

UNIVERSIDADE DE SANTO AMARO

**Programa de Mestrado em Medicina Veterinária e Bem-
Estar Animal**

Andreza Sanchez Carvalho

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia*, EM
CÃES NOS MUNICÍPIOS DE CANANÉIA E ITAPEVA, ESTADO DE
SÃO PAULO, BRASIL**

São Paulo

2016

Andreza Sanchez Carvalho

**INQUÉRITO SOROLÓGICO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia*, EM
CÃES NOS MUNICÍPIOS DE CANANÉIA E ITAPEVA, ESTADO DE
SÃO PAULO, BRASIL.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-Estar Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Valeria Castilho Onofrio

São Paulo

2016

Andreza Sanchez Carvalho

INQUÉRITO SOROLÓGICO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia*, EM
CÃES NOS MUNICÍPIOS DE CANANÉIA E ITAPEVA, ESTADO DE
SÃO PAULO, BRASIL

Trabalho de Conclusão de Mestrado apresentado ao Programa de Medicina Veterinária e Bem-estar Animal da Universidade de Santo Amaro – UNISA, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária e Bem-estar Animal.

Orientador: Prof^a. Dr^a Valeria Castilho Onofrio

São Paulo, de de 2016

Banca Examinadora

Prof. Dr. Jonas Moraes Filho

Prof^a. Dr. Amalia Regina Mar Barbieri

Dedico ao meu filho Felipe Sanchez Carvalho, que é a minha vida.

Agradecimentos

Ao meu marido Fernando Dalbão Carvalho, que sempre está ao meu lado, e sempre me apoiou.

Aos meus pais Ana Maria Sanchez e Francisco Sanchez Fernandez, que sempre acreditaram que eu era capaz, e me fizeram acreditar nisso.

À Claudia Araujo Scinachi, que esteve ao meu lado e me ajudou durante toda a pesquisa dentro do laboratório. Ela foi meu anjo da guarda.

Ao Professor Doutor Adriano Pinter por ceder o espaço e o seu valioso conhecimento durante todo o processo de pesquisa.

E a Professora Doutora Valeria Castilho Onofrio, que me orientou e contribuiu com o seu conhecimento e serenidade em todas as etapas do meu mestrado.

Ao Professor Doutor Kleber da Cunha Peixoto Junior, coordenador do curso, sempre prestativo e atencioso em minhas demandas.

Resumo

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença infecciosa aguda, causada por bactérias pertencentes ao gênero *Rickettsia*. Os carrapatos são vetores para a maioria das espécies de *Rickettsia*. Na América do Sul, ela é transmitida principalmente por carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense*. No Brasil foram relatadas nove espécies de *Rickettsia*, sendo *Amblyomma sculptum* o principal vetor de *R. rickettsii* para humanos. O objetivo deste estudo foi investigar a soroprevalência de *R. rickettsii* e *R. parkeri* em cães nos municípios de Cananéia e Itapeva, SP, e sua relação com a fragmentação da vegetação nas proximidades das áreas urbanas. O sangue utilizado nesta pesquisa foi coletado de cães atendidos durante as campanhas de controle populacional de cães e gatos realizadas em ambos os municípios, mediante autorização prévia dos proprietários. Os soros obtidos dessas amostras foram testados para *R. rickettsii* e *R. parkeri* através da Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI). Foram analisadas um total de 186 amostras de soro provenientes dos dois municípios, sendo 81 amostras de Cananéia e 105 amostras de Itapeva, entre machos e fêmeas. No município de Cananéia, cinco amostras apresentaram reação positiva ao antígeno de *R. parkeri*, sendo uma delas positiva também para *R. rickettsii*, porém com um título pelo menos quatro vezes maior para a primeira, o que indica a circulação nessa área de alguma *Rickettsia* do grupo da febre maculosa com provável reação homóloga a *R. parkeri*. Já em Itapeva nenhuma das amostras apresentou reação para as riquetsias testadas, sendo consideradas todas negativas. Uma provável explicação para a ocorrência de soropositividade para o antígeno de *R. parkeri* nos cães de Cananéia, é o estreito contato entre as áreas florestadas e as habitações humanas, o que permite que os animais tenham livre acesso às áreas de mata e se infestem com carrapatos infectados com *Rickettsia*.

Palavras-chave: *Rickettsia*, carrapatos, sorologia, Cananéia, Itapeva.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição temporal e geográfica dos municípios com casos confirmados de febre maculosa brasileira por ano, de acordo com município. Estado de São Paulo, no período de 1985 a 2011 13
- Figura 2.** Cananéia área urbana, raio de 2Km com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno da cidade 37
- Figura 3.** Cananéia área urbana, com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno da cidade e das bordas de contato entre floresta e domicílios 37
- Figura 4.** Cananéia, área urbana e vila de São Paulo Bagre 38
- Figura 5.** Cananéia vila de São Paulo Bagre, raio de 2Km com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno da localidade 38
- Figura 6.** Cananéia vila de São Paulo Bagre, raio de 2Km com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno da localidade e das bordas de contato entre floresta e domicílios 39
- Figura 7.** Cananéia vila de São Paulo Bagre, imagem aproximada com detalhe das bordas de contato entre floresta e domicílios 39
- Figura 8.** Itapeva bairro Santa Maria, raio de 2Km 40
- Figura 9.** Itapeva bairro Santa Maria, raio de 2Km com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno do bairro 40

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Número de cães investigados no estudo, distribuídos por idade e município de procedência 35
- Tabela 2** - Cães positivos na reação de imunofluorescência indireta para os antígenos de *Rickettsia* testados e seu provável antígeno homólogo 36
- Tabela 3** – Áreas florestadas e soroprevalência de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa nos municípios de Cananéia e Itapeva, SP 41

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
1.1	Febre Maculosa Brasileira	11
1.2	Agente Etiológico	13
1.2.1	<i>Rickettsia rickettsii</i>	15
1.2.2	<i>Rickettsia parkeri</i>	15
1.3	Vetor	16
1.3.1	<i>Amblyomma aureolatum</i>	17
1.3.2	<i>Amblyomma ovale</i>	18
1.3.3	Complexo <i>Amblyomma cajennense</i>	18
1.3.4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	19
1.4	Hospedeiros	20
1.5	Prevenção	21
1.6	Diagnóstico laboratorial	22
1.7	Estudo de paisagem	23
1.8	Possibilidades de ocorrência de patógenos em animais dos municípios de Cananéia e Itapeva, SP	25
2	OBJETIVOS	27
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Áreas de estudo	28
3.1.1	Cananéia, SP	28
3.1.2	Itapeva, SP	28
3.2	Amostragem	29
3.3	Coleta das amostras	29
3.4	RIFI	30
3.5	Estudo de paisagem	31
4	RESULTADOS	33
4.1	Reação de Imunofluorescência Indireta	34
4.2	Áreas de estudo – Paisagem e soroprevalência	36
5	DISCUSSÃO	42
5.1	Áreas de estudo – Paisagem e soroprevalência	42
6	CONCLUSÃO	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
	Anexo A	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Febre Maculosa Brasileira

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença infecciosa aguda, que causa febre elevada, cefaleia, mialgia intensa, prostração e exantema máculo-papular que pode evoluir para petéquias, equimoses e hemorragias. ^(1, 2)

Identificada pela primeira vez nos Estados Unidos no final do século XIX, foi denominada como Febre Maculosa das Montanhas Rochosas, devido a sua maior incidência ocorrer nos Estados americanos cortados pela cadeia de Montanhas Rochosas. Em 1906, Howard Taylor descreveu o agente etiológico, a *Rickettsia rickettsii*, e o principal vetor de transmissão, o carrapato. ⁽³⁾

No início da década de 1950, na Europa, houve relatos recorrentes de quadro clínico de tifo exantemático epidêmico, em sua grande maioria, ocorridos em refugiados de guerra originários do leste europeu, vale ressaltar que, não houve nenhuma confirmação laboratorial que pudesse validar os relatos clínicos da época. ⁽⁴⁾

No Brasil, o primeiro relato de uma riquetsiose ocorreu em 1929, e ficou conhecido pelo nome de “typho exanthemático de São Paulo”. A distribuição dos casos concentrou-se em uma área de grande expansão urbana e que hoje engloba os bairros de Sumaré, Perdizes e Pinheiros, na cidade de São Paulo. A FMB tornou-se uma doença relevante em saúde pública a partir de 1980, onde se observou um aumento do número de casos e uma expansão da área de transmissão. ⁽⁵⁾

Neste período ocorreram casos da doença em municípios localizados próximos as bacias hidrográficas dos rios Atibaia, Jaguari e Camanducaia, bem como na região do Vale do Jequitinhonha, no Estado de Minas Gerais. ⁽⁵⁾

No ano de 2001, a FMB foi incluída como uma das doenças de notificação compulsória no Brasil, e foram registrados mais casos da doença em outros Estados como Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e mais recentemente Distrito Federal, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. ⁽⁵⁾

Inicialmente, as áreas de transmissão da FMB eram consideradas aquelas tipicamente rurais e silvestres. Hoje com o crescimento populacional e a expansão territorial a transmissão vem ocorrendo também em áreas periurbanas e urbanas. Baseando-se nos sistemas de notificação e vigilância epidemiológica do Estado de São Paulo, é possível verificar grande expansão territorial dos casos humanos da doença, ao longo das últimas décadas nesta região (Figura 1), padrão este que se repete em todo o país. Não obstante, os ambientes de maior risco continuam sendo as áreas de pastagens, matas ciliares e regiões de coleções hídricas, principalmente se houver a presença de animais como equinos e capivaras. ⁽⁵⁾

A maioria dos casos de febre maculosa se concentra na Região Sudeste, isso coincide com a incidência do maior vetor e reservatório da doença o carrapato *Amblyomma sculptum*, conhecido também como carrapato estrela. Na região Sudeste ainda pode se relacionar com a doença os carrapatos das espécies *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma dubitatum*. ⁽³⁾

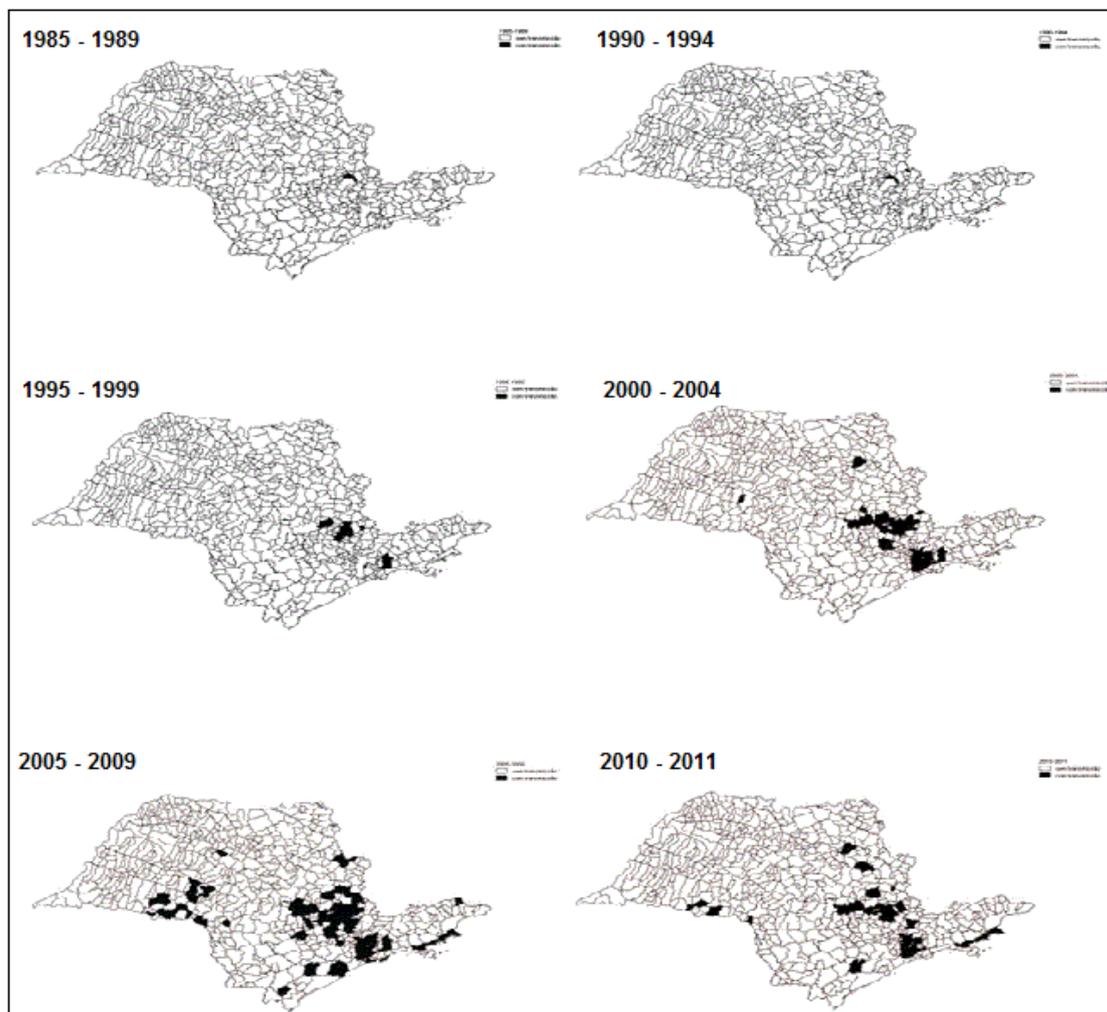
É importante levar em consideração a sazonalidade da incidência da doença, que está relacionada com o aumento da atividade dos carrapatos do complexo *Amblyomma* no seu ambiente, promovendo assim um maior contato com os seres humanos, geralmente nos meses de junho a outubro. ⁽³⁾

No Brasil as taxas de mortalidade estão em torno de 20 a 30%, isso se dá em função das dificuldades encontradas para o diagnóstico e para estabelecimento de uma terapia apropriada. ⁽³⁾

Entre os anos de 1985 e 2013 foram registrados 557 casos de febre maculosa no Estado de São Paulo, com letalidade de 40,39%, num total de 225 óbitos. ⁽⁶⁾

Entre os anos de 2007 e 2016, segundo dados do CVE-SES-SP, foram confirmados 554 casos de Febre Maculosa no Estado de São Paulo, sendo um deles para a cidade de Cananéia no ano de 2015. ⁽⁷⁾

Figura 1. Distribuição temporal e geográfica dos municípios com casos confirmados de febre maculosa brasileira por ano, de acordo com município. Estado de São Paulo, no período de 1985 a 2011.



Fonte: Suplemento BEPA 2011

1.2 Agente Etiológico

As bactérias causadoras da FMB pertencem ao gênero *Rickettsia*. Originalmente foi considerada como um vírus, por não possuir vida extracelular, por não poder ser isolada em meio artificial e pela ausência de sistemas enzimáticos. Atualmente, o gênero *Rickettsia* é classificado como uma proteobactéria, que são bactérias gram-negativas, pleomórficas, pequenas,

com 0,3 a 0,5 µm de diâmetro e 0,8 a 2,0 µm de comprimento. São de vida intracelular obrigatória, localizando-se no citoplasma e/ou no núcleo das células infectadas. (4, 5, 8)

As espécies de *Rickettsia* são divididas em três grupos, que são classificados através de padrões antigênicos, moleculares e ecológicos. São eles: a) grupo do tifo (GF), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii*, transmitida por piolhos, e *Rickettsia typhi*, transmitida por pulgas; b) grupo da febre maculosa (GFM) formado por mais de 20 espécies, incluindo aquelas que causam agravos ao homem, a grande maioria transmitida por carrapatos, com exceção de *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari* que são transmitidas por pulgas e ácaros, respectivamente; c) grupo basal, composto pelas espécies *R. monteiroi*, *R. belli* e *R. canadensis*, de patogenicidade desconhecida. (9, 10, 11)

Na América Latina foram relatadas pelo menos nove espécies de *Rickettsias*, *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, “*Candidatus R. amblyommii*”, “*Candidatus R. andeanae*”, *R. felis*, *R. typhi*, *R. monteiroi* e *R. belli*. (12)

Em seres humanos algumas espécies com patogenicidade desconhecida, se mostraram patogênicas nas últimas décadas, como a *R. slovaca*, *R. aeschlimannii*, *R. massiliae*, *R. monacensis* e a *R. parkeri*, principalmente na Europa. (9)

No Brasil quatro espécies foram relatadas como patogênicas para seres humanos, *R. rickettsii*, *R. typhi*, *R. parkeri*, *R. felis*. Os principais relatos sobre a transmissão desses agentes ocorreram principalmente na região sudeste do Brasil e no sul do Estado da Bahia. (13)

Os carrapatos são reservatórios e vetores para a maioria das espécies de *Rickettsia*. As bactérias se mantêm nas populações de carrapatos por transmissão transovariana e sobrevivem transestadialmente, este mecanismo é importante para a manutenção da sobrevivência da espécie em uma determinada população de carrapatos, que se torna amplificada quando estes picam e infectam seus hospedeiros vertebrados susceptíveis, sendo então posteriormente transmitidas para novos carrapatos (no período de ricketsemia).

Todavia, espécies de *Rickettsia* podem também ser deletérias ao carrapato, como é o caso de *R. rickettsii*. No hospedeiro humano, infectam principalmente as células endoteliais. Nos carrapatos, são encontradas nas glândulas salivares e ovários. ^(5, 14, 15, 16)

1.2.1 *Rickettsia rickettsii*

É a mais patogênica das espécies de *Rickettsia*, apresentando uma taxa de letalidade que varia de 20 até 80%, em casos não tratados. Já foi relatada no Canadá, Estados Unidos, Costa Rica, Panamá, México, Colômbia, Brasil e Argentina. ^(11, 13) No Brasil ela foi descrita pela primeira vez na década de 20, pelo pesquisador José Toledo Piza, e recebe o nome de Febre Maculosa Brasileira (FMB). ⁽¹⁷⁾

Na América do Sul, é transmitida principalmente por carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense*. No Brasil, *Amblyomma sculptum* é o principal vetor para humanos. Na região metropolitana de São Paulo, a espécie *Amblyomma aureolatum*, que parasita canídeos silvestres e cães domésticos em seu estágio adulto, é incriminado nas áreas de transmissão. ^(18, 19, 20)

1.2.2 *Rickettsia parkeri*

Na década de 30 o entomologista R.R. Parker relatou pela primeira vez o isolamento de uma bactéria na Costa do Golfo – Texas (USA) que ocorreu em carrapatos da espécie *Amblyomma maculatum*. Posteriormente essa bactéria foi caracterizada como uma rickettsiose e designada como *R. parkeri*. ⁽²¹⁾

No Uruguai foram feitos relatos recentes de *R. parkeri* em carrapatos da espécie *A. triste*, onde há registros de picada desse carrapato em humanos. ⁽²²⁾

Na região sudeste do Brasil, recentemente casos de uma nova rickettsiose em humanos foram relatados na literatura. O agente etiológico é a *Rickettsia sp.* cepa Mata Atlântica, geneticamente relacionada com *R. parkeri*, e o carrapato *Amblyomma ovale* a espécie transmissora. Há isolado da bactéria em cultura de células, a partir de carrapatos *A. ovale*, provenientes de áreas com caso humano. ^(23, 24)

1.3 Vetor

Carrapatos são artrópodes ectoparasitas pertencentes à classe Arachnida, com distribuição mundial, e podem parasitar uma ampla variedade de vertebrados terrestres, entre eles anfíbios, répteis, aves e mamíferos. Os carrapatos são hematófagos obrigatórios, e se alimentam em seus hospedeiros por meio de peças bucais adaptadas que perfuram e penetram na pele. Conseguem permanecer fixados no hospedeiro por dias ou até semanas, secretam saliva que impede a coagulação sanguínea e as reações de defesa do organismo no local da fixação. A saliva possui substâncias que induzem a vasodilatação no local facilitando assim a ingestão de sangue e a transmissão dos patógenos. ⁽²⁵⁾

No mundo já foram descritas mais de 900 espécies de carrapatos, que são divididos em 3 diferentes famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. No Brasil, são conhecidas 66 espécies de carrapatos, sendo 32 pertencentes ao gênero *Amblyomma*. ^(26, 27, 28)

Os carrapatos da família Ixodidae possuem a maioria das espécies de interesse médico veterinário, sendo caracterizados por uma fase parasitária curta com uma fase de vida livre longa. O período de vida livre engloba as fases de postura de ovos, incubação e muda, podendo esse período de vida livre variar de meses a anos. O período de fase parasitária consiste em poucos dias ou semanas para alimentação, englobando as fases de larvas, ninfas e fase adulta. Possuem grande capacidade de permanecer um longo período em jejum (meses até anos), até acharem um hospedeiro adequado. Neste período, a atividade metabólica das glândulas salivares, intestino, órgãos reprodutivos, sistema excretor e o sistema circulatório ficam em níveis mais baixos do que o período de alimentação, garantindo assim a sua sobrevivência. ^(18, 25)

A Febre Maculosa é causada por diversas espécies de carrapatos nos diferentes lugares onde existe a doença. Nos Estados Unidos as espécies de carrapato que transmitem a doença são *Dermacentor andersoni* (parte oriental do país) e *Dermacentor variabilis* (parte ocidental do país). A espécie *Rhipicephalus sanguineus* tem sido considerado o principal vetor da doença no

México, junto com o *Amblyomma cajennense*. No Panamá e na Colômbia o vetor principal também tem sido considerado o *A. cajennense*. Na Costa Rica o vetor é ainda desconhecido. No Brasil, houve alguns relatos independentes de *Rhipicephalus sanguineus* infectados naturalmente por *R. rickettsii* em áreas endêmicas do sudeste do país, mas o principal vetor da doença são os carrapatos do gênero *Amblyomma*.^(29,30)

Estes dados confirmam a participação de diversas espécies de carrapatos em diferentes áreas geográficas demonstrando a complexidade da ecologia da *R. rickettsii*.⁽³⁰⁾

1.3.1 *Amblyomma aureolatum*

Dentre os carrapatos encontrados no Brasil 30% são do gênero *Amblyomma*. O carrapato da espécie *A. aureolatum*, em sua fase adulta é o parasita mais comum dos cães em áreas rurais da região sul e do sudeste do Brasil. Nas suas fases imaturas pode utilizar hospedeiros de algumas espécies de roedores e aves.^(5, 31)

Essa espécie é um carrapato de três hospedeiros, está associado principalmente a habitat úmido com temperatura subtropical mais frias, por isso é facilmente encontrado em regiões de Mata Atlântica com altitudes elevadas, porém pode ser encontrado no nível do mar na Região Sul do Brasil.⁽²⁴⁾

Existem alguns relatos desta espécie *Amblyomma aureolatum* no nordeste da Argentina e no Paraguai. Em algumas áreas do Estado de São Paulo, principalmente na região metropolitana da cidade de São Paulo, este carrapato tem sido o principal vetor do agente causador da FMB.^(5, 31)

Em testes laboratoriais ficou provado que o *A. aureolatum* é mais susceptível a infecções por *Rickettsia* do que *A. sculptum*, sendo mais eficiente na perpetuação trasestadial e na transmissão transovariana.⁽²⁴⁾

1.3.2 *Amblyomma ovale*

Existem relatos dessa espécie na região da Mata Atlântica, principalmente na região sul-sudeste do Brasil. Dentro das áreas que foram

estudadas, este carrapato foi encontrado na sua forma adulta parasitando cães que viviam em áreas próximas a zonas rurais. Nessas regiões também há relatos de picadas em humanos. ⁽²⁴⁾

Em condições naturais o *A. ovale* é um dos carrapatos encontrados parasitando cães, enquanto os roedores são os principais hospedeiros para a sua forma imatura. ⁽²⁴⁾

Apesar de possuir uma ampla distribuição, incluindo Pantanal, Região Amazônica, Mata Atlântica e Cerrado, a *Rickettsia* foi associada apenas com os exemplares encontrados na Mata Atlântica. ⁽²⁴⁾

1.3.3 Complexo *Amblyomma cajennense*

Um estudo recente, realizado através de análises morfológicas, biológicas e moleculares, dividiu a espécie considerada como *Amblyomma cajennense* que ocorria desde o Sul dos EUA até o norte da Argentina, em seis espécies válidas, são elas: *A. cajennense stricto sensu*, restrito a região Amazônica; *A. mixtum*, encontrado do Texas ao oeste do Equador; *A. sculptum*, encontrado no norte da Argentina, Bolívia, Paraguai, Brasil; *A. interandinum*, localizado no vale Interandino no Peru; *A. tonelliae*, áreas secas do norte da Argentina, Bolívia e Paraguai; e *A. patinoi*, nos Andes da Colômbia. ⁽³²⁾

Com esta nova classificação o complexo *A. cajennense* está representado no Brasil por duas destas espécies *A. cajennense* e *A. sculptum*, separadas morfológicamente apenas através da análise da abertura genital das fêmeas. A sua distribuição dentro do Brasil ainda está incompleta, necessitando mais coletas em diferentes regiões e exame de material depositado em coleções. ⁽³²⁾

O complexo *Amblyomma cajennense* possui distribuição em quase todo o Continente Americano, sendo encontrado frequentemente em bovinos e equinos. Nas fases imaturas possui uma menor especificidade parasitária, podendo ser encontrado em aves domésticas, aves silvestres, mamíferos e animais de sangue frio. ⁽⁵⁾

O ciclo biológico deste carrapato necessita de três hospedeiros para completa-lo, podendo ficar no solo por até seis meses sem se alimentar. As constantes alterações do meio ambiente e do manejo das espécies domésticas, com o aumento da população dos animais, das pastagens e, conseqüentemente, da oferta do alimento contribuíram para o aumento da população desta espécie. ⁽⁵⁾

No Brasil, a espécie *A. sculptum* vem sendo associada como o vetor mais comum da *R. rickettsii*, bactéria causadora da FMB. No Estado de São Paulo, é encontrada geralmente em áreas rurais, sendo considerada como uma das principais espécies que infestam seres humanos. ⁽³³⁾

1.3.4 *Rhipicephalus sanguineus*

O *R. sanguineus* é conhecido como o carrapato vermelho dos cães, possui uma ampla distribuição cosmopolita e já foi relatado em quase todo o continente americano. No Brasil sua distribuição é principalmente nas regiões com grandes populações de aglomerados urbanos. Não é encontrado em regiões florestais. ⁽³⁰⁾

É um carrapato de três hospedeiros que se alimenta principalmente no cão, podendo também se alimentar de seres humanos. ⁽³⁴⁾

Essa espécie de carrapato é o vetor conhecido da *R. rickettsii* no México e nos Estados Unidos. Na América do Sul este carrapato não tem a mesma projeção que no México e nos Estados Unidos, ou seja, o seu papel ecológico na transmissão dessa bactéria não é significativo. ⁽³⁰⁾

Em estudos experimentais já foi relatado que a *R. rickettsii* é transmitida para este carrapato de forma transovariana e transestadial, mas em condições naturais as taxas de infecção são muito baixas possivelmente porque, como demonstrado experimentalmente, a *R. rickettsii* é patogênica para esta espécie de carrapato. ⁽²⁹⁾

No Brasil a transmissão de *R. rickettsii* para humanos por esta espécie de carrapato ainda não está comprovada, mas existem relatos do encontro de

exemplares naturalmente infectados com essa bactéria. Muitos cães andam livremente entre as áreas urbanas e naturais e possuem um convívio próximo com humanos. Sob tais condições o *R. sanguineus* pode se alimentar em cães previamente ou concomitantemente parasitados pelas espécies *A. cajennense* e *A. aureolatum* que podem estar infectados. ⁽²⁴⁾

1.4 Hospedeiros

Os principais hospedeiros de *A. sculptum* são o cavalo e a capivara, embora esta espécie seja generalista e pode parasitar diversos vertebrados terrestres, entre aves, répteis e mamíferos. Está amplamente distribuída na região Sudeste do Brasil. ^(24, 35)

O carrapato *A. aureolatum* parasita carnívoros silvestres em seu estágio adulto, sendo comumente encontrado em cães domésticos com acesso a áreas de ocorrência da espécie. Os estágios imaturos parasitam roedores e aves passeriformes. Ocorre no bioma Mata Atlântica, sobretudo em áreas de altitude. ⁽³¹⁾

Os hospedeiros preferenciais do carrapato *A. ovale* são semelhantes aos citados para *A. aureolatum*, e o cão doméstico também é ocasionalmente parasitado, quando acessa áreas florestadas. É comumente encontrado na Mata Atlântica, embora ocorra em áreas de menor altitude, como aquelas em regiões costeiras. ⁽³⁶⁾

Os cães são importantes hospedeiros para o carrapato *R. sanguineus*, já que são a sua principal fonte de alimentação. ⁽³⁴⁾

A importância do cão na Febre Maculosa é estudada no mundo desde 1930, onde se demonstrou que esses animais podem adquirir a *Rickettsia* a partir do carrapato *R. sanguineus* infectado e passar para outros carrapatos. No Brasil, estudos demonstraram que alguns dos cães infectados apresentaram sinais clínicos como anorexia, febre e letargia, sugerindo que a

Rickettsia é patogênica para cães, podendo esses animais permanecer com titulação alta por até seis meses. ^(12,37)

1.5 Prevenção

Segundo a SUCEN, algumas medidas podem ajudar a prevenir a contaminação da doença, a principal medida é evitar o contato com carrapato, principalmente quando se conhece as áreas endêmicas. Evitar caminhar em áreas infestadas por carrapatos, no meio rural e silvestre e quando necessário, utilizar barreiras físicas como calças com a parte inferior por dentro de botas e sempre vistoriar o corpo em busca dos carrapatos. ⁽⁵⁾

Não esmagar carrapatos com unhas, para evitar a liberação da bactéria que tem capacidade de penetrar por microlesões na pele; e retirar o carrapato com calma, torcendo levemente. ⁽⁵⁾

Outra maneira de se evitar a doença é com a eliminação dos vetores e dos animais reservatórios. Para eliminação dos vetores a maneira mais eficaz é a utilização de carrapaticidas diminuído assim a população de carrapatos. ⁽³⁸⁾

A eliminação de reservatórios é um problema maior para ser resolvido, já que em sua maioria são representados por roedores silvestres ou por animais de convívio próximo ao homem. ⁽³⁸⁾

1.6 Diagnóstico laboratorial

Existem vários métodos de diagnóstico utilizados para a confirmação da FMB, que podem ser diretos ou indiretos e que podem apresentar reações cruzadas com outras doenças, tais como: dengue, leptospirose, entre outras. ⁽⁵⁾

É preciso estabelecer o teste que seja mais confiável e que possua a maior sensibilidade e especificidade. ⁽⁵⁾

O Teste de Weil e Felix é de fácil execução e de baixo custo. A reação detecta anticorpos aglutinantes no soro que está infectado reagindo com diferentes cepas ou espécies de *Proteus*. Cada espécie possui um antigênico semelhante aos lipopolissacarídeo das membranas das diferentes espécies de *Rickettsias*. Este teste não é o de escolha, devido às inúmeras reações cruzadas que podem ocorrer por não se utilizar um antígeno específico, tornando assim este teste de baixa sensibilidade. ⁽³⁹⁾

A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é um dos métodos sorológicos mais utilizado para o diagnóstico das rickettsioses, sendo este considerado o método padrão por utilizar como antígeno a *Rickettsia* a se diagnosticar, e o mais disponível na rotina laboratorial. Esta é a prova recomendada pela OMS. ^(1, 39)

A RIFI é considerada uma reação de alta sensibilidade e especificidade, podendo ser utilizada para identificar imunoglobulinas específicas das classes de IgM e IgG. ⁽¹⁾ Em conjunto ao diagnóstico utilizam-se fatores epidemiológicos tais como áreas geográficas, época do ano e os vetores presentes. ⁽³⁹⁾

Outros testes sorológicos já foram utilizados para o diagnóstico de rickettsioses, tais como, Provas de aglutinação, ELISA e teste de Western-blot, onde todos recorrem a métodos que podem alterar a antigenicidade do microorganismo, por isso são poucos escolhidos. ⁽³⁹⁾

O PCR em tempo real é utilizado desde 2010 para casos fatais de FMB em que a sorologia foi negativa ou com títulos menores que 128. ⁽⁵⁾ É um exame em que ocorre uma reação baseada na replicação do DNA com iniciadores específicos para o agente que se quer detectar, sendo possível amplificar um fragmento de DNA do patógeno caso ele esteja presente na amostra clínica. ⁽⁵⁾

A histopatologia e imunohistoquímica é o exame realizado em amostras obtidas para biópsias de pele com lesões retiradas de pacientes. Pode-se

também fazer de amostras de material obtido em necropsia das regiões de pulmão, fígado, baço, coração, rim, músculos e cérebro. ⁽⁵⁾ Os achados mais comuns são infiltrados linfomononuclear até quadros de intensa vasculite leucocitoclástica. ⁽⁵⁾ Esse teste é considerado sensível para a confirmação da FMB na fase inicial da doença. ⁽⁵⁾

1.7 Estudo de Paisagem

Algumas pesquisas demonstram que a paisagem pode ser um fator determinante na transmissão de alguns patógenos. A alteração do ambiente tem levado ao aumento e a dispersão de alguns vetores e de algumas espécies que servem de reservatório a agentes patogênicos para o homem e para os animais. ⁽⁴⁰⁾

Uma das alterações ambientais mais observadas são as fragmentações de florestas ocorridas devido ao aumento de atividades antrópicas, que causaram a divisão de grandes extensões de florestas em áreas menores causando perdas de habitats naturais para algumas espécies e aumento de algumas bordas perto áreas urbanas. Outra consequência dessa fragmentação ambiental é o surgimento de doenças infecciosas, já que esse processo pode levar ao aumento do contato dos agentes patogênicos com seus vetores e seus hospedeiros. ^(41, 42)

É importante observar essas áreas de extensas fragmentações ambientais, para uma melhor conservação da biodiversidade das espécies. Geralmente as florestas tropicais suportam uma maior biodiversidade com um grande número de espécies endêmicas. ⁽⁴¹⁾

Alguns autores ressaltam a importância das interações dentro de comunidades ecológicas, controlando assim a transmissão de doenças. E ainda sugerem que a perda de muitas populações e espécies de organismos, associada a perda de biodiversidade, pode ser um dos motivos para o aumento das doenças. ⁽⁴³⁾

O aumento da população foi a grande responsável pela invasão de áreas de matas para a utilização dessas regiões para agricultura, modificando assim o ecossistema e clima. Sistemas de informações geográficas, controles de sensoriamento remoto e a computação remota fornecem novas ferramentas para a avaliação dessas áreas fragmentadas, podendo avaliar os conceitos relativos à paisagem em relação a epidemiologia das doenças transmitidas por vetores. O surgimento da ecologia da paisagem como uma ciência leva ao estudo de patógenos em paisagens específicas. ⁽⁴⁴⁾

A Mata Atlântica hoje possui uma área remanescente florestal de 8,5% com áreas acima de 100 hectares do que existia originalmente. Somados os fragmentos acima de 3 hectares temos uma área de 12,5%. Essas áreas possuem uma rica biodiversidade e é uma das mais ameaçadas do planeta. Com base em dados de 2014 vivem na Mata Atlântica quase 72% da população brasileira, onde são mais de 145 milhões de pessoas em 3429 municípios. São mais de 20 mil espécies de plantas, sendo 8 mil endêmicas e mais de 2200 espécies de animais entre mamíferos, aves, répteis, anfíbios e peixes. ⁽⁴⁵⁾

1.8 Possibilidades de ocorrência de patógenos em animais dos municípios de Cananéia e Itapeva, SP

O município de Cananéia, por sua localização, apresenta uma interação de aglomerados urbanos com biomas ainda preservados como o mangue, vegetação de restinga, floresta subtropical, propiciando o contato da população humana e de animais domésticos com a vida silvestre. Pesquisadores têm discutido essa relação em outras regiões brasileiras onde foram relatados casos de zoonoses e de doenças de animais domésticos resultantes dessa interação. ^(46, 47, 48)

Cananéia está inserida numa Região conhecida como Vale do Ribeira, região com bolsões de extrema pobreza, onde ainda se pode encontrar aldeias indígenas e quilombolas, além de um fluxo constante de turistas que procuram o local para o lazer como a pesca, praias e contato intenso com a natureza.

Itapeva possui bairros, em sua maioria humildes, situados na periferia da cidade e também em áreas rurais mais distantes, sendo que alguns estão localizados próximos a áreas florestadas.

Assim como em Cananéia, também existem quilombos localizados em áreas muito distantes onde a população e os animais de estimação vivem em estreito contato com a natureza. Itapeva possui uma área de preservação (Estação Ecológica) que tem em seu entorno, áreas urbanizadas representadas por agrovilas.

As circunstâncias acima citadas para estes municípios propiciam o contato entre animais silvestres, domésticos e o homem, e conseqüentemente, a transmissão de patógenos entre eles. Além das zoonoses já conhecidas, há doenças potencialmente compartilhadas entre animais silvestres e animais domésticos, particularmente carnívoros; seja conseqüente à ação de vetores, fômites ou por predação, podendo comprometer a fauna e, portanto, colocar em risco a biodiversidade local. ^(49, 50, 51,52)

Estes fatos tornam o cão doméstico (*Canis familiaris*) um potencial indicador da saúde da fauna local servindo como evento sentinela para ocorrência de infecções e infestações. Outro fator que torna o cão um animal fundamental para esse conjunto de observações é o fato do mesmo acompanhar o homem em tarefas como agricultura e extrativismo.

2. OBJETIVOS

Com o intuito de investigar a soroprevalência de *R. rickettsii* e *R. parkeri* em cães nos municípios de Cananéia e Itapeva, SP, e sua relação com a fragmentação da vegetação nas proximidades as áreas urbanas, o presente estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- Realizar inquérito sorológico para *R. rickettsii* e *R. parkeri*, no sangue coletado de cães participantes de campanhas de castração nos municípios de Cananéia e Itapeva, SP.
- Comparar a soroprevalência com o perfil paisagístico das áreas de estudo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Áreas de estudo

3.1.1 Cananéia, SP

A cidade de Cananéia (25°00'54"S 47°55'37"W - Altitude de 8m – Área de 1244,5 km²) está situada no extremo sul do litoral do Estado de São Paulo. Localizada no centro de um corredor biológico de 110 km que se estende desde a foz do Rio Ribeira em Iguape (SP) até a baía de Paranaguá (PR), sendo considerado um dos maiores berçários de vida marinha do planeta e um dos últimos redutos da Mata Atlântica. ⁽⁵³⁾

Também conhecida como região lagunar-estuarina de Cananéia (Lagamar) é considerada pela UNESCO como um Patrimônio Natural da Humanidade, por possuir uma série de rios, baía e lagoas que desembocam no mar, compreendendo, num único lugar, quatro ecossistemas: mangues, restingas, dunas e a Mata Atlântica. ⁽⁵⁴⁾

3.1.2 Itapeva, SP

Itapeva (23°58'56"S 48°52'32"W – Altitude de 684m – Área de 1830,9 Km²) é um município da região sul/sudoeste do Estado de São Paulo. Possui uma área de 1.889 km², sendo o 2º maior município do estado em área. Está inserida numa região de transição dos ecossistemas de Mata Atlântica e Cerrado, com ambientes diversificados compostos de florestas, campos rupestres, cerrados, rios, lageados e cachoeiras. ⁽⁵⁵⁾

Encontra-se em sua área administrativa, e na dos municípios de Itaberá e Nova Campina a Estação Ecológica de Itapeva, criada para proteger amostras de ecossistemas de cerrado, campo-cerrado e campo, importantes para a reprodução de animais e nidificação de aves ameaçadas de extinção.

3.2 Amostragem

O sangue utilizado nesta pesquisa foi coletado dos cães atendidos durante as campanhas de controle populacional de cães e gatos realizadas nos municípios de Cananéia e Itapeva, Estado de São Paulo. Essas campanhas fazem parte de uma parceria entre a Universidade de Santo Amaro (extensão universitária) e as prefeituras destes municípios. No caso de Itapeva também faziam parte das atividades do Projeto Rondon SP.

As coletas foram realizadas durante algumas das campanhas que ocorreram nos municípios: Cananéia, dezembro de 2013; Itapeva, junho/julho de 2014 e janeiro de 2015. A colheita do sangue dos animais foi realizada mediante autorização dos proprietários com a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que incluía um questionário com informações sobre hábitos e cuidados com o animal (Anexo A).

Foi coletado um total de 186 amostras das duas cidades, sendo 81 amostras de Cananéia, entre machos e fêmeas, e 105 amostras de Itapeva entre machos e fêmeas.

Também foram colhidos os carrapatos encontrados nos cães estudados, utilizando amostragem por conveniência ou acidental.

O projeto de sorologia para *Rickettsia* em cães é parte de outros dois maiores, desenvolvidos juntamente com os programas de castração realizados nas duas cidades. Ambos aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Santo Amaro (CEUA-UNISA n° 35/2012 e n° 19/2014).

3.3 Coletas das amostras

As amostras de sangue dos cães foram obtidas assepticamente por venopunção da veia cefálica, utilizando-se seringa e agulha descartáveis, sendo em seguida transferidas para tubos secos, sem anticoagulante, que

foram identificados, acondicionados e deixados em repouso, a temperatura ambiente, para permitir a coagulação do sangue.

O soro obtido foi separado e transferido para microtubos plásticos (1,5ml), os quais foram etiquetados e estocados em congelador a -20°C até o momento da execução do teste sorológico.

Os carrapatos foram visualizados e coletados manualmente no momento da sedação dos animais, sendo em seguida acondicionados em frascos plásticos contendo álcool etílico absoluto para posterior identificação em laboratório. A identificação dos espécimes, com o auxílio de estereomicroscópio Leica *MZ12*, foi realizada no Laboratório Especial de Coleções Zoológicas (LECZ) do Instituto Butantan, com a utilização de chaves dicotômicas e por comparação com espécimes depositados na Coleção Acarológica do Instituto Butantan (IBSP). Exemplares representativos dos carrapatos coletados serão ainda tombados em coleção zoológica.⁽⁵⁶⁾

3.4 RIFI

Células infectadas por *R. rickettsii* e *R. parkeri* (cepa AT24 do isolamento de *A. triste* do Estado de São Paulo) foram cultivadas no Laboratório da SUCEN Mogi (Superintendência de Controle de Endemias – Secretária de Saúde do Estado de São Paulo), da suspensão obtida foi colocado a dosagem de dez microlitros em cada orifício da lamina, a secagem ocorreu em um fluxo laminar e após a secagem foi fixado em acetona por 10 minutos. Essas lâminas ficaram armazenadas em -20°C até o momento do uso.

O preparo das lâminas foi feito no Laboratório da SUCEN Pinheiros. Na primeira etapa do trabalho, os soros foram preparados para a análise com três microlitros do soro diluídos em 189 microlitros de PBS com pH de 7,4 e colocadas em estufa a 37°C . Depois foram submergidas para lavagem em PBS por 15 minutos. A seguir foi aplicado o conjugado de anticorpo de IgG de cão, onde foi deixado por mais 30 minutos em estufa à 37°C . As laminas foram lavadas por submersão em PBS + Azul de Evans (corante) por 15 minutos.

Após a secagem das lâminas elas foram montadas para leitura com duas gotas de glicerina tamponada e cobertas por lamínula. A leitura foi feita em microscópio de fluorescência sob luz ultravioleta com objetiva de 40 vezes.

Na segunda etapa, as lâminas que demonstraram possível positividade na diluição de 1/64, foram novamente analisadas. Para cada amostra foi realizada a diluição de dosagem máxima e colocados dez microlitros de soro contendo antígeno específico para *Rickettsia*, incubada por 30 minutos à 37°C em câmara úmida. Depois foi seguido o mesmo processo da primeira etapa para a aplicação do conjugado, coloração e montagem das lâminas.

A leitura foi feita em microscópio de fluorescência, sob luz ultravioleta, com objetiva de 40 vezes, no Laboratório da SUCEN Luz.

3.5 Estudo de paisagem

Em cada uma das três áreas selecionadas para o estudo, imagens de satélite foram geradas por meio do aplicativo Google Earth e Google Earth Pro (Satélite Landsat, data de passagem em outubro de 2012), sendo esse mesmo aplicativo utilizado para o cálculo das métricas.

Para cada localidade, um raio de 2km foi delimitado a partir da borda da área ocupada, levando em conta o local de residência dos cães selecionados para o estudo. O raio calculado, baseia-se no fato de cães percorrerem uma distância máxima de 2km entre o local onde vivem, e o interior dos fragmentos de mata que visita. ⁽⁵⁷⁾

A fragmentação florestal foi o parâmetro central que norteou a seleção das variáveis de paisagem utilizadas no estudo, dado que o processo de fragmentação depende de uma série de fatores para sua ocorrência. As variáveis selecionadas estão descritas a seguir:

Área de floresta 2km: Quantidade de floresta, em hectares, com influência sobre os cães do estudo, situados dentro do raio delimitado. Fragmentos dentro do raio de 2km, e com pequenas distâncias entre si

(máximo de 100m) também foram incluídos no cálculo, pois apesar de não haver uma conexão estrutural (física) entre os fragmentos, há uma conexão funcional entre eles, ou seja, os cães são capazes de acessar esses fragmentos.

Perímetro de borda: Perímetro total dos fragmentos de floresta, em quilômetros.

Borda de contato entre floresta e casas: Consiste na borda de contato direto entre floresta e casas (casas isoladas ou grupo de casas), pois esse contato facilita o acesso dos cães a mata. A área de contato direto entre borda de floresta e casas é parte da variável borda funcional (contato com casas e pequenas estradas ou ruas) que por sua vez, é parte da variável de perímetro de borda (borda de floresta total).

4 RESULTADOS

Do total de 186 amostras de sangue coletadas em cães atendidos em campanhas de castração realizadas nos dois municípios estudados, 81 foram provenientes de Cananéia, (29 machos e 52 fêmeas), e 105 de Itapeva (41 machos e 64 fêmeas). Em ambas as localidades, verificou-se uma proporção maior de fêmeas que de machos.

Os resultados observados quanto ao sexo e idade dos animais não refletem dados reais de ocorrência dos animais nas duas cidades, pois os cães amostrados foram somente aqueles atendidos em campanhas de controle populacional onde geralmente a clientela maior é de fêmeas e animais jovens no início da maturidade sexual.

A idade média dos animais nas duas cidades é de um a três anos, sendo que o maior número de animais atendidos estava na faixa de um ano de idade. Em Cananéia o animal mais novo tinha três meses e em Itapeva quatro, enquanto em ambos os municípios, os animais mais velhos tinham 10 anos (Tabela 1). Na cidade de Cananéia 6,17% dos proprietários não souberam informar a idade dos animais, e na cidade de Itapeva 19,04%.

No município de Cananéia, os cães avaliados eram procedentes de diferentes bairros: Nova Cananéia, Candairo, Vigorelli, Rocio, Aracau, Carijó, Morro São João, Morro São João 2, e uma vila distante da área urbana, chamada São Paulo Bagre (Figuras 2, 4). Já em Itapeva, todos os animais eram procedentes de um único bairro chamado Santa Maria (Figura 8).

Na campanha realizada em Cananéia, em dezembro de 2013, foram coletados 138 carrapatos, sendo 53 machos, 48 fêmeas, 15 ninfas e 22 larvas, todos pertencentes à espécie *R. sanguineus*.

Em Itapeva, em junho/julho de 2014, foram coletados 77 carrapatos, sendo 28 machos, 25 fêmeas e 24 ninfas. Em julho de 2015, foram encontrados um total de 60 exemplares, 30 machos, 21 fêmeas e 9 ninfas. Todos os espécimes coletados em ambas as campanhas realizadas nesse município, foram identificados como *R. sanguineus*.

4.1 Reação de Imunofluorescência Indireta

Todas as amostras analisadas foram testadas para os antígenos de *R. rickettsii* e *R. parkeri*.

Uma segunda análise dessas amostras compatíveis resultou em cinco reações positivas frente ao antígeno de *R. parkeri* e uma ao de *R. rickettsii* no município de Cananéia, enquanto as amostras de Itapeva não demonstraram reação em nenhuma das diluições, sendo assim considerada todas negativas.

Somente uma das amostras apresentou positividade para ambas as espécies de *Rickettsia*, apresentando um título pelo menos quatro vezes maior para *R. parkeri* e, assim como para as outras quatro amostras, indicando alguma *Rickettsia* do grupo da febre maculosa com provável reação homóloga a *R. parkeri*. (Tabela 2).

No município de Cananéia, os cães com reações positivas aos antígenos de *R. parkeri*, foram provenientes dos bairros de Acaraú, Rocio, Nova Cananéia, Carijó e São Paulo Bagre.

Tabela 1 – Número de cães investigados no estudo, distribuídos por idade e município de procedência.

Idade	Cães		
	Cananéia	Itapeva	Total
3 meses	-	1	1
4 meses	2	2	4
5 meses	1	2	3
6 meses	6	2	8
7 meses	2	3	5
8 meses	3	3	6
10 meses	1	-	1
11 meses	2	3	5
1 ano	14	18	32
2 anos	12	10	22
3 anos	8	17	25
4 anos	6	9	15
5 anos	5	4	9
6 anos	5	3	8
7 anos	2	4	6
8 anos	4	1	5
9 anos	1	1	2
10 anos	2	2	4
Não Souberam Responder	5	20	25
Total	81	105	186

Tabela 2 - Cães sororreagentes na reação de imunofluorescência indireta para os antígenos de *Rickettsia* testados e seu provável antígeno homólogo.

Títulos de cães reagentes para antígenos de <i>Rickettsia</i>			
Amostra	<i>R. parkeri</i>	<i>R. rickettsii</i>	PAH (Provável antígeno homólogo)
Snopy 1009	512	64	<i>R. parkeri</i>
Jhully 386	512	-	<i>R. parkeri</i>
Suri 1013	256	-	<i>R. parkeri</i>
Fiona 335	256	-	<i>R. parkeri</i>
Toco 312	256	-	<i>R. parkeri</i>

4.2 Áreas de estudo - Paisagem e Soroprevalência

As imagens das áreas de estudo geradas por satélite (Landsat Google Earth), são apresentadas a seguir juntamente com suas métricas (Figuras 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9). Os mapas estão representando três áreas diferentes: duas em Cananéia, área urbana e vila São Paulo Bagre, e uma em Itapeva, Bairro Santa Maria.

Nos pontos amarelos das figuras 2,3,4,5,6,7,8,9 estão indicados a localização dos animais cujas amostras de sangue se mostraram sororreagentes.

Nas imagens apresentadas, em Cananéia (Figuras 2, 5, 6) o círculo vermelho correspondente ao raio de 2 km do local onde residem os animais, e em Itapeva (Figuras 8, 9) ao raio de 2 km do Bairro Santa Maria. A marcação em laranja correspondente ao perímetro de borda dos fragmentos de floresta no entorno das áreas estudadas, e a marcação em verde, as bordas de contato entre floresta e domicílios.

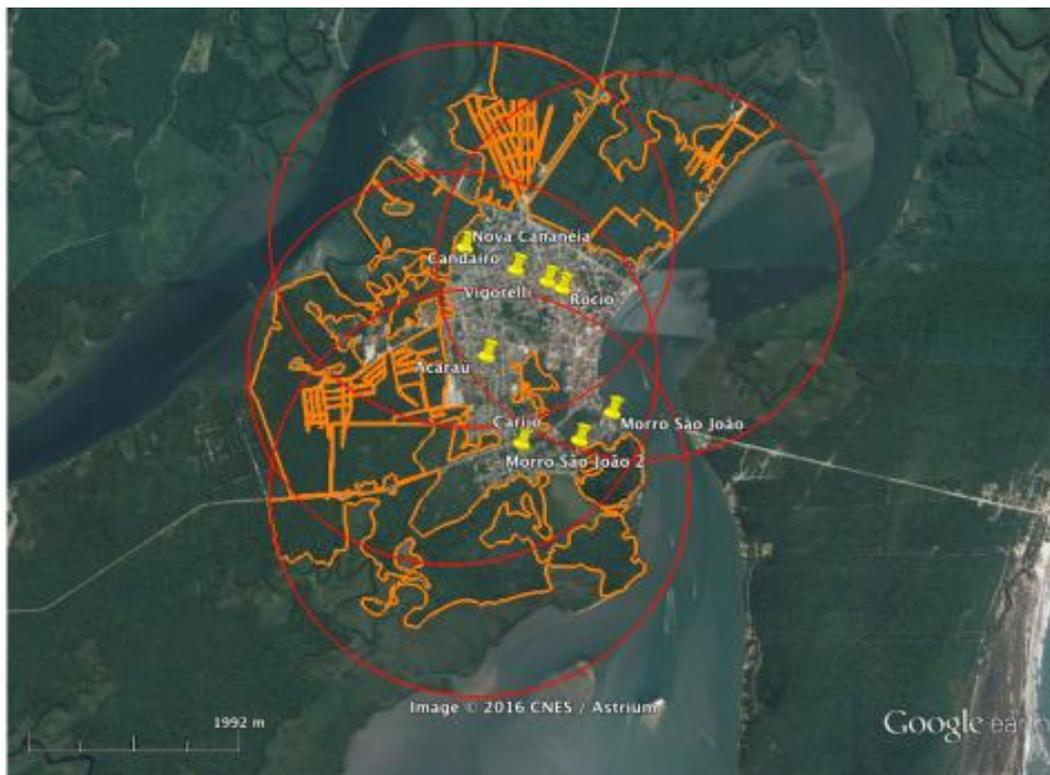


Figura 2. Cananéia área urbana, raio de 2Km com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno da cidade.

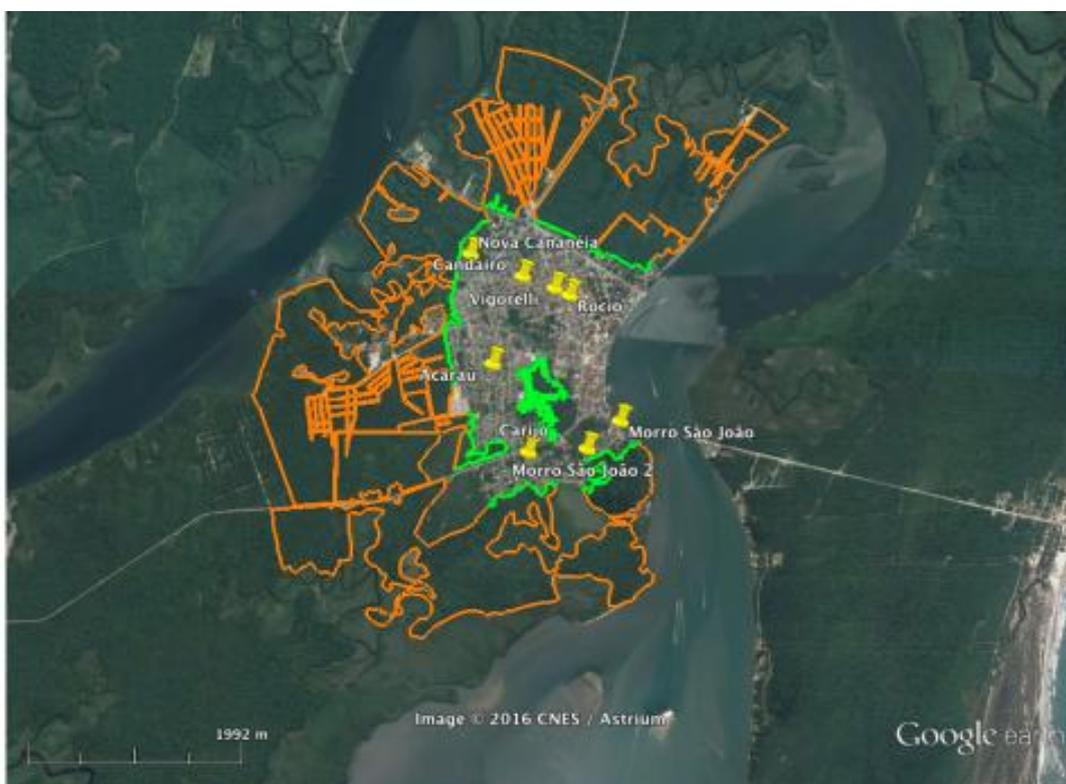


Figura 3. Cananéia área urbana, com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno da cidade e das bordas de contato entre floresta e domicílios.



Figura 4. Cananéia, área urbana e vila de São Paulo Bagre.



Figura 5. Cananéia vila de São Paulo Bagre, raio de 2Km com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno da localidade.



Figura 6. Cananéia vila de São Paulo Bagre, raio de 2Km com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno da localidade e das bordas de contato entre floresta e domicílios.



Figura 7. Cananéia vila de São Paulo Bagre, imagem aproximada com detalhe das bordas de contato entre floresta e domicílios.



Figura 8. Itapeva bairro Santa Maria, raio de 2Km.

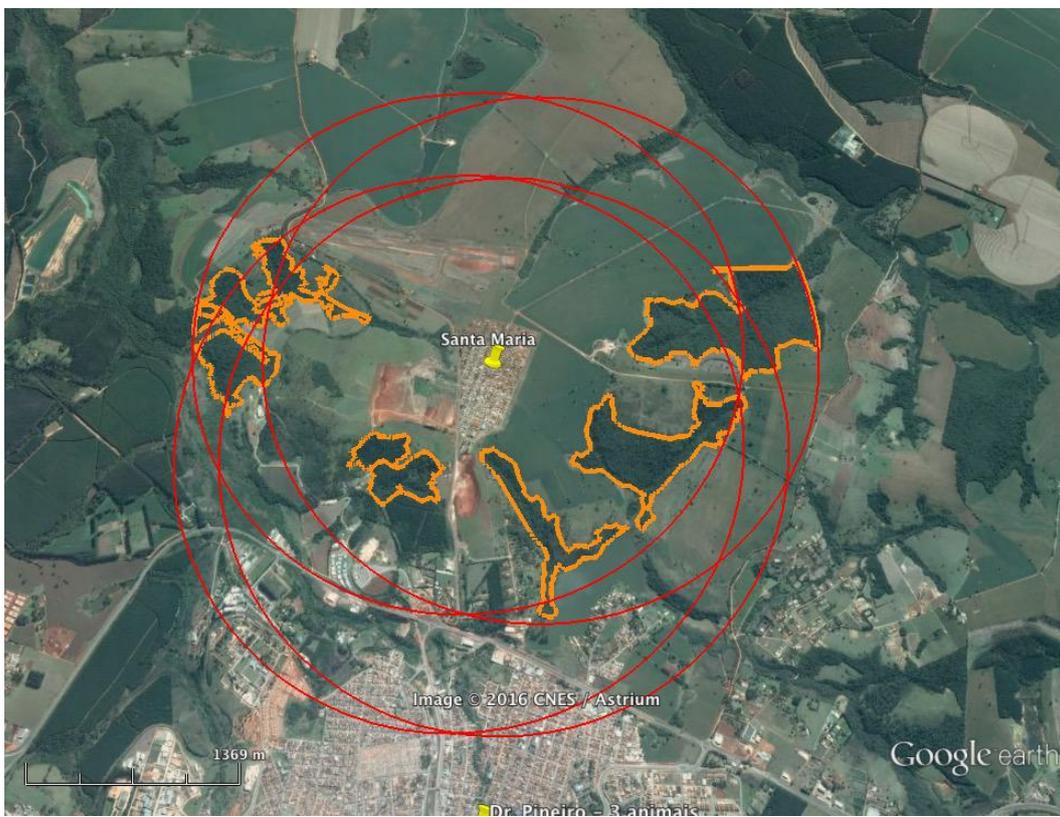


Figura 9. Itapeva bairro Santa Maria, raio de 2Km com detalhe dos fragmentos de floresta no entorno do bairro.

Com relação ao tamanho das áreas florestadas, enquanto Cananéia apresentou extensas áreas de floresta, no entorno da cidade e da vila de São Paulo Bagre (Figuras 2, 5), em Itapeva esses fragmentos eram bem menores e mais distantes das regiões urbanizadas (Figuras 8, 9) (Tabela 3).

Em Cananéia, a ocorrência de contato entre borda de floresta e casas demonstrou ser muito frequente, inclusive nas duas áreas que apresentaram amostras positivas com provável reação homóloga para *R. parkeri* (Figuras 3, 4, 6, 7). Já no município de Itapeva não foi constatado o contato da borda da floresta com as casas, uma vez que no Bairro Santa Maria não havia florestas próxima das casas em distâncias inferiores a 150 metros (Figura 9).

Em Cananéia, os valores de soroprevalência foram de 18,75% (4/77) no Centro e 25% (1/4) na vila de São Paulo Bagre, enquanto Itapeva apresentou valor igual à zero (Tabela 3). Apesar da positividade, como o número de animais amostrados na vila de São Paulo Bagre foi muito pequeno (4 cães), estatisticamente esse dado não é considerado representativo.

Tabela 3 – Áreas florestadas e soroprevalência de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa nos municípios de Cananéia e Itapeva, SP.

Localidades	Área Total de Floresta (ha)	Perímetro de borda de Floresta (km)	Perímetro de borda em contato com casas (km)	Soroprevalência
Itapeva	206,7	29,8	0	Zero
Cananéia (área urbana)	957,4	117,9	13,04	4/77 (18,75%)
Cananéia (São Paulo Bagre)	441,0	25,5	2,44	1/4 (25%)

5 DISCUSSÃO

O estreito convívio dos cães com seres humanos elevam as chances do compartilhamento de parasitas, tais como carrapatos, trazendo assim uma grande preocupação para a Saúde Pública. ⁽⁵⁸⁾ Ao se investigar a possibilidade do envolvimento de cães domésticos na epidemiologia da FMB, observa-se que eles podem atuar como sentinelas para essa doença, principalmente em locais onde a bactéria *R. rickettsii* é transmitida por carrapatos da espécie *A. aureolatum*, uma vez que cães com sorologia positiva têm sido frequentemente registrados em regiões endêmicas. ^(33, 58)

A sorologia em cães, com o objetivo de detectar a circulação de riquetsias, tem sido uma ferramenta comumente utilizada no Brasil, uma vez que cães podem ser parasitados por carrapatos de diferentes espécies, viver em estreito contato com o homem e serem encontrados no ambiente urbano e rural. ^(12, 33, 59, 60, 61)

O livre acesso dos cães do ambiente urbano para as áreas rurais ou florestadas possibilita o contato com outros animais domésticos e/ou selvagens, fazendo com que possam ser parasitados por carrapatos do gênero *Amblyomma*, como *A. aureolatum* e *A. ovale*, além de *R. sanguineus*. ⁽⁶²⁾

Exemplares de *R. sanguineus* e *A. ovale* foram encontrados se alimentando em um mesmo hospedeiro em uma área de Mata Atlântica, na Serra do Mar, estado de São Paulo. Dentre eles, um representante da primeira espécie e alguns da segunda estavam infectados com uma cepa de *Rickettsia*, que possui mais de 95% de similaridade com *R. parkeri*, denominada cepa Mata Atlântica. Segundo os autores, a infecção de *R. sanguineus* deve ter ocorrido através de “coalimentação” com algum exemplar infectado de *A. ovale*, que estava se alimentando no mesmo hospedeiro. ⁽³⁶⁾ O mesmo já tendo sido relatado em outras localidades de Mata Atlântica onde *R. sanguineus* também foi encontrado infectado com essa mesma cepa de *Rickettsia*. ^(60, 63)

Em uma região de Santa Catarina, área endêmica para Febre Maculosa, *A. aureolatum* e *A. ovale* foram encontradas infectadas com *Rickettsia* sp. cepa

Mata Atlântica. Porém, assim como em outros estudos, os autores notaram que a infecção em *A. aureolatum* por essa cepa de *Rickettsia* somente foi detectada em exemplares encontrados junto com *A. ovale* numa mesma população de cães.^(61, 63) O mesmo não acontecendo com esta última espécie de carrapato, que já foi encontrada infectada em áreas onde *A. aureolatum* não estava presente.^(36, 60, 63, 64)

Apesar de ter sido reportada pela primeira vez no ano de 2010, a *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, um dos agentes da riquetsiose humana, somente foi isolada em cultura celular no ano de 2013 de material proveniente de carrapatos da espécie *A. ovale* coletados no município de Peruíbe, sul do Estado de São Paulo^(23, 60). Baseado no que foi reportado até o momento, essa cepa de *Rickettsia* parece estar estreitamente relacionada a *A. ovale* e ter uma ampla distribuição nas áreas sul e sudeste da costa Atlântica brasileira.^(36, 60, 61, 63) Em algumas das áreas estudadas, onde os níveis de infestação de *A. ovale* com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica foram analisados, eles se apresentaram em torno de 10%.^(36, 60)

Alguns autores, a partir dos resultados encontrados em seus estudos epidemiológicos sobre a ocorrência de *Rickettsia* em algumas regiões do Brasil, sugerem que *A. ovale* seja o principal vetor da *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica no Estado de São Paulo. Porém não descartam a importância que outras espécies podem exercer como vetores, quando parasitando os mesmos hospedeiros que *A. ovale*.^(36, 60, 61)

Os cães avaliados no presente estudo foram encontrados parasitados somente por *R. sanguineus*, porém isso não exclui a possibilidade de que, em algum outro momento, esses animais tenham tido contato com outros carrapatos como *A. aureolatum* e *A. ovale*. Vetores reconhecidos de riquetsias do grupo da Febre Maculosa, os dois ocorrem primariamente em áreas rurais e/ou florestadas e tem os canídeos como hospedeiros preferencias no estágio adulto.^(29, 63) No Brasil, a Mata Atlântica é habitat preferencial dessas duas espécies, sendo que *A. ovale*, tem preferência por regiões de baixa altitude, como é o caso de Cananéia.⁽³⁶⁾

Um estudo utilizando cães infectados experimentalmente por uma cepa brasileira de *R. rickettsii* demonstrou que *R. sanguineus* possui competência vetorial e é capaz de realizar transmissão transovariana e perpetuação transtadial do agente. Para essa espécie de carrapato, a bactéria parece não ter o mesmo efeito deletério que tem para *A. aureolatum*, porém sem a transmissão horizontal, essa espécie provavelmente não consegue manter a bactéria circulante por sucessivas gerações. O que levou os autores a considerarem o cão como possível hospedeiro amplificador do agente para essa espécie de carrapato, uma vez que todos os estágios se alimentam nesse animal, facilitando a transmissão da bactéria. ⁽²⁹⁾

Apesar de, até o momento, não haver comprovação do papel de *R. sanguineus* na transmissão de riquetsias do grupo da Febre Maculosa no Brasil, o fato dessa espécie de carrapato já ter sido encontrada naturalmente infectada com *R. rickettsii*, de ter experimentalmente demonstrado competência vetorial e já ter sido descrita como um importante vetor dessa bactéria no México e EUA, deve ser levado em consideração nas pesquisas realizadas no país. ^(24, 29, 30, 34, 36, 63, 65, 66)

Há algum tempo, parâmetros de estrutura de paisagem vem sendo muito utilizados no entendimento da epidemiologia das doenças, que se tornam mais complexas quando há o envolvimento de agentes transmitidos por vetores. A dependência da interação entre patógenos, vetores, hospedeiros e o ambiente onde estão inseridos é a principal causa dessa complexidade.

A fragmentação vegetal é um processo complexo que pode influenciar a soroprevalência de determinadas espécies de *Rickettsia* em regiões periurbanas, pois as alterações no ambiente decorrentes desse processo facilitam a interação entre o agente patogênico, o vetor e seus hospedeiros.

No presente estudo, variáveis de paisagem foram comparadas a soroprevalência nos dois municípios para determinar a possível existência de relação entre elas. Uma das variáveis que mostrou ter influência na distribuição da soroprevalência foi a presença de áreas de floresta.

A ocorrência de cães com resultados positivos de soroprevalência para *Rickettsia* no município de Cananéia, possivelmente pode ser explicada pela existência de áreas de floresta maiores e pelo contato entre essas áreas e as casas localizadas nas regiões periurbanas. Esse cenário é favorável ao carrapato vetor, pois possibilita que ele parasite tanto os animais silvestres, quanto domésticos, uma vez que os cães podem ter livre acesso à mata. O mesmo não acontecendo em Itapeva, onde a soroprevalência foi zero, provavelmente devido a grande distância entre as áreas florestadas e as casas, que não permite o contato entre os animais desses dois ambientes distintos, e conseqüentemente, a transmissão do agente pelo vetor.

Cães domésticos têm atuado como espécie invasora e interagem com animais silvestres como predadores, presas, competidores, reservatórios e/ou transmissores de doenças e parasitas, que podem levar a reduções drásticas nas populações de mamíferos silvestres. Na Mata Atlântica, o tipo de manejo dos cães domésticos, criados soltos e com livre acesso ao interior da mata, faz com que a intensidade de invasão das áreas de mata por esses animais seja muito alta. ⁽⁶⁵⁾

Os autores de um estudo sobre a presença de cães em paisagens fragmentadas na Mata Atlântica verificaram que a densidade de cães nesses locais estava diretamente ligada a densidade de casas, enquanto que para animais silvestres a densidade estava relacionada à disponibilidade de área e de alimento. ⁽⁶⁷⁾

Com base nos dados observados no presente estudo, a ocorrência no município de Cananéia, de animais soropositivos ao antígeno de uma riquétisia do grupo da Febre Maculosa, parece depender não somente da presença de muitos domicílios e conseqüentemente disponibilidade de hospedeiros da bactéria, mas principalmente do contato entre as áreas de floresta e aquelas habitadas pelos animais domésticos e o homem. As variáveis área total de floresta, perímetro de borda e borda de contato entre domicílios e floresta mostraram variações importantes entre as diferentes áreas de estudo.

Em um estudo sorológico realizado com cães de um município da região Nordeste do Brasil, somente carrapatos da espécie *R. sanguineus* foram encontrados parasitando esses animais. As características ambientais da área, semiárido e caatinga, podem estar diretamente associados a ausência nessa localidade, das espécies de carrapato do gênero *Amblyomma* consideradas vetores da FMB. Todos os cães foram soronegativos para os antígenos de *Rickettsia* testados. ⁽¹³⁾

Assim como no estudo citado acima, somente carrapatos da espécie *R. sanguineus* foram encontrados parasitando os cães por nós investigados nos municípios de Cananéia e Itapeva. Porém, com o diferencial de que nas nossas investigações sorológicas, houve a ocorrência de alguns animais sororreativos ao antígeno de *R. parkeri* em Cananéia, enquanto em Itapeva, todos os animais foram soronegativos. O que nos leva a algumas considerações sobre a influência dos parâmetros ambientais nos resultados de soroprevalência deste estudo.

Apesar de somente terem sido encontrados exemplares de *R. sanguineus* parasitando os cães investigados nos dois municípios, isso não exclui a possibilidade de, em algum outro momento, esses animais terem tido contato com outras espécies de carrapato do gênero *Amblyomma*. Vetores reconhecidos de riquetsias do grupo da Febre Maculosa, *A. aureolatum* e *A. ovale* ocorrem primariamente em áreas rurais e/ou florestadas e tem os canídeos como hospedeiros preferencias no estágio adulto. No Brasil, dentre os habitats preferenciais de *A. ovale*, estão as áreas de Mata Atlântica de baixa altitude, enquanto *A. aureolatum* tem preferência pelas áreas de alta altitude. ^(36, 60)

A. ovale é um carrapato de ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado tanto na região Neotropical quanto na Neártica. No Brasil, ocorre em diferentes biomas como Amazônia, Pantanal, Cerrado e Mata Atlântica, sendo que neste último, há relatos de sul a sudeste da costa Atlântica ⁽⁶⁰⁾

Ainda que não haja registros do encontro de *A. ovale* em Cananéia, essa possibilidade não deve ser descartada, uma vez que a cidade está localizada

dentro de sua área de ocorrência, além de possuir altitude quase ao nível do mar e o do entorno da sua área urbana ser composto quase que exclusivamente por Mata Atlântica. Já em Itapeva, que está a mais de 600m de altitude e cuja área urbana está a uma grande distância das áreas florestadas, sem contato direto entre elas, a possibilidade do encontro dessa espécie de carrapato é muito remota.

Mesmo no caso de *A. aureolatum*, que tem preferência por altas altitudes, como em Itapeva, a grande distância entre as casas e a área florestada dificultaria muito o acesso do carrapato aos animais domésticos e ao homem. Assim, a possibilidade ou não da ocorrência de carrapatos do gênero *Amblyomma* nessas áreas, seria talvez uma explicação para a presença de cães sororreativos ao antígeno de *R. parkeri* em Cananéia e sua ausência em Itapeva.

Apesar de *A. aureolatum* e *A. ovale* serem conhecidas por parasitar o homem, a infestação humana por estas duas espécies aumenta quando os cães com livre acesso as áreas de floresta, se infestam na mata e trazem os carrapatos para casa. Casos como esse já foram reportados em áreas de Mata Atlântica onde há registros de infecção humana por *R. rickettsii* e *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica. ^(60, 64)

Em uma região de Santa Catarina, área endêmica para Febre Maculosa, onde *A. aureolatum* e *A. ovale* foram encontradas infectadas com *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, os cães que tinham contato frequente com áreas florestadas, eram mais sororreativos para essa cepa de *Rickettsia* do que aqueles que esporadicamente adentravam a mata. ⁽⁶¹⁾

O mesmo tendo sido relatado em estudo realizado anteriormente em uma área de Mata Atlântica no município de Peruíbe, SP, onde foi observada uma correlação significativa entre a soropositividade dos cães para *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, seu acesso a áreas florestadas e a infestação por *A. ovale*. Esta observação foi reforçada pelo encontro de exemplares de *A. ovale* infectados coletados na vegetação em trilhas localizadas dentro da floresta. ⁽⁶⁰⁾

Apesar de as amostras sororreagentes ao antígeno de *R. parkeri* não terem sido testadas para *Rickettsia* sp. Cepa Mata Atlântica e de os carrapatos coletados nos cães não terem sido analisados para a presença de riquetsias, o fato das áreas do presente estudo se localizarem no bioma onde a ocorre essa cepa e onde é frequente a ocorrência do *A. ovale*, principal incriminado na sua transmissão, levanta a suspeita de que *Rickettsia* sp. Cepa Mata Atlântica possa ser a riquetsia que esteja circulando no município de Cananéia. O que demonstra a necessidade de uma investigação mais aprofundada para confirmar qual *Rickettsia* está circulando na área e os carrapatos responsáveis pela sua transmissão, uma vez que esse patógeno é um dos agentes causadores da riquetsiose humana.

Os resultados desse estudo, juntamente com aqueles obtidos em uma avaliação soropidemiológica realizada na Região Metropolitana de São Paulo, indicam que a utilização de alguns parâmetros ambientais em conjunto com dados sobre a soroprevalência de riquetsias podem auxiliar na identificação de locais de maior ou menor risco para ocorrência dessas bactérias, levando em conta as características paisagísticas das áreas a serem estudadas. ⁽¹⁵⁾

6. CONCLUSÃO

- A presença de amostras soropositivas ao antígeno de *R. parkeri* testado, indicam a circulação nesse ambiente, de alguma *Rickettsia* do grupo da Febre Maculosa com provável reação homóloga a *R. parkeri*.
- Somente carrapatos da espécie *R. sanguineus* foram encontrados parasitando os cães.
- Ainda que não haja registros do encontro de *A. ovale* em Cananéia, essa possibilidade não deve ser descartada, uma vez que este município está localizado em área de Mata Atlântica.
- A soroprevalência de infecção em cães por *Rickettsia* do grupo da Febre Maculosa está associada a fragmentação vegetal nas áreas estudadas, influenciada negativamente pelo tamanho das áreas de mata e positivamente pelo perímetro de borda de contato entre floresta e residências.
- O fato de Cananéia estar no bioma Mata Atlântica, região de ocorrência de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica (próxima a *R. parkeri*) e onde é frequente o encontro de *A. ovale*, principal incriminado na sua transmissão, levanta a suspeita de que essa cepa de *Rickettsia* possa ser a que esteja circulando nesse município.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- Ministério da Saúde (Brasil), Secretária de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. 7ª edição. Brasília: 2009.
- 2- Angerami RN, Resende MR, Feltrin AC, Katz G, Nascimento EM, Stucchi RSB, Silva LJ. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from a Endemic Area in Southeastern Brazil – Clinical Aspects. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1078: 252-254.
- 3- Del Fiol FS, Junqueira FM, Rocha MCP, Toledo MI, Barberato Filho S. A febre maculosa no Brasil. *Revista Panamericana de Salud Publica*. 2010; 27(6): 461–466.
- 4- Galvão MAM, Silva LJ, Nascimento EMM, Calic SB, Souza R, Bacellar F. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. *Revista de Saúde Pública*. 2005; 39(5): 850-856.
- 5- Secretária de Estado da Saúde de São Paulo (Brasil). BEPA Suplemento – Febre Maculosa Brasileira. Volume 8, número1. São Paulo: 2011.
- 6- Internet. Acesso em: 14/07/2016. Disponível em: <http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/febre-maculosa/dados-estatisticos>
- 7- Internet. Acesso em: 14/07/2016. Disponível em: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/dados/fmaculosa/fmb0716_lpi.pdf
- 8- Soares HS, Barbieri ARM, Martins TF, Minervino AHH, Lima JTR, Marcili A, Gennari SM, Labruna MB. Ticks and rickettsial in the wildlife of two regions of the Brazilian Amazon. *Experimental and Applied Acarology*. 2015; 65(1): 125-140.

- 9- Labruna MB, Mattar S, Nava S, Bermudez S, Venzal JM, Dolz G, Abarca K, Romero L, Sousa R, Oteo J, Castro JZ. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. *Revista MVZ Córdoba*. 2011; 16(2): 2435-2457.
- 10- Labruna MB, Pacheco RC, Richtzenhain LJ, Szabó MPJ. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia belli* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007; 73(3): 869-873.
- 11- Parola P, Paddock CD, Raoult D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005; 18(4): 719-756.
- 12- Costa, FB. Soroepidemiologia e epidemiologia molecular das infecções por *Rickettsia* spp em cães e carrapatos de ambientes urbano e rural do Estado do Maranhão [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2014. 115p.
- 13- Tanikawa A, Costa FB, Labruna MB, Azevedo SS. A survey for rickettsial on *Rhipicephalus sanguineus* (Ixodida, Ixodidae) ticks in Northeastern Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2013; 50(5): 414-417.
- 14- Labruna MB. Carta Acarológica. XIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária & I Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 2004; 13(1): 199-202.
- 15- Scinachi CA. 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 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2015. 94p.
- 16- Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. In: *Annals of the New York Academy of Sciences Rickettsiology and Rickettsial Diseases-Fifth International Conference*. New York: New York Academy of Sciences; 2009. 10p.

- 17- Piza JT, Meyer JR, Gomes LS. Typho Exanthematico de São Paulo. São Paulo, 1932.
- 18- Saraiva DG, Hebert SS, Soares JF, Labruna MB. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. *Emerging Infectious Diseases*. 2014; 20(9): 1504-1510.
- 19- Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp., and *Amblyomma patinoi* n.sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2014; 5(2014): 252-276.
- 20- Pinter A, Labruna MB. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1078: 523-529.
- 21- Paddock CD, Sumner JW, Comer JA, Zaki SR, Goldsmith CS, Goddard J, et al. *Rickettsia parkeri*: a new recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clin Infect Dis*. 2004; 38: 812-813.
- 22- Silveira I, Pacheco RC, Szabó MPJ, Ramos HGC, Labruna MB. *Rickettsia parkeri* in Brasil. *Emerging Infectious Diseases*. 2007; 13(7): 1111-1113.
- 23- Spolidorio MG, Labruna MB, Mantovani E, Brandão P, Richtzenhain LJ, Yoshinari NH. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2010; 16: 521-523.
- 24- Szabó MPJ, Pinter A, Labruna MB. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2013; 3: 27p.
- 25- Governo do Estado de São Paulo. Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Manual de Vigilância Acarológica. Estado de São Paulo: Governo do Estado de São Paulo; 2004. 62p.

- 26- Guglielmone AA, Robins RG, Apanaskevich DA, Petney TN, Estrada-Peña A, Horak IG, et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*. 2010; 2528: 1-28.
- 27- Krawczak FS, Martins TF, Oliveira CS, Binder LC, Costa FB, Nunes PH, Gregori F, Labruna MB. *Amblyomma yucumense* n. sp. (Acari: Ixodidae), a Parasite of Wild Mammals in Southern Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 2015; 52(1): 28-37.
- 28- Barros-Battesti DM, Landulfo GA, Luz HR, Marcili A, Onofrio VC, Famadas KM. *Ornithodoros faccinii* n. sp. (Acari: Ixodida: Argasidae) parasitizing the frog *Thoropa miliaris* (Amphibia: Anura: Cycloramphidae) in Brazil. *Parasites & Vectors*. 2015; 8: 268.
- 29- Piranda EM, Faccini JLH, Pinter A, Pacheco RC, Cançado PHD, Labruna MB. Experimental Infection of *Rhipicephalus sanguineus* Ticks with the Bacterium *Rickettsia rickettsii*, Using Experimentally Infected Dogs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011; 11(1): 29-36.
- 30- Moraes-Filho J, Pinter A, Pacheco RC, Gutmann TB, Barbosa SO, Gonzáles MARM, Murano MA, Cecílio SRM, Labruna MB. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the State of São Paulo, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2009; 9(1): 73-78.
- 31- Pinter A, Dias RA, Gennari SM, Labruna MB. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 2004; 41(3): 324-332.
- 32- Martins TF, Barbieri ARM, Costa FB, et.al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites & Vectors*. 2016; 9: 186.
- 33- Sangioni LA, Horta MC, Vianna MCB, Gennari SM, Soares RM, Galvão MAM, Schumaker TTS, Ferreira F, Vidotto O, Labruna MB. Rickettsial infection

in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases*. 2005; 11(2): 265-270.

34- Cunha NC, Fonseca AH, Rezende J, Rozental T, Favacho ARM, Barreira JD, Massard CL, Lemos ERS. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2009; 29(2): 105-108.

35- Souza CE, Pinter A, Donalisio MR. Risk factors associated with the transmission of Brazilian spotted fever in the Piracicaba river basin, State of São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015; 48(1): 11-17.

36- Sabatini, Pinter A, Nieri-Bastos FA, Marcili A, Labruna MB. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of Sao Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 2010; 47(5): 913-916.

37- Piranda EM, Faccini JLH, Pinter A, Saito TB, Pacheco RC, Hagiwara MK, Labruna MB. Experimental infections of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratorial findings. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2008; 103(7): 696-701.

38- Fonseca LM, Martins AV. Febre Maculosa: Revisão de Literatura – Artigo de Revisão. *Saúde & Ambiente em Revista*. 2007; 2(1): 01-20.

39- Calic SB. Sorologia das Riquetsioses. *Revista Brasileira de Parasitologia*. 2004; 13(1): 185-187.

40- Ogrzewalska M, Uezu A, Jenkins CN, Labruna MB. Effect of Forest Fragmentation on Tick Infestations of Birds and Tick Infection Rates by *Rickettsia* in the Atlantic Forest of Brazil. *EcoHealth*. 2011; 8: 320-331.

41- Hill JK, Gray MA, Khen CV, Benedick S, Tawatao N, Hamer KC. Ecological impacts of tropical forest fragmentation: how consistent are patterns in species richness and nestedness? *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 2011; 366: 3265-3276.

- 42- Reed RA, Johnson-Barnars J, Baker WL. Fragmentation of a forested Rocky Mountain landscape, 1950-1993. *Biological Conservation*. 1996; 75: 267-277.
- 43- Johnson PTJ, Thielges DW. Diversity, decoys and the dilution effect: how ecological communities affect disease risk. *The Journal of Experimental Biology*. 2010; 213: 961-970.
- 44- Reisen WK. Landscape Epidemiology of Vector-Borne Diseases. *Annual Review of Entomology*. 2010; 55: 461-483.
- 45- Internet. Acesso em: 28/07/2016. Disponível em: <https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>.
- 46- Jorge RSP. Caracterização do Estado sanitário dos carnívoros selvagens da RPPN SESC Pantanal e de animais domésticos da Região [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008. 105p.
- 47- Whiteman CW. Conservação de carnívoros e a interface homem-fauna doméstica-fauna silvestre numa área fragmentada da Amazônia oriental brasileira [Tese]. Piracicaba: Universidade de São Paulo; 2007. 88p.
- 48- Widmer CE. Perfil sanitário de onças pintadas (*Panthera onca*) de vida livre no Pantanal Sul do Mato Grosso do Sul-Brasil [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2009. 89p.
- 49- Jorge RSP, Rocha FF, Júnior JAM, Morato RG. Ocorrência de patógenos em carnívoros selvagens brasileiros e suas implicações para a conservação e saúde pública. *Oecologia Australis*. 2010; 14(3): 686-710.
- 50- Megid J, Teixeira CR, Amorin RL, Cortez A, Heinemann MB, Antunes JMAP, Costa LF, Fornazari F, Cipriano JRB, Cremasco A, Richtzenhain LJ. First Identification of Canine Distemper Virus in Hoary Fox (*Lycalopex vetulus*): Pathologic Aspects and Virus Phylogeny. *Journal of Wild Diseases*. 2010; 46(1): 303-305.

51- Gehrke FS, Labruna MB, Camargo LMA, Camargo EP, Schumaker TTS. Ticks of the State of Rondonia, Western Brazilian Amazon: detection of *Borrelia* sp., *Ehrlichia* sp. and *Rickettsia* sp. by the use of polymerase chain reaction and Southern Blotting. In: International Congress of Acarology. Universidad Nacional Autónoma de México, Mérida, Yucatán, México, 2002: 184-185.

52- Labruna MB, Machado RZ. Agentes transmitidos por carrapatos na Região Neotropical. pp. 155-164. In: DM Barros-Battesti, M Arzua, GH Bechara. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo, 2006.

53- Internet. Acesso em: 25/11/2015. Disponível em: <http://www.ambiente.sp.gov.br/parque-lagamar-de-cananeia/sobre-o-parque>.

54- Internet. Acesso em: 02/02/2016. Disponível em: (http://www.cananeia.sp.gov.br/novo_site/anossacidade/).

55- Internet. Acesso em: 25/11/2015. Disponível em: <http://www.itapeva.sp.gov.br>.

56- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223.

57- Frigeri E. Invasion by domestic dogs (*Canis lupus familiaris*) in the Atlantic Forest: effects of habitat loss and agriculture intensification [Dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2013.

58- Pinter A, Horta MC, Pacheco RC, Moraes-Filho J, Labruna MB. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from an endemic area for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. Caderno de Saúde Pública. 2008; 24(2): 247-252.

59- Labruna MB, Horta MC, Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, Camargo LMA. Prevalence of Rickettsia Infection in Dogs from the Urban and

Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. Vector-borne and Zoonotic Diseases. 2007; 7(2): 249-255.

60- Szabó MPJ, Nieri-Bastos FA, Spolidorio MG, Martins TF, Barbieri AM, Labruna MB. *In vitro* isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. Parasitology 2013; 140: 719–728.

61- Barbieri AR, Filho JM, Nieri-Bastos FA, Souza JC Jr, Szabó MP, Labruna MB. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil Ticks and Tick-Borne Diseases. 2014; 5(6): 848-53.

62- Szabó MPJ, Cunha TM, Pinter A, Vicentini F. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. Experimental and Applied Acarology. 2002; 25: 909-916.

63- Medeiros AP, Souza AP, Moura AB, Lavina MS, Belatto V, Sartor AA, Nieri-Bastos FA, Richtzenhain LJ, Labruna MB. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 2011; 106: 926–930.

64- Ogrzewalska M, Saraiva DG, Moraes-Filho J, Martins TF, Costa FB, Pinter A, Labruna MB. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. Parasitology. 2012; 139: 1283–1300.

65- Pacheco RC, Moraes-Filho J, Guedes E, Silveira I, Richtzenhain LJ, Leite RC, Labruna MB. Rickettsial infections of dogs, horses and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Medical and Veterinary Entomology. 2011; 25: 148-155.

66 - Gehrke FS, Gazeta GS, Souza ER, Ribeiro A, Marrelli MT, Schumaker TT.. *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia felis* and *Rickettsia* sp. TwKM03 infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a

Brazilian spotted fever focus in the State of Rio De Janeiro, Brazil. *Clinical Microbiology and Infection*. 2009; 15(Supl. 2): 267-268.

67 - Torres PC, Prado PI. Domestic dogs in a fragmented landscape in the Brazilian Atlantic Forest: abundance, habitat use and caring by owners. *Brazilina Journal of Biology*. 2010; 70(4): 987-994.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Nº: _____

Data: ____ / ____ / ____

Nome do Animal: _____ Espécie: Canina Felina Sexo: M F

Raça: _____ Idade: _____ Pelagem: _____

Nome do Proprietário: _____

Endereço: _____ Bairro: _____

Cidade: _____ Telefone: _____

Através desta declaração afirmo ter sido suficientemente informado a respeito dos procedimentos a serem realizados para colheita de material biológico (sangue, aspirado de linfonodo, órgãos reprodutivos) com o animal acima identificado, o qual sou responsável e proprietário de seu domicílio, e reconheço ainda a importância deste trabalho para o controle das doenças transmissíveis, a preservação dos recursos naturais, a fauna e flora desta região, bem como para a saúde do animal sob meus cuidados.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes, bem como que essa participação é isenta de despesas e que tenho garantido o respeito aos direitos legais de meu representado.

(Assinatura do representante legal (proprietário) do sujeito de pesquisa)
Identificação:

(Assinatura da testemunha)
Nome:
Identificação:

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste proprietário ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do pesquisador responsável pelo estudo

Assinatura dos demais pesquisadores

Questionário

Proprietário do animal:

Nome do animal:

1 - Qual local de moradia?

- | | |
|------------------------|-------------------------------|
| (1). Dentro de casa | (5). NS (não sabe) |
| (2). Quintal cimentado | (6). NR (não respondeu) |
| (3). Quintal s/ piso | (7). Outro especificar. _____ |
| (4). Solto à vontade | |

2- Qual alimentação do animal?

- | | |
|---------------------------|-------------------------------|
| (1). Ração | (6). víscera cozida |
| (2). Comida caseira | (7). Fubá de milho |
| (3). Carne Fresca | (8). Outro especificar. _____ |
| (4). Carne cozida | |
| (5). Víscera sem cozinhar | |

3 - O animal já recebeu atendimento de um Médico Veterinário?

- (1). Sim (2). Não (3). NS (não sabe) (4). NR (não respondeu)

4 - Quando o animal foi tratado para carrapato e pulga pela ultima vez?

- | | |
|---------------------------|-------------------------|
| (1). Menos de um mês | (6) Mais de um ano |
| (2). 1 e 2 meses | (7) Nunca foi tratado |
| (3). 3 a 5 meses | (8). NS (não sabe) |
| (4). 6 meses | (9). NR (não respondeu) |
| (5). 7 meses a 1 (um ano) | |

5 - O animal já foi vacinado contra Raiva antes?

- (1). Sim (2). Não (3). NS (não sabe) (4). NR (não respondeu)
-
- Há quanto tempo? Este ano () ano passado () há mais de 3 anos ()

6 - O animal tomou alguma outra vacina além desta ? (anti-rábica)

- (1). Sim (2). Não (3). NS (não sabe) (4). NR (não respondeu)
-
- Qual? _____
-
- Há quanto tempo? Este ano () ano passado () há mais de 3 anos ()

7- O animal já cruzou alguma vez?

- (1). Sim (2). Não (3). NS (não sabe) (4). NR (não respondeu)

8 - Teve filhotes?

(1). Sim (2). Não (3). NS (não sabe) (4). NR (não respondeu)

9 - Nasceram quantos filhotes na ultima gestação?

(1)- um(2)- Dois (3)- Três(4)- Quatro (5)- Cinco (6)- Mais de cinco
(7)- Não se aplica

10 - Os filhotes nasceram fortes?

(1). Sim (2). Não (3). A maioria (4). NS (não sabe)
(5). NR (não respondeu)

11 - Seu animal tem acesso a rua?

(1). Sim (2). Não (3). NS (não sabe) (4). NR (não respondeu)
(5). NA Não se aplica

12 - Com que frequência?

(1). Todos os dias (2). A cada dois dias (3). Semanalmente
(4). Mensalmente (5). NA não se aplica

13. O que você conhece ou já ouviu falar da leishmaniose visceral (Calazar)?

13.1 Transmissão () não (X) sim – O que?

Sobre o mosquito que pica e quando contaminado transmite a doença

13.2 Vetor () não () sim – O que? _____

13.3 Reservatório () não () sim – O que? _____

13.4 Sintoma () não (X) sim – O que? _____

13.5 Medidas de prevenção e controle () não (X) sim - O que? _____

14. O que você conhece ou já ouviu falar da brucelose canina?

14.1 Transmissão () não () sim – O que? _____

14.2 Reservatório () não () sim – O que? _____

14.3 Sintoma () não () sim – O que? _____

14.4. Medidas de prevenção e controle () não () sim – O que? _____

15. O que você conhece ou já ouviu falar de toxoplasmose?

15.1 Transmissão () não () sim – Qual? _____

15.2 Sintoma () não () sim – O que? _____

15.3 Medidas de prevenção e controle () não () sim – O que? _____

16 - Na casa do Sr./a Ou próximo as ela há: () mato () muitas árvores frutíferas () Lixo () córrego () horta () criações de animais. Qual ? _____
() não soube responder

17 - O terreno é visitado por:

() gato () roedores () gambás () cães errantes () outros.
Qual ? _____

18 - Os cães/ gatos possuem o hábito de tomar leite cru (sem ferver ou pasteurizado)? () sim () não