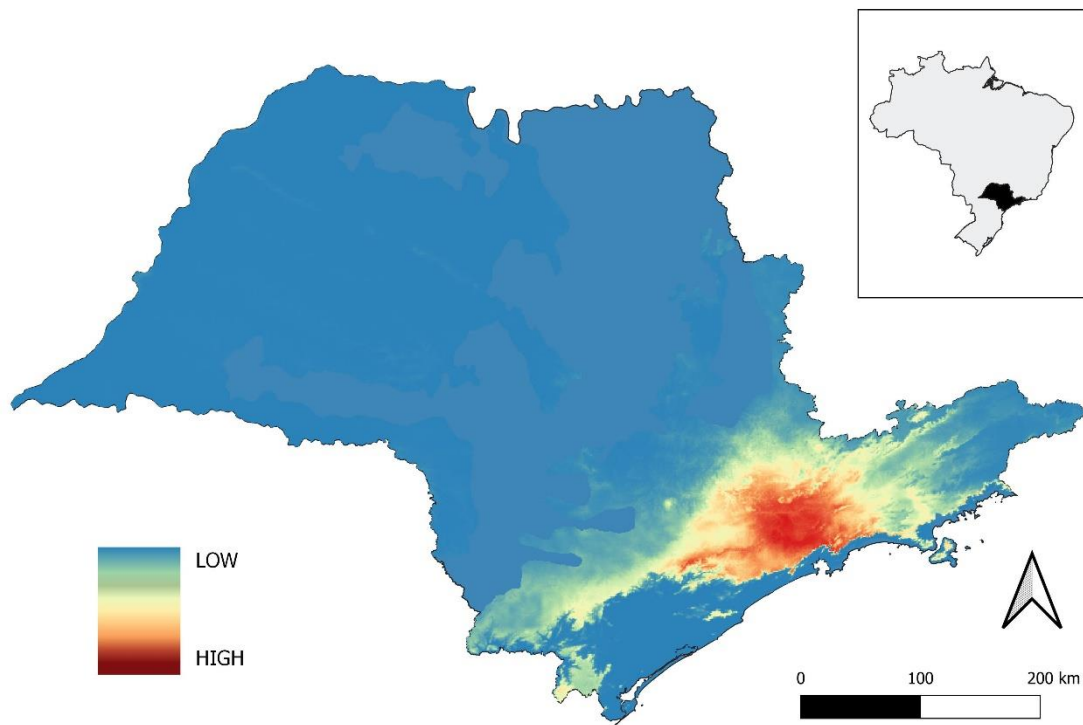


Figure 1: Potential distribution of the vector *A. aureolatum* in Atlantic Rainforest biome in São Paulo State.

BIO2 (55%) and altitude (30.8%) were the variables that most contributed to model construction, totaling 85.8%. From 20 variables initially used by the model, seven formed the final dataset (Mean diurnal range, Isothermality, Temperature seasonality, Min temperature of the coldest month, Temperature annual range, Annual precipitation and Elevation). Most precipitation variables did not demonstrate

significant importance in the initial analyses and were removed from the subsequent tests. The most correlated variables were removed after the VIF analysis.

Altitude showed greater importance for the model when used alone, considering the Jackknife test used to verify the importance of each variable to the model (i.e., when each variable is removed, it is possible to determine the changes in model performance). The AUC analysis resulted in values >0.9 , indicating a good model prediction.

DISCUSSION

The results from the Maxent analysis reinforce the information observed in other studies performed for this species (PINTER *et al*, 2004; SABATINI *et al*, 2010; BARBIERI *et al*, 2015).

The BIO2 variable (Mean Diurnal Range of environmental temperature) presented the greatest participation in the species distribution. According to Acosta (2015), this variable approximates the temperature variation throughout the day, i.e., localities with a higher temperature variation in 24 hours will present higher BIO2 values. It also allows the identification of areas of greater humidity, such as tropical forests, since these areas present lower thermal variation throughout the day. Such information corroborates the reports and data from field studies on this vector found in Atlantic Forest remnants.

Altitude data resulted in occurrence points above 500m. Sabatini *et al.* (2010) found *A. aureolatum* ticks in trails above 700m in the Parque Estadual da Serra do Mar, while Barbieri *et al.* (2015) found data between 100 and 700m. Reports from this second study considered averaged altitudinal data for the municipalities, while the current study considered the most likely occurrence data for the vector, i.e., forest areas.

The interaction with other species and physical barriers can favor or prevent the species' movement in the landscape (SOBERON; PETERSON, 2005). Our results indicate that the Ilhabela region, located at São Paulo's North Coast, as a potential occurrence area of the vector. Acarological surveys previously performed in this locality were negative for the presence of this species. A factor that can potentially explain this data is that, despite presenting good environmental conditions for the species occurrence, physical and/or biological barriers related to the hosts would prevent the maintenance of populations in this locality. Soberon and Peterson argue that this factor is useful in separating potential occurrence localities and the species' realized niche.

It is important to highlight that the analysis performed results in data of potential vector occurrence and aims to get closer to the areas occupied by the species. The results should not be considered the definitive range limit of the species but can be used as the basis for field studies in the evaluation and/or survey for presence localities and species abundance (RAGHAVAN *et al*, 2016).

The model used in this study was composed of abiotic variables. Despite being conditioning for vector biology, such variables represent a portion of the conditions that must be considered in the complex process of species distribution (SOBERON; PETERSON, 2005). Currently, climate and land use data are accessible on online platforms, making its use more widespread. However, factors influencing vector arthropods' distribution are complex and involve their interaction with the hosts and ability to survive and reproduce in a particular environment. Nevertheless, it is possible to attest that changes in these conditions affect how these vectors adapt to the environment, consequently influencing their ecology and occupation areas (BOORGULA *et al.*, 2020).

The Atlantic Forest biome is composed of several vegetal formations and associated ecosystems regulated by the Atlantic Forest Law nº 11. 428 of 2006, decree nº 6.660 from november 21st, 2008 (RIBEIRO *et al.*, 2011; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2021). The map of the potential occurrence of *A. aureolatum* embraces the area of the biome corresponding mostly to the Dense Ombrophilous Forest which has been decreasing in coverage area and presenting a significant fragmentation process due to human activities and a smaller area of Mixed Ombrophilous Forest,

These changes in the landscape have impacted tick populations and their interactions with their hosts. The intensification on forest fragmentation and less connectivity between patches were observed in some areas with human cases of the BSF in the SPMR (SCINACHI *et al.*, 2017). While the vector occupies a broader area, the BSF cases are restricted to some municipalities, indicating that variables other than climate influence the disease occurrence.

Predictive studies focusing on the disease's distribution can be a helpful tool for epidemiological vigilance to focus actions of survey and active investigation in specific areas. Using occurrence data of the vector as a starting point can reduce the efforts of analysis focusing on smaller and more important areas.

REFERENCES

ACEVEDO-GUTIÉRREZ, L. Y.; PATERNINA, L. E.; LONDOÑO, A. F.; PARRA-HENAO, G.; RODAS, J. D. Modelos potenciales de distribución geográfica y climática del complejo *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), potencial vector de *Rickettsia rickettsii* en Colombia. **Biomédica**, v.38, 534-544, 2018.

ACOSTA, A. L. ***Bombus terrestris* chegará ao Brasil? Um estudo preditivo sobre uma invasão em potencial.** Tese (Doutorado em Ecologia). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

ALLOUCHE, O.; TSOAR, A.; KADMON, R. Assessing the accuracy of species distribution models: prevalence, kappa and the true skill statistic (TSS). **Journal of Applied Ecology**, v.43, 1223-1232, 2006.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de Ixodologia IX: O complexo ovale do gênero *Amblyomma*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.59, n. 2, 1961.

ATKINSON, S. F.; SARKAR, S.; AVIÑA, A.; SCHUERMAN, J.; WILLIAMSON, P. Modelling spatial concordance between Rocky Mountain spotted fever disease incidence and habitat probability of its vector *Dermacentor variabilis* (American dog tick). **Geospatial Health**, v.7, n.1, 91-100, 2012.

AUSTIN, M. P. Spatial prediction of species distribution: an interface between ecological theory and statistical modelling. **Ecological Modelling**, v.157, 101-118, 2002.

BARROS-BATTESTI, D. M. Introdução. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, A.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical – Um Guia Ilustrado para Identificação de espécies.** Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, p.1, 2006.

BARBIERI, J. M.; ROCHA, C. M. B. 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 (5), 1170-1174, 2015.

BERMÚDEZ, S. E.; CASTRO, A. M.; TREJOS, D.; GARCÍA, G. G.; GABSTER, A.; MIRANDA, R. J.; ZALDÍVAR, Y.; PATERNINA, L. E. Distribution of Spotted Fever Group Rickettsiae in Hard Ticks (Ixodida: Ixodidae) from Panamanian Urban and Rural Environments (2007–2013). **Eco Health**, v. 13, 274-284, 2016.

BOORGULA, G. D. Y.; PETERSON, A. T.; FOLEY, D. H.; GANTA, R. R.; RAGHAVAN, R. K. Assessing the current and future potential geographic distribution of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae) in North America. **PLoS ONE**, v.15, n. 8, 2020.

- CHABOT-COUTURE, G.; NIGMATULINA, K.; ECKHOFF, P. An Environmental Data Set for Vector-Borne Disease Modeling and Epidemiology. **PlosOne**, v. 9 (4), 1-17, 2014.
- COLA, V. D.; BROENNIMANN, O.; PETITPIERRE, B.; BREINER, F.T.; D'AMEN, M.; RANDIN, C.; ENGLER, R.; POTTIER, J.; PIO, D.; DUBUIS, A.; PELLISSIER, L.; MATEO, R. G.; HORDIJC, W.; SALAMIN, N.; GUIBAN, A. Ecospat: an R package to support spatial analyses and modeling of species niches and distributions. **Ecography**, v.40, 1-14, 2017.
- DORMANN, C.F.; ELITH, J.; BACHER, S.; BUCHMANN, C.; CARL, G.; CARRÉ, G.; MARQUÉZ, J. R. G.; GRUBER, B.; LAFOURCADE, B.; LEITÃO, P. J.; MÜNKEMÜLLER, T.; MCCLEAN, C.; OSBORNE P. E.; REINEKING, B.; SCHRÖDER, B.; SKIDMORE, A. K.; ZURELL, D.; LAUTENBACH, S. Collinearity: a review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. **Ecography**, v. 36, 27-46, 2013.
- ELITH, J.; GRAHAM, C. H.; ANDERSON, R. P.; DUDÍK, M.; FERRIER, S.; GUIBAN, A.; HIJMANS, R. J.; HUETTMANN, F.; LEATHWICK, J. R.; LEHMANN, A.; LI, J.; LOHMANN, L. G.; LOISELLE, B. A.; MANION, G.; MORITZ, C.; NAKAMURA, M.; NAKAZAWA, Y.; OVERTON, J. MCC.; PETERSON, A. T.; PHILLIPS, S. J.; RICHARDSON, K. S.; SCACHETTI-PEREIRA, R.; SCHAPIRE, R. E.; SOBERON, J.; WILLIAMS, S.; WISZ, M. S.; ZIMMERMANN, N. E. Novel Methods Improve Prediction of Species Distributions from Occurrence Data. **Ecography**, v. 29, 129-151, 2006.
- ELITH, J.; PHILLIPS, S. J.; HASTIE, T.; DUDÍK, M.; CHEE, Y. E.; YATES, C. J.; A statistical explanation of Maxent for ecologists. **Diversity Distrib**, v.17, 43-57, 2011.
- ELTON, C. Animal Ecology. Sidgwick and Jackson, London, 209p, 1927.
- ESTRADA-PENÃ, A. Climate, niche, tick, and models: what they are and how should interpret them. **Parasitol Res**, v.103, 87-95, 2008.
- FICK, S. E.; HIJMANS, R. J.. WorldClim 2: new 1km spatial resolution climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology** , v.37, n. 12, 4302-4315, 2017.
- Fundação SOS Mata Atlântica; INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**: período 2019/2020, relatório técnico. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 73p, 2021.
- GRINELL, J. The niche-relationship of the California thrasher. **The Auk**, v. 34, 427-433, 1917.
- GUIBAN, A.; ZIMMERMANN, N. E. Predictive habitat distribution models in ecology. **Ecological modelling**, v.135, 147-186, 2000.
- GUIBAN, A.; THUILLER, W. Predicting species distribution: offering more than simple habitat models. **Ecology Letters**, v.8, 993-1009, 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; MANGOLD, A. J.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R.; GONZÁLES-ACUÑA, D. ; ESTRADA-PEÑA, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Exp. Appl. Acarol.** V.40, 83-100, 2006.

HIDALGO, M.; FACCINI-MARTINEZ, A. A.; VALBUENA, G. Rickettsiosis transmitidas por garrapatas em las Américas: avances clínicos y epidemiológicos, y retos en el diagnóstico. **Biomédica** v. 33 (supl. 1), 161-78, 2013.

HUTCHINSON, G. E. Concluding remarks. Cold Spring Harbour Symposium on Quantitative Biology, v.22, 415-427, 1957.

KLONPEN, J. S. H.; BLACK, W. C.; KEIRANS, J. E.; OLIVER, J. H. Evolution of ticks. **Annu. Rev. Entomol.**, v.41, 141-161, 1996.

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**, 1283-1300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; SCHWARCZ, K.; BAJAY, M. M.; BAJAY, S. K.; PINHEIRO, J. P.; ZUCCHI, M. I.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Characterization of genetic variability and population structure of the tick *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.53, n.4, 843-850, 2016.

PEARSON, R. G. Species' Distribution Modeling for Conservation Educators and Practitioners. **Lessons in Conservation**, v. 3, 54-89, 2007.

PHIPILS, S. J.; ANDERSON, R. P.; SCHAPIRE, R. E.; Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, v. 190, 131-159, 2006.

PHILIPS, S. J.; DUDÍK, M.; Modeling od species distribution with Maxent: new extensions and and a comprehensive evaluation. **Ecography**, v. 31, 161-175, 2008.

PHILLIPS, S. J. 2017. A Brief Tutorial on Maxent. Disponível em: http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/maxent/. Acesso em 15/03/2019.

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. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.24, n.2, 247-252, 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, maio, 2004.

RAGHAVAN, R. K.; GOODIN, D. G.; HANZLICEK, G. A.; ZOLNEROWICH, G.; DRYDEN, M. W.; ANDERSON, G. A.; GANTA, R. R. Maximum entropy-based

ecological niche model and bio-climatic determinants of lone star tick (*Amblyomma americanum*) niche. **Vector-borne and zoonotic disease**, v.16, n.3, 205-211, 2016.

RIBEIRO, M.C.; MARTENSEN, A.C.; METZGER, J.P.; TABARELLI, M.; SCARANO, F.; FORTIN, M.J. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. In: ZACHOS, F.; HABEL, J. (eds) **Biodiversity Hotspots**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M.B. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their Rickettsia in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, 913-916, 2010.

SÃO PAULO. Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo. Centro de Vigilância Epidemiológica "Prof Alexandre Vranjac". **Dados estatísticos- Febre Maculosa**. Disponível em <<http://www.cve.saude.sp.gov.br/>> Acesso em: 16 agosto 2021.

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 Sao Paulo metropolitan region, Brazil. **Acta Tropica**. v.166, p.225-233, 2017.

SOBERÓN, J.; PETERSON, A. T.; Interpretation of Models of Fundamental Ecological Niches and Species Distributional Areas. **Biodiversity Informatics**, v.2, 1-10, 2005.

SOBERÓN, J. Grinnellian and Eltonian niches and geographic distributions of species. **Ecology letters**. v.10, 1115-1123, 2007.

SOBERÓN, J.; NAKAMURA, M. Niches and distributional areas: Concepts, methods and assumptions. **PNAS**, v.106, 19644-19650, 2009.

SOBERÓN, J. Niche and area of distribution modeling: a population ecology perspective. **Ecography**, v. 33. 159-167, 2010.

4.3 CHAPTER 3: Forest fragmentation as a predictor of Brazilian Spotted Fever risk.

ABSTRACT

Forest fragmentation is one of many landscape alterations that has intensified over time through changes in the environment caused by human action. This process has a great impact on the interaction between animal species and consequently on the occurrence of vector-borne diseases. In the case of Brazilian Spotted Fever (BSF), endemic disease in the São Paulo Metropolitan Region (SPMR), the landscape composition interferes with disease dynamics through shifts in the interaction between vector, vertebrate hosts and human population. The aim of the study was to determine which environmental factors can affect the occurrence of BSF. Landscape metrics were calculated based on two types of areas: 1- areas with the presence of the vector, without the occurrence of BSF human cases; 2 –areas with the presence of the vector, with BSF human cases. The results showed that the most important variables associated with disease risk were the increase in the edge length, which relates to the increase in fragmentation, and reduction of continuous forest area resulting in less connectivity and a consequent reduction in biodiversity. This changes in the environment favors invasive species such as the domestic dog (*canis familiaris*), which is the main host of the vector *A. aureolatum* in fragmented areas, in addition to its role as amplifier of the bacteria for the tick vector. Therefore, we suggest field studies with the aim to analyze the process of dog invasion in forest fragments in endemic and non-endemic areas for BSF in order to determine possible differences between areas. Educational actions and campaigns on responsible ownership and reproductive control of dog population should be standout measures for disease prevention and control, helping to restrict the growth of amplifier hosts population and their incursion into forest areas where parasitism by ticks occurs.

Keywords: Brazilian Spotted Fever, fragmentation, domestic dogs.

INTRODUCTION

The globalization and urbanization processes were intensified over time and as a result we observed the emergence and re-emergence of infectious diseases, including zoonoses and vector-borne diseases, which are modulated by changes in ecosystems at the landscape level. The relationship between ecology and human and animal health encompasses factors ranging from the genetic diversity of microorganisms, the diversity of vectors and hosts, and the interaction between animal communities and the landscape structure in which they are inserted. The term spatial epidemiology defines the study of the variation in the diseases risk of occurrence according to the characteristics of the environment in geographic space (PONGSIRI *et al*, 2009; LAMBIN *et al*, 2010; KILPATRICK, 2011).

According to Keessing *et al.* (2006), the spread of infectious diseases necessarily depends on the interaction between at least two species (pathogen and host). The complexity of the disease risk varies according with the differences in these interactions, for example, in cases where more than one species is involved in the transmission of the pathogen (vector) and when more than one host can maintain the circulation of the pathogen in nature.

The growing interest in the relationship between biodiversity and the infectious diseases occurrence has raised the hypothesis of the “dilution effect”, which suggests that the preservation of species biodiversity is a protective factor against certain diseases. On the other hand, the reduction in biodiversity can favor the encounter between pathogens and their hosts, increasing the risk to human health (OSTFELD; KEESING, 2000; JOHNSON; THIELTGES, 2009; KEESING *et al*, 2010). Keessing *et al.* (2010) reports that about half of the infectious diseases that have emerged in the population since 1940 are the result of changes in land use caused by human action.

One of the effects of human interference in the landscape is the fragmentation process, which is characterized by a reduction in the size of forested areas, an increase in the distance between fragments and an increase in the proportion of edge in relation to the interior of the fragment. One of the most important consequences of this process is the reduction of species richness and abundance that favors the dominance of generalist and more resilient groups at the expense of sensitive species, less tolerant to high levels of environmental disturbances (ALLAN; KEESING; OSTFELD 2003;

REED; JOHNSON-BARNARS, BAKER, 1996; BECA *et al*, 2017). Fragmentation is also a cause of what is called the “edge effect” and which can lead to the collapse and extinction of native species by intensifying contact with predatory species (RIBEIRO *et al*, 2016; BECA *et al*, 2017).

Tropical forests are ecotopes that suffer a high impact of anthropogenic alterations. These impacts extend to communities of vertebrate animals and arthropod vectors and consequently can affect the incidence of various zoonoses in which these animals are involved (HILL *et al*, 2010; TABARELLI *et al*, 2010). Begon (2010) draws attention to the importance of ecoepidemiological studies, given that, while epidemiology focuses on the behavior of diseases in a population in time and space, ecoepidemiology goes deeper into this dynamic taking into account the interactions between pathogens, vectors, hosts and the environment.

According to Brownstein and Skelly (2005), the landscape structure and land cover classes are factors that historically interfere in vector-borne diseases, more specifically tick-borne diseases. Several studies addressing ecological aspects have been conducted to better understand the ecoepidemiology of various diseases, (OSTFELD; KEESING, 2000; ALLAN; KEESING; OSTFELD, 2003; BROWNSTEIN; SKELLY, 2005; PRIST *et al*, 2017; MCCALLUM, 2008).

The Atlantic Forest biome in Brazil is under great pressure from deforestation and fragmentation as the result of human occupation or the expansion of agriculture. Only 12.4% of the original biome area still exists and 84% of this area consists of remnants smaller than 50 hectares (BECA *et al*, 2017; SOS Mata atlântica, 2021). The cases of BSF in the SPMR are concentrated in regions with the presence of these fragments and the etiological agent transmission occurs when domestic dogs, the main hosts of the adult stage of the vector tick, transport infected ticks from the forest to the adjacent anthropic environment (OGRZEWALSKA *et al*, 2012).

Scinachi *et al* (2017) demonstrated that forest fragmentation has an impact on disease distribution since dogs serologically positive for *R. rickettsii* circulation were found only in high fragmented areas. This can be explained by the decrease in biodiversity in fragmented areas, consequently reducing the number of species that can act as hosts of the vector, significantly favoring the domestic dog which, in addition to being a host, is an amplifier of the etiological agent (BINDER *et al*, 2021).

Domestic dogs are possibly the most abundant carnivores in the world and human movement and occupation in almost every environments favors their

expansion. From an ecological point of view, they are considered invasive species and can negatively interfere with natural ecosystems (BUTTLER; DUTOIT; BINGHAM, 2004; HEGER; SAUL; TREPL, 2013). In many places, especially urban centers with greater human concentration, these animals are raised without restriction of access to their surroundings, including forested areas. This behavior favors the number and frequency of incursions of dogs into the fragments and can threaten wild animals through predation, competition and disease transmission. (CLEAVELAND *et al*, 2000; CASSANO; BARLOW; PARDINI, 2014; CARVALHO *et al*, 2019).

Currently, with the development of computational mechanisms for calculating landscape metrics and disease risk, it is possible to carry out more detailed analyzes of the ecological processes that influence the occurrence of infectious diseases. The focus of this study was to analyze the factors related to landscape variables such as forest area, edge and connectivity and their association with the occurrence of BSF in the SPMR.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The analyzes were carried out in areas of the State of São Paulo, under the influence of the Atlantic Forest biome, where cases of BSF are related to the vector *A. aureolatum* (Figure 1). According to SOS Mata Atlântica Foundation, the state has 22.9% (3.9 million hectares) of its original forest that has suffered major impacts from forest degradation and consequent fragmentation over time. Although in recent years there has been a reduction in deforestation rates, the impacts of this process on the interaction between species and the environment raise concerns. (TABARELLI *et al*, 2010).

The spatial data of the Atlantic Forest biome in the State of São Paulo is based on the IBGE map of the area of application of the Atlantic Forest Law (Law nº 11.428 of 2006, according to decree nº 6.660 of November 21, 2008) which delimits the forest formations and ecosystems associated with the biome that includes: Dense Ombrophilous Forest; Mixed Ombrophilous Forest; Open Ombrophilous Forest; Seasonal Semideciduous Forest; Deciduous Seasonal Forest; altitude fields; areas of pioneer formations, known as mangroves, restingas, saline fields and alluvial areas; vegetation refuges; areas of ecological tension; interior swamps and forest enclaves, represented by disjunctions of Dense Ombrophilous Forest, Open Ombrophilous Forest, Seasonal Semideciduous Forest and Seasonal Deciduous Forest; steppe, savanna and steppe savanna areas; and native vegetation of coastal and oceanic islands (RIBEIRO *et al*, 2011; FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INPE, 2021).

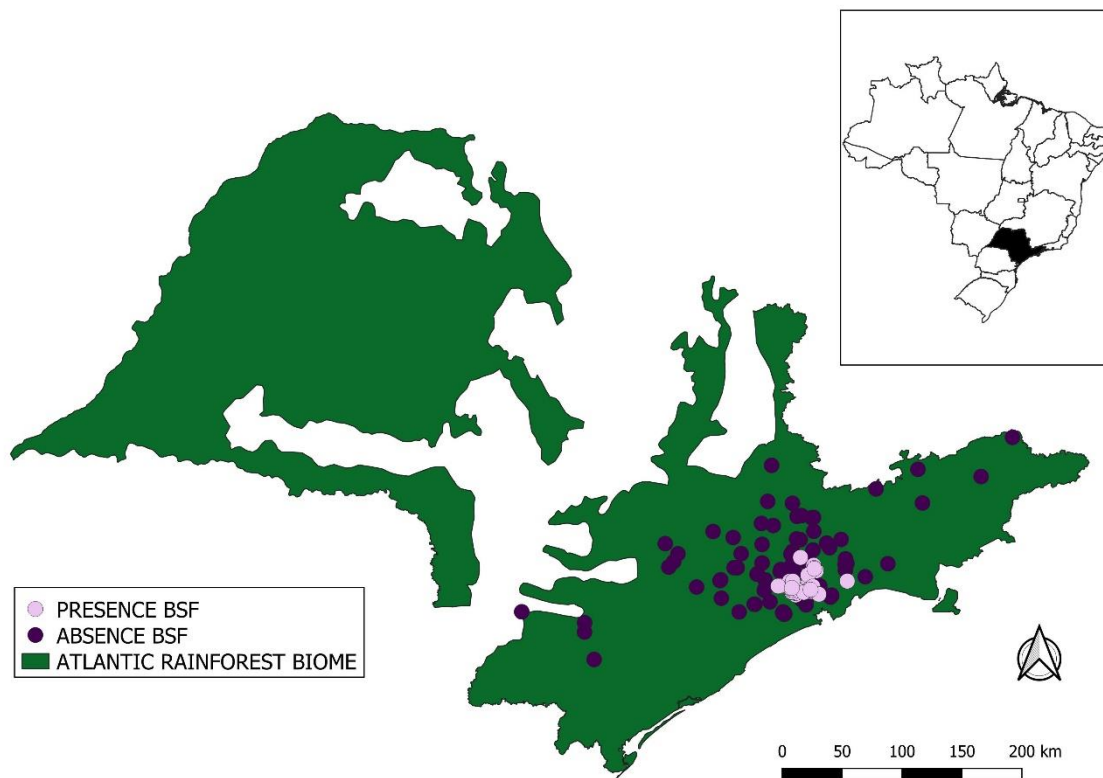


Figure 1: *A. aureolatum* occurrence in the Atlantic Forest biome in the State of São Paulo divided between presence or absence of BSF cases.

Brazilian Spotted Fever and exploratory variables

To carry out the landscape analysis, the occurrence data of the vector *A. aureolatum* were used divided between localities with or without BSF occurrence related to this vector (Figure 1).

This approach was chosen in order to determine possible differences between landscape metrics in the studied areas since the vector has a wider distribution than the disease prevalence. Scinachi et al. (2017), after studying nine areas with different fragmentation profiles in the São Paulo Metropolitan Region, found a positive association between increased forest fragmentation and positive dog serology. In this study, an attempt was made to extend the analysis to the entire area occupied by the vector, using the disease prevalence data as a comparison.

The BSF occurrence data added up to a total of 77 points while the absence data added up to a total of 86 points.

Metrics were calculated using LECOS-Landscape Ecology Statistics plugin in the Quantum GIS software version 3.16.9 (Table 1). The plugin is based on metrics

extracted from the FRAGSTATS software (Spatial Pattern Analysis Program for Categorical Maps- MCGARIGAL; CUSHMAN; ENE, 2012) and includes functions for calculating landscape metrics.

Initially, a 2km buffer was generated from each point based on the study by Scinachi et al. (2017) which takes into account the distance in which dogs enter the forest areas from the edge of the fragments. Another 10 km buffer was calculated to measure connectivity metrics. The base for metrics calculation were forest cover data derived from the Atlantic Forest biome, from Mapbiomas project, collection 4.1 (year 2018) adapted for the State of São Paulo (Figura 2).

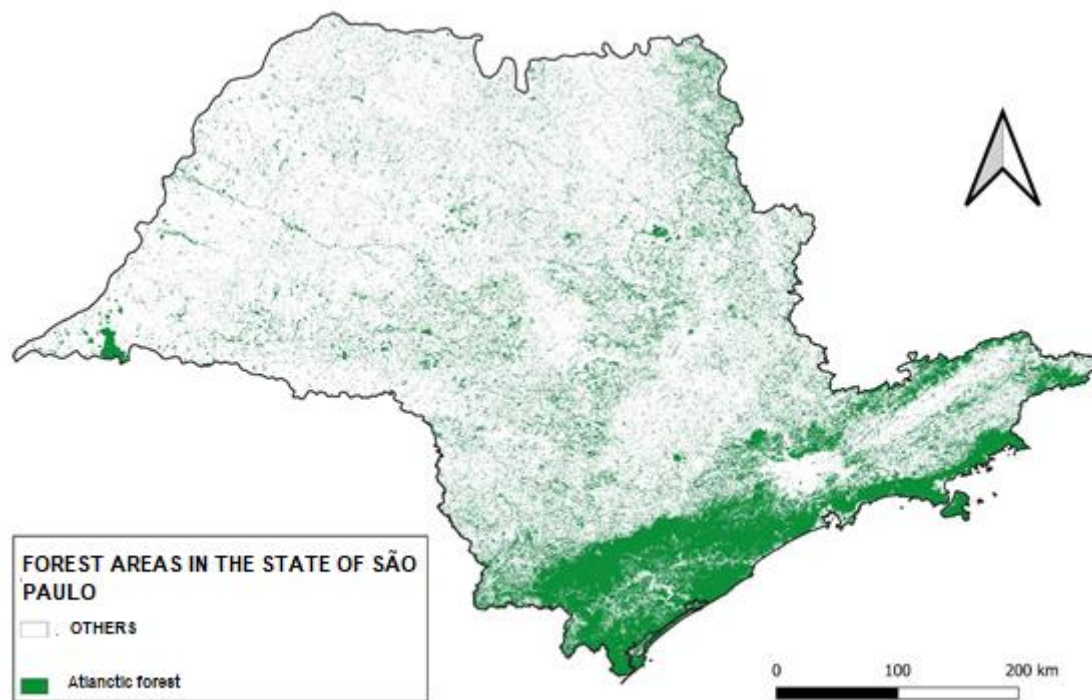


Figure 2: Forest areas in São Paulo State extracted from Mapbiomas collection 4,1

Table 1: Landscape ecology metrics.

Initials	METRICS
LC	Land Cover
EL	Edge Length
ED	Edge Density

NP	Number of Patches
ENN	Euclidean Nearest-Neighbor Distance
LC10	Land Cover 10km

Statistical analysis

For statistical analysis, the linear mixed model was chosen, using Rstudio software version 4.1.1. Initially, an collinearity analysis between the predictor variables was performed. Data with correlation greater than 0.7 were not used together in the same model.

A series of “full” models was made combining the uncorrelated variables. Afterwards, a function was used to generate several models with different combinations of variables. The best models were selected based on the Akaike evaluation criteria corrected for small samples (AICc). The lower the AIC value, the higher the quality of the model. Variables were considered significant when the confidence interval (95%CI) did not cross the number zero.

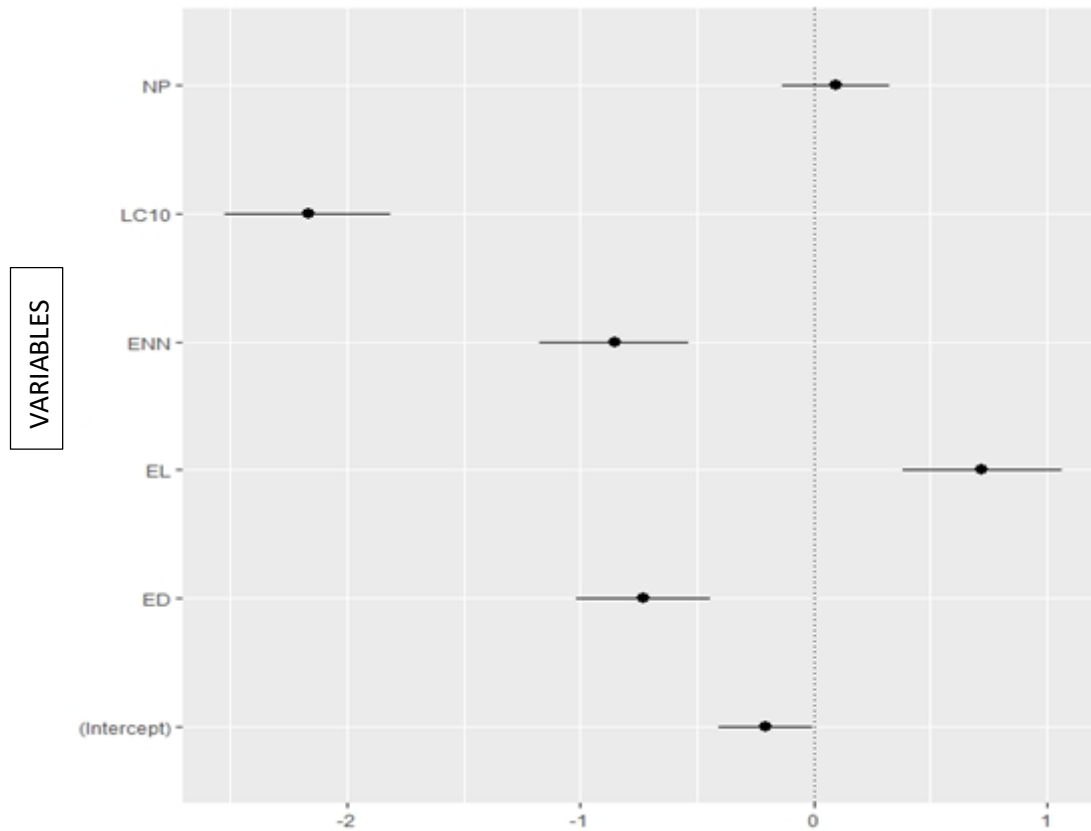
RESULTS

The final analysis of mixed linear models selected two equally plausible models.

Table 2: Results of the selected models ordered by the Akaike evaluation (smallest to largest) corrected for small samples (AICc), difference between the AICc values for each model (Δ AICc), weight for each model and the loglikelihood (LL).

Model	AICc	Δ AICc	weith	LL
161	170.94	0.00	0.66	-80.28
321	172.26	1.32	0.34	-79.86

All variables selected showed statistical significance except from NP variable that cannot be considered informative in this study. The variable EL showed a positive association with the risk of BSF while others showed a negative relationship.



Graphic 1: Variables that showed statistical significance in the linear mixed models.

DISCUSSION

The results of this study demonstrate that some landscape variables influence the occurrence of BSF in the SPMR. Edge density, Euclidean distance from the nearest neighbor, and edge perimeter and forest area in 10km presented statistical significance after the analysis. The results obtained are similar to those obtained by Scinachi et al. (2017) who, after analyzing nine areas with different fragmentation profiles, found greater statistical importance in the variables of forest cover and edge perimeter.

Human cases of BSF in this area show a specific distribution, being concentrated in the southern part of the SPMR while the northern region, despite the presence of the vector, does not have any case reports. In a study by Ogrzewalska et al. (2016) on the genetic variability of vector populations, the presence of genetic flow between these two areas was observed, raising the hypothesis that ecological conditions not yet specified may act as an impediment to the establishment of the agent in the northern region. Earlier, in 2012, Ogrzewalska et al observed that endemic areas for BSF had smaller fragments and greater distance between them in comparison with non-endemic areas.

In this study, the variables edge density, Euclidean distance and vegetation cover in 10km showed a negative association in relation to the occurrence of BSF, while the edge perimeter variable presented a positive association.

The 10km land cover can be considered as a connectivity variable while the Euclidean distance from the nearest neighbor is a measure of isolation/proximity between fragments. While the former is a protective factor in relation to the occurrence of BSF, the Euclidean nearest-neighbor distance data showed unusual results in the model analysis, since an increase in risk would be expected as the ENN increases. However, this can be explained by the fact that the metric calculation takes into account only one measure, so, even in very fragmented areas, there may be a small distance between some fragments.

Edge length is a variable constantly used in ecology studies and is highly associated with fragmentation. Thus, the increase in fragmentation increases the amount of edge that can, consequently, facilitate the access of certain species to the interior of the fragments (BROWNSTEIN; SKELLY, 2005). According to Ribeiro et al. (2015), the edge effect has a great impact on the distribution and abundance of living organisms in the landscape, and the response of each species in relation to the edge

is different. The process of destruction of continuous forest areas favors the invasion of domestic dogs into fragments by increasing the contact between the forest and the urban environment, intensely occupied by these animals (LACERDA; TOMAS; MARINHO-FILHO, 2009).

The domestic dog is the main host of the adult stage of the tick *A. aureolatum*, vector of BSF in the SPMR. In addition to being hosts, these animals also play a role in amplifying the bacteria *R. rickettsii* (PINTER; LABRUNA, 2006; BINDER *et al*, 2021). Therefore, knowing the species response to modified landscapes can help to better understand the epidemiology of the disease.

The population of domestic dogs in the State of São Paulo is intrinsically related to the human presence in the most diverse environments. Keessing *et al.* (2010) report that high densities of competent hosts can facilitate the establishment of pathogens and their transmission and that a higher density of domesticated hosts is almost always associated with a reduction in biodiversity.

Beca *et al.* (2017) verified, when analyzing the species richness and abundance in 22 Atlantic forest fragments in the State of São Paulo, that instead of an expected reduction in biodiversity, there was a substitution in the prevalence of species. The space previously occupied by specialist groups and more sensitive to changes in the environment was replaced by exotic and generalist species.

Allan *et al.* (2003) reported that areas of greater forest disturbance increased the density of the rodent *Peromyscus leucopus*, the main host of the immature stages of the vector associated with Lyme disease transmission. Populations of this species reach high levels densities in reduced forest fragments, probably due to reduced predation and competition. Population density tends to be inversely proportional to the size of the fragments area. Browstein and Skelly (2005) reported that landscape alteration also favors the deer species *Odocoileus virginianus*, the main host of the adult stage of the vector. This entire process results in an increased risk of human exposure to the Lyme disease agent, the bacterium *Borrelia burgdorferi* transmitted by *Ixodes scapularis* ticks in North America.

In a review of infectious disease data carried out by Pongsiri *et al*, it was observed that changes in biodiversity impact the incidence of various diseases such as Malaria, Schistosomiasis, Lyme, Hantavirus and West Nile Disease, as changes in the environment modify the interactions between human population and the species that act as vectors and hosts.

The biodiversity loss increased by human spread, favors the establishment and multiplication of domestic dogs population due to their association with humans. Their presence near native environments results in interactions with wild species through predation, competition and disease transmission. In addition, human presence directly interferes with these populations, providing resources such as food and shelter, which increases population density. The association between large populations of this species and its free-ranging habits, is one of the major problems related to the conservation of wild animals, especially in natural refuges close to urban and peri-urban regions (GOMPPER;VANAK, 2008; VANAK;GOMPPER, 2009, FRIGERI *et al*, 2014).

The ecological role of domestic dogs is usually focused on studies of conservation of wild species. However, stays clear that domestic dogs are also a risk to public health when animal welfare is not taken into account. The presence of these animals in endemic areas for BSF should be an alert for the surveillance and disease control services to focus on specific actions on these populations.

One of the main points is public health education, making reports on responsible ownership for populations living in risk areas for the disease occurrence, since, in many of these areas, dogs are bred without any restrictions to the interior of forest areas, increasing the risk of parasitism. According to Hughes and MacDonald (2013), free-ranging dogs (with or without tutors and with full or partial access to the street) represent about 75% of the global dog population. According to the authors, the concern regarding this issue has grown over time, leading to the joining of efforts of animal welfare and public health organizations in the formulation of resolving strategies.

In this sense, taking into account the role of dogs in the epidemiology of BSF, reproductive control campaigns should be encouraged, as they help to reduce population density and, consequently, the number of animals that enter the forest.

Brownstein and Skelly, in a study on Lyme disease raise the hypothesis that high levels of fragmentation can lead to a reduction in human cases since the fragments become so reduced that they cannot support ticks populations, leading to a reduction in human exposure to the vector and the etiological agent of the disease. Despite its epidemiological sense, the reduction of natural areas should not be a strategy to be encouraged. As suggested by Keesing *et al*. (2010), it is necessary to draw attention to the urgency of intensifying efforts to preserve ecosystems and their

biodiversity, as changes in the environment also favor the spread of some diseases such as BSF. The protection of Atlantic Forest remnants in the SPMR is a preventive measure to avoid the occurrence of human cases in new areas, as well as a measure to preserve the environment and wild species.

It is clear, when analyzing the aspects involving the occurrence of BSF, that prevention and control actions must be multidisciplinary, covering areas of knowledge in epidemiology, ecology, biology and public health. These actions should be disseminated among groups in the scientific community, as well as in the public service and the civil population, in order to ensure the dissemination of information and a reduction in the disease incidence.

Field studies, similar to those carried out by Ribeiro et al. (2018) and Frigeri et al. (2014), focusing on the distribution and interaction of domestic dogs with forest fragments, comparing endemic and non-endemic areas can provide additional information on ecology of the disease, contributing to scientific knowledge in the area.

REFERENCES

- ALLAN, B. F.; KEESING, F.; OSTFELD, R. S.; Effect of forest fragmentation on Lyme disease risk. **Conservation Biology**, v.17, n.1, 267-272, 2003.
- BECA, G.; VANCINE, M. H.; CARVALHO, C. S.; PEDROSA, F.; ALVES, R. S. C.; BUSCARIOL, D.; PERES, C. A.; RIBEIRO, M. C.; GALETTI, M. High mammal species turnover in forest patches immersed in biofuel plantations. **Biological Conservation**, v.210, 352-359, 2017.
- BEGON, M. "II.9 Ecological Epidemiology".In: **The Princeton Guide to Ecology**, edited by SIMON A. L.; STEPHEN, R. C.; CHARLES J. G.; , Ann P. K.; MICHAEL, L.; JONATHAN B. L.; BRIAN, W.; DAVIS S. W. Princeton: **Princeton University Press**, 220-226, 2009.
- BINDER, L.C; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; SERPA, M. C. A.; MORAES-FILHO, J.; PINTER, A.; SCINACHI, C. A.; LABRUNA, M. B. Domestic dogs as amplifying hostes of *Rickettsia rickettsii* for *Amblyomma aureolatum* ticks. **Tick and Tick-borne Diseases**, v.12, 2021.
- BROWNSTEIN, J. S.; SKELLY, D. K. Forest fragmentation predicts local scale heterogeneity of Lyme disease risk. **Oecologia**, v.146, 469-475, 2005.
- BUTTLER, J. R. A.; DU TOIT, J. T.; BINGHAM, J. Free-ranging domestic dogs (*Canis familiaris*) as predators an prey in rural Zimbabwe: threats of competition and disease to largewild carnivores. **Biological conservation**, v.115, 369-378, 2004.
- CARVALHO, W. D.; ROSALINO, L. M.; GODOY, M. S. M.; GIORGETE, M. F.; ADANIA, C. H.; ESBÉRARD, C. E. L. Temporal activity of rural free-ranging dogs: implications for the predator and prey species in the Brazilian Altantic Forest. **Neobiota**, v.45, 55-74, 2019.
- CASSANO, C. R.; BARLOW, J.; PARDINI, R. Forest loss or management intensification? Identifying causes of mammal decline in cacao agroforests. **Biological Conservation**, v. 169, 14-22, 2014.
- CLEAVELAND, S.; APPEL, M. G. J.; CHALMERS, W. S. K.; CHILLINGWORTH, C.; KAARE, M.; DYE, C. Serological and demographic evidence for domestic dogs as a source of canine distemper virus infection for Serengeti wildlife. **Veterinary Microbiology**, v. 72, 217-221, 2000.
- FRIGERI, E.; CASSANO, C.; R.; PARDINI, R. Domestic dog invasion in an agroforestry mosaic in souther Bahia, Brazil. **Tropical conservation Science**, v. 7, n. 3, 508-528, 2014.
- FUNDAÇÃO SOS MATA ATALÂNTICA; INPE. **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica**: período 2019/2020, relatório técnico. São Paulo: Fundação SOS Mata Atlântica, 73p, 2021.

GOMPPER, M.; VANAK, A. Subsidized predators, landscapes of fear and disarticulated carnivore communities. **Animal Conservation**, v.11, 13-14, 2008.

HEGER, T.; SAUL, W. C.; TREPL, L. What biological invasions “are” is a matter of perspective. **Journal for Nature Conservation**, v. 21, 93-96, 2013.

HILL, J. K.; GRAY, M. A.; KHEN, C. V.; BENEDICK, S.; TAWATAO, N.; HAMER, K. C. Ecological impacts of tropical forest fragmentation: how consistent are patterns in species richness and nestedness?. **Phil Trans R Soc B**, v.366, 3265-3276, 2011.

HUGHES, J.; MACDONALD, D. W. A review of the interactions between free-roaming domestic dogs and wildlife. **Biological Conservation**, v.157, 341-351, 2013.

JOHNSON, P. T. J.; THIELTGES, D. W. Diversity, decoys and the dilution effect.: how ecological communities affect disease risk. **The Journal of Experimental Biology**, v. 213, 961-970, 2010.

KEESING, F.; HOLT, R. D.; OSTFELD, R. S. Effects of species diversity on disease risk. **Ecol. Lett.** v. 9, 485-498, 2006.

KEESING, F.; BELDEN, L. K. DASZAK, P.; DOBSON, A.; HARVELL, C. D.; HOLT, R. D.; HUDSON, P.; JOLLES, A.; JONES, K. E.; MITCHELL, C. E.; MYERS, S. S.; BOGICH, T.; OSTFELD, R. S. Impacts of biodiversity on the emergence and transmission of infectious diseases. **Nature**, v.468, 647-652, 2010.

KILPATRICK, A. M. Globalization, land use and the invasion of West Nile Virus. **Science**, v. 334, n. 6054, 323-327, 2011.

LACERDA, A. C. R.; TOMAS, W. M.; MARINHO-FILHO, J. Domestic dogs as na edge effect in the Brasília National Park, Brazil: interaction with native mammals. **Animal Conservation**, v.12, 477-487, 2009.

LAMBIN, E. F.; TRAN, A.; VANWAMBEKE, S. O.; LINARD, C.; SOTI, V. Pathogenic landscapes: Interactions between land, people, disease vectors and their animal hosts. **International Journal of Health Geographics**. v.9, n. 54, 2010.

MAPBIOMAS – Coleção versão 4.1 da Série Anual de Mapas de Cobertura e Uso de Solo do Brasil, acessado em 20-07-2010 através do link: <https://mapbiomas.org>.

MCCALLUM, H. “Chapter 5: Landscape structure, Disturbance and Disease Dynamics”. In: **Infectious Disease Ecology: Effects of Ecosystems on Disease and of Disease in Ecosystems**. Edited by OSTFELS, R. S.; KEESING, F.; EVINER, V. T. Princeton: Princeton University Press, 100-122, 2008.

MCGARIGAL, K.; CUSHMAN, S. A.; ENE, E. FRAGSTATS v4: Spatial Pattern Analysis Program for Categorical and Continuous Maps. Computer software program produced by the authors at the University of Massachusetts, Amherst. Available at the following web site: <http://www.umass.edu/landeco/research/fragstats/fragstats.html>. 2012.

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**, 1283-1300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; SCHWARCZ, K.; BAJAY, M. M.; BAJAY, S. K.; PINHEIRO, J. P.; ZUCCHI, M. I.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Characterization of genetic variability and population structure of the tick *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.53, n.4, 843-850, 2016.

OSTFELD, R. S.; KEESING, F. The function of biodiversity in the ecology of vector-borne zoonotic diseases. **Can J Zoo**, v.78, 2061-2078, 2000.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in Cell Culture from the Tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v.1078, 523-529, 2006.

PONGSIRI, M. J.; ROMAN, J.; EZENWA, V. O.; GOLDBERG, T. L.; KOREN, H. S.; NEWBOLD, S. C.; OSTFELS, R. S.; PATTANAYAK, S. K.; SALKELD, D. J. Biodiversity loss affects global disease ecology. **BioScience**, v.59, n.11, 2009.

PRIST, P. R.; MUYLEAERT, R. L.; PRADO, A.; UMETSU, F.; RIBEIRO, M. C.; PARDINI, R.; METZGER, J. P. Using different proxies to predict Hantavirus disease risk in São Paulo State, Brazil. *Oecologia Australis*, v.21, n.1, 42-53, 2017.

RIBEIRO, M.C.; MARTENSEN, A.C.; METZGER, J.P.; TABARELLI, M.; SCARANO, F.; FORTIN, M.J. The Brazilian Atlantic Forest: A Shrinking Biodiversity Hotspot. In: ZACHOS, F.; HABEL, J. (eds) **Biodiversity Hotspots**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2011.

RIBEIRO, S. E.; PREVEDELLO, J. A.; DELCIELLOS, A. C.; VIERA, M. C. Edge effects and geometric constraints: a landscape-level empirical test. **Journal of Animal Ecology**, v.85, 97-105, 2016.

RIBEIRO, F.R.; 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**, 1-14, 2018.

REED, R. A.; JOHNSON-BARNARS, J.; BAKER, W. L. Fragmentation of a forested Rocky Mountain landscape, 1950-1993. **Biological Conservation**, v.75, 267-277, 1996.

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.

TABARELLI, M. ; AGUIAR, A. V.; RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; PERES, C. A. Prospects for biodiversity conservation in the Atlantic Forest: Lessons from aging human-modified landscapes. **Biological Conservation**, v.143, 2328-2340, 2010.

VANAK, A. T.; GOMPPER, M. E. Interference competition at the landscape level: the effect of free-ranging dogs on a native mesocarnivore. **Journal of Applied Ecology**, v.47, 1225-1232, 2010.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos no presente estudo demonstram que a preservação de ecossistemas e da biodiversidade, é importante não só do ponto de vista ecológico para conservação de espécies, mas também do ponto de vista da Saúde Pública. A fragmentação da floresta Atlântica em decorrência das ações do homem, em conjunto com a alta densidade de cães susceptíveis e com acesso irrestrito às áreas de mata, aumentam a chance de parasitismo por carrapatos da espécie *A. aureolatum*, e conseqüentemente as chances de ocorrência de casos de FMB na RMSP. Sendo assim, políticas públicas focadas nessas populações e na preservação dos remanescentes de floresta devem ser prioridade dos serviços de vigilância epidemiológica e da secretaria de meio ambiente.

A FMB mostra que, a abordagem da Saúde Única, é o melhor caminho para a prevenção deste agravo, uma vez que se baseia na interação entre Saúde humana, animal e do ambiente. Notadamente, as áreas endêmicas para FMB apresentam condições de elevada perturbação ambiental que favorecem as populações de cães domésticos, espécie invasora que oferece risco à saúde humana por atuarem como hospedeiros e amplificadores do agente etiológico da doença para o vetor.

O enfoque multidisciplinar garante uma visão ampla e detalhada dos principais pontos que envolvem a dinâmica da doença permitindo que possam ser precocemente detectados, investigados e, quando possível, eliminados ou amenizados de forma a garantir melhores condições de saúde para a população.

ANEXO A – Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE
SUPERINTENDÊNCIA DE CONTROLE DE ENDEMIAS
"SUCEN"



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da competência de cães domésticos como hospedeiros amplificadores da bactéria *Rickettsia rickettsii* para carrapatos *Amblyomma aureolatum* e modelagem espacial ecológica preditiva para ocorrência de Febre Maculosa Brasileira no Estado de São Paulo e Avaliação sorológica de cães em áreas endêmicas para Febre Maculosa no Litoral do Estado de São Paulo.", protocolada sob o CEUA-SUCEN No. 0003, sob a responsabilidade de **Adriano Pinter dos Santos** que envolve um experimentos realizados de forma paralela com experimentação em ambiente de laboratório co uso de cães e cobaias e coleta de sangue de cães semi-domiciliados, com apresentação de termo de esclarecimento e consentimento 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 avaliado em reunião em 02/08/2019 e **aprovada ad hoc** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da SUCEN, após o proponente adequar o protocolo de pesquisa. O protocolo de pesquisa como descrito no projeto foi também aprovado pelo CEUA-FMVZ-USP.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **08/2019** a **08/2022**

Mogi Guaçu, 03 de setembro de 2019

Adriano Pinter dos Santos

Med. Veterinário

Pesquisador Científico VI

Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

ANEXO B – Dados de ocorrência de *Amblyomma aureolatum* no Estado de São Paulo

MUNICÍPIO	ESPÉCIE	LONGITUDE	LATITUDE
AMPARO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.7977	-22.7014
ARAÇARIGUAMA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.05	-23.4333
ARAÇOIABA DA SERRA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.61	-23.5
ARAÇOIABA DA SERRA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.6507	-23.5443
ARUJÁ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.3167	-23.3839
ARUJÁ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.3187	-23.3861
ARUJÁ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.3408	-23.3456
ATIBAIA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5493	-23.118
ATIBAIA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5854	-23.1249
ATIBAIA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5866	-23.1238
ATIBAIA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6242	-23.0158
BARUERI	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.8761	-23.5106
BIRITIBA-MIRIM	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.0206	-23.6246
BOM JESUS DOS PERDÕES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.45	-23.1333
BOM JESUS DOS PERDÕES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4653	-23.135
CABREÚVA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.1165	-23.2993
CAJAMAR	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.8769	-23.3561
CAMPO LIMPO PAULISTA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.7836	-23.2002
CAMPOS DO JORDÃO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-45.5833	-22.734
CAPÃO BONITO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.3489	-24.0058
COTIA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.9164	-23.6004
COTIA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.9192	-23.6039
DIADEMA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.62302	-23.66134
DIADEMA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.62635	-23.66118
DIADEMA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.62759	-23.73308
ELDORADO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.25555	-24.291666
ELDORADO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.2701	-24.3104
EMBU	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.8522	-23.6489
EMBU-GUAÇU	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.8114	-23.8322
GUARULHOS	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4543	-23.4031
IBIÚNA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.2147	-23.8028
IBIÚNA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.22	-23.65
IBIÚNA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.2258	-23.6569
IPERÓ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.575	-23.4348
IPERÓ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.68	-23.35
IPORANGA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.408333	-24.309444
IPORANGA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.413333	-24.304444
IPORANGA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.414722	-24.274722
IPORANGA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.415277	-24.316111
IPORANGA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.423055	-24.274444

ITAPECERICA DA SERRA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.8492	-23.7169
ITAPECERICA DA SERRA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.8584	-23.7375
ITATIBA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.83	-23
ITU	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.2833	-23.25
ITU	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.2843	-23.3077
JUNDIAÍ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.882	-23.1829
JUNDIAÍ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.9125	-23.1951
JUQUITIBA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.0667	-23.9167
LORENA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-45.0596	-22.7943
MAIRIPORÃ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5599	-23.3177
MAIRIPORÃ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5849	-23.3152
MAIRIPORÃ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5867	-23.3186
MAIRIPORÃ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5908	-23.3114
MAIRIPORÃ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6225	-23.4139
MAUÁ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.45074	-23.69815
MAUÁ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.48670	-23.70825
MAUÁ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.48678	-23.70019
MOGI DAS CRUZES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.17097	-23.66090
MOGI DAS CRUZES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.1727	-23.5145
MOGI DAS CRUZES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.1842	-23.6486
MOGI DAS CRUZES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.1843	-23.4763
MOGI DAS CRUZES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.1849	-23.5707
MOGI DAS CRUZES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.1883	-23.5228
NAZARÉ PAULISTA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4472	-23.2478
PIEDADE	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.42	-23.71
QUELUZ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-44.79887	-22.46939
RIBEIRÃO GRANDE	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-48.35	-24.0833
RIBEIRÃO PIRES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.3983	-23.7009
RIBEIRÃO PIRES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4133	-23.7106
RIBEIRÃO PIRES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4296	-23.6814
RIBEIRÃO PIRES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.45602	-23.70807
RIBEIRÃO PIRES	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4696	-23.7388
SALESÓPOLIS	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-45.8333	-23.5167
SALESÓPOLIS	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-45.8424	-23.5802
SANTA ISABEL	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.2214	-23.3156
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4765	-23.73703
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.2994	-23.7777
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.3	-23.7833
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.3044	-23.7781
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.3092	-23.7932
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.406028	-23.769997
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4733	-23.7454
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4767	-23.7353
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.50706	-23.73254
SANTO ANDRÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5178	-23.7461

SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.512	-23.8579
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5132	-23.8248
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.51896	-23.75127
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5461	-23.7866
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5498	-23.8134
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5501	-23.7875
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5511	-23.7894
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5801	-23.7733
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5802	-23.7729
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5834	-23.7712
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.58848	-23.72843
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.59684	-23.77420
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.59988	-23.76263
SÃO BERNARDO DO CAMPO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6247	-23.7394
SÃO JOSÉ DOS CAMPOS	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-45.93117	-22.89647
SÃO LOURENÇO DA SERRA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.9356	-23.8527
SÃO LOURENÇO DA SERRA	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.9425	-23.8525
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4308	-23.5736
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.4642	-23.5736
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.5199	-23.4957
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6097	-23.5869
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6215	-23.6590
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6333	-23.5333
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6362	-23.719565
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6375	-23.4375
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.63765	-23.71906
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6411	-23.7185
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6469	-23.6505
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.688	-23.9324
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6937	-23.9219
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.6945	-23.9355
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.7027	-23.916
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.707	-23.9248
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.7218	-23.5651
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.7267	-23.5806
SÃO PAULO	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-46.7364503	-23.7044664
SÃO ROQUE	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.0831	-23.55
SÃO ROQUE	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-47.1088	-23.5495
TAUBATÉ	<i>Amblyomma aureolatum</i>	-45.5458	-23.0134

ANEXO C – Currículo Lattes (Orientador)



Adriano Pinter dos Santos

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/8887338916442663>

ID Lattes: 8887338916442663

Última atualização do currículo em 11/09/2021

Possui graduação em Medicina Veterinária e Zootecnia pela Universidade de São Paulo (2000), mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses pela Universidade de São Paulo (2003) e doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses pela Universidade de São Paulo (2007). Atualmente é pesquisador científico V da Superintendência de Controle de Endemias. Tem experiência na área de Parasitologia, com ênfase em Ixodologia e epidemiologia da febre maculosa brasileira, atuando principalmente nos seguintes temas: *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma aureolatum*, *Rickettsia rickettsii*, biologia molecular e ecologia de doenças transmitidas por carrapatos (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome Adriano Pinter dos Santos
Nome em citações bibliográficas PINTER, ADRIANO; PINTER, A.; PINTÉR, ADRIANO
Lattes ID  <http://lattes.cnpq.br/8887338916442663>

Endereço

Endereço Profissional Superintendência de Controle de Endemias, Superintendência, Departamento de Laboratórios Especializados,
 Av. Paula Souza, 166
 Centro
 01027-000 - São Paulo, SP - Brasil
 Telefone: (11) 33111177
 Fax: (11) 33111194
 URL da Homepage: <http://www.sucen.sp.gov.br>

Formação acadêmica/titulação

2003 - 2007 Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses (Concurso CAPES 6), Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
 Título: Aspectos Ecológicos da Febre Maculosa em uma área endêmica do Estado de São Paulo., Ano de obtenção: 2007.
 Orientador:  Marcelo Bahia Labruna.
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
 Palavras-chave: *Amblyomma aureolatum*; cão; Febre Maculosa; *Rickettsia rickettsii*; Mogi das Cruzes; Pyritolena.
 Grande Área: Ciências Biológicas
 Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Epidemiologia.
 Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
 Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas.
2001 - 2003 Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada Às Zoonoses (Concurso CAPES 6), Universidade de São Paulo, USP, Brasil.
 Título: Aspectos epidemiológicos da febre maculosa em um área endêmica do município de Mogi das Cruzes (SP) e estudos em laboratório do ciclo de vida do vetor *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae), Ano de Obtenção: 2003.
 Orientador: Marcelo Bahia Labruna.
 Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
 Palavras-chave: *Amblyomma aureolatum*; Febre Maculosa; *Rickettsia rickettsii*; Mogi das Cruzes; cão; *Rickettsia bellii*.
 Grande Área: Ciências da Saúde
 Grande Área: Ciências da Saúde / Área: Saúde Coletiva / Subárea: Saúde Pública.
 Grande Área: Ciências Biológicas / Área: Parasitologia / Subárea: Entomologia e Malacologia de Parasitos e Vetores.
 Setores de atividade: Cuidado À Saúde das Populações Humanas; Desenvolvimento Rural.
1995 - 2000

ANEXO D – Currículo Lattes (Doutoranda)



Claudia Araujo Scinachi

Endereço para acessar este CV: <http://lattes.cnpq.br/7280074272873900>

ID Lattes: 7280074272873900

Última atualização do currículo em 14/10/2021

Possui graduação em Medicina Veterinária pelo Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas (2010). Concluiu o Programa de Aprimoramento Profissional RUNDAP/SES/PAP, na área de Entomologia Médica e Soroepidemiologia pela Faculdade de Saúde Pública/USP, onde realizou estudos em biologia, ecologia e comportamento de insetos vetores de agentes infecciosos e epidemiologia das doenças transmitidas por vetores(2013). Possui Mestrado em Ciências pelo programa de Pós-Graduação em Saúde Pública da Faculdade de Saúde Pública/USP (2015). Cursando Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Saúde Pública/USP. Possui interesse pelas áreas de doenças transmitidas por vetores e soroepidemiologia. (Texto informado pelo autor)

Identificação

Nome	Claudia Araujo Scinachi
Nome em citações bibliográficas	SCINACHI, C. A.; SCINACHI, CLAUDIA A.; SCINACHI, CLAUDIA ARAUJO
Lattes ID	http://lattes.cnpq.br/7280074272873900

Endereço

Formação acadêmica/titulação

2017	Doutorado em andamento em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP/USP, Brasil. Orientador: Adriano Pinter dos Santos. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2013 - 2015	Mestrado em Saúde Pública. Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP/USP, Brasil. Título: Avaliação soroepidemiológica de animais sentinelas para a Febre Maculosa Brasileira e correlação com a fragmentação vegetal na periferia sul da região Metropolitana da Cidade de São Paulo, Ano de Obtenção: 2015. Orientador: Adriano Pinter. Bolsista do(a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, Brasil.
2012 - 2013	Aperfeiçoamento em Entomologia Médica e Soroepidemiologia. (Carga Horária: 2000h). Faculdade de Saúde Pública da Universidade de São Paulo, FSP/USP, Brasil. Título: Espécies de formas imaturas (Diptera: Culicidae) capturadas em 32 parques municipais da cidade de São Paulo. Ano de finalização: 2013. Orientador: Mauro Toledo Marrelli.
2006 - 2010	Bolsista do(a): Fundação de Desenvolvimento Administrativo, FUNDAP, Brasil. Graduação em Medicina Veterinária. Centro Universitário das Faculdades Metropolitanas Unidas, FMU, Brasil. Título: Aspectos Técnicos Operacionais da Vigilância Epidemiológica na Investigação de Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos. Orientador: Paula Andrea de Santos Bastos.

Formação Complementar

2020 - 2020	Semana de mobilização contra a Febre Maculosa Brasileira. (Carga horária: 3h). Superintendência de Controle de Endemias, SUCEN, Brasil.
2018 - 2018	Vigilância Entomológica da Doença de Chagas no Estado de São Paulo. (Carga horária: 3h). Universidade de São Paulo - Faculdade de Saúde Pública, FSP/USP, Brasil.