

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LOUISE NICOLLE BACH KMETIUK

PESQUISA DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp. EM JAVALIS (*Sus scrofa*), CÃES DE CAÇA E SERES HUMANOS CONTROLADORES DE JAVALIS NO BIOMA MATA ATLÂNTICA, REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS- PARANÁ, BRASIL.

CURITIBA

2019

LOUISE NICOLLE BACH KMETIUK

PESQUISA DA INFECÇÃO POR *Rickettsia* spp. EM JAVALIS (*Sus scrofa*), CÃES DE CAÇA E SERES HUMANOS CONTROLADORES DE JAVALIS NO BIOMA MATA ATLÂNTICA, REGIÃO DOS CAMPOS GERAIS- PARANÁ, BRASIL.

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Biologia Celular e Molecular, no curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo. Coorientador: Prof. Dr. Felipe da Silva Krawczak.

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.  
Biblioteca de Ciências Biológicas.  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Kmetiuk, Louise Nicolle Bach

Pesquisa da infecção por *Rickettsia* spp. em javalis (*Sus scrofa*), cão de caça e seres humanos controladores de javalis no Bioma Mata Atlântica, Região dos Campos Gerais-Paraná, Brasil. / Louise Nicolle Bach Kmetiuk.  
– Curitiba, 2019.

123 p.: il.

Orientador: Alexander Welker Biondo

Coorientador: Felipe da Silva Krawczak

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

1. Rickettsia 2. Sus scrofa 3. Cão de caça 4. I. Título II. Biondo, Alexander Welker III. Krawczak, Felipe da Silva IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (22. ed.) 616.92201



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR - 40001016007P8

### TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LOUISE NICOLLE BACH KMETIUK** intitulada: **Pesquisa da infecção por Rickettsia spp. em javalis (Sus scrofa), cães de caça e seres humanos controladores de javalis no Bioma Mata Atlântica, Região dos Campos Gerais- Paraná, Brasil**

, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 22 de Maio de 2019.

ALEXANDER WELKER BIONDO  
Presidente da Banca Examinadora

IVAN ROQUE DE BARROS FILHO  
Avaliador Externo (UFPR)

JOÃO HENRIQUE PEROTTA  
Avaliador Externo (UFPR)

JULIANO RIBEIRO  
Avaliador Externo (PPGBCM)

JUAN CARLOS DUQUE MORENO  
Avaliador Externo (ULS)



## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, que me educou e ensinou a perseverança.  
Minha eterna gratidão e respeito.

Ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade. Em especial, ao Prof. Francisco Filipak Neto pela confiança, competência e prontidão em sempre ajudar, e ao secretário Lucas Menezes, pela disponibilidade e comprometimento.

Ao Prof. Dr Felipe da Silva Krawczak pela confiança e conhecimento técnico.

À Prof. Andrea Pires dos Santos pela parceria e confiança.

Ao Prof. Leandro Cavalcante Lipinski pela confiança e parceria.

Ao M.V. Ismail da Rocha Neto e MSc. Fernanda Pistori, pela parceria.

Ao Prof. Marcelo Bahia Labruna pela confiança e oportunidade, e a todos do Laboratório de Doenças Parasitárias, VPS-USP.

Ao Prof. Renato van Wilpe Bach pelos ensinamentos e carinho.

Ao Instituto Ambiental do Paraná, em especial ao Dr. Mauro de Moura-Britto, pela confiança e parceria.

À Secretaria Municipal de Saúde do município de Ponta Grossa-PR, pelo apoio.

Ao Instituto Mater Natura, pelo exemplo e parceria.

À Dra. Silvia Nery Godoy pelo incentivo.

Ao Parque Estadual de Vila Velha-PR, pela abertura, parceria e disponibilidade.

Ao Prof. Ivan Roque de Barros Filho pelo exemplo de integridade, amizade e disposição em sempre ajudar.

A todos os professores, colegas e amigos da pós-graduação e a equipe de trabalho que convivi e aprendi, pelas experiências e saberes compartilhados.

À minha mãe, Silvana, pelo exemplo de fé, força e amor incondicional.

Ao meu pai Mauricio, pelo amor e dedicação.

Ao meu irmão, João Paulo, a quem devo dar o exemplo e todo o meu amor.

Aos meus tios, Adriana e Daniel, e avôs e avó, José, Ariel e Karin pelo apoio e alento.

*In memoriam*, à minha doce avó Orlanda.

”O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem”.

Guimarães Rosa.

## RESUMO

As bactérias do gênero *Rickettsia* são responsáveis por doenças em humanos e animais ao redor do mundo, no entanto, poucos detalhes estão disponíveis sobre sua ecologia e circulação entre animais selvagens e populações humanas de alto risco de transmissão no Brasil. O objetivo do presente estudo foi investigar a ocorrência de carrapatos e *Rickettsia* spp. em javalis, cães de caça e seres humanos controladores de javalis. Amostras de soro e carrapatos foram coletadas em 80 javalis selvagens, 170 cães de caça e 34 controladores de javalis nas regiões sul e centro-oeste do Brasil, nos biomas Mata Atlântica e Cerrado, respectivamente, entre 2016 e 2018. As amostras de soro foram testadas por Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) para detectar anticorpos IgG para os antígenos *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia rhipicephali* e *Rickettsia amblyommatis*. As espécies de carrapatos foram identificadas taxonomicamente, como descrito anteriormente. Um total de 164 carrapatos, incluindo *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma brasiliense* e *Amblyomma aureolatum* foram testados em ensaios de PCR para o *Rickettsia* spp do Grupo Febre Maculosa. Um total de 58/80 (72,5%) javalis, 24/170 (14,1%) cães de caça e 5/34 (14,7%) controladores de javalis foram positivos (títulos  $\geq 64$ ) para pelo menos uma espécie de *Rickettsia* spp. Um total de 669/1.584 (42,2%) carrapatos de javalis foram identificados como *Amblyomma sculptum*, 910/1.584 (57,4%) como *Amblyomma brasiliense*, 4/1.584 (0,24%) larvas de *Amblyomma* spp. e 1/1,584 (0,06%) como ninfa de *Amblyomma dubitatum*. Todos os 9 carrapatos encontrados em cães de caça foram identificados como *Amblyomma aureolatum* e os 22 carrapatos encontrados em seres humanos controladores de javalis, como *A. sculptum*. Nenhum carrapato testado foi positivo a Reação em Cadeia de Polimerase convencional para *Rickettsia* spp. O presente estudo foi o primeiro relato concomitante de exposição a *Rickettsia* spp. em javalis, cães de caça e seres humanos controladores de javalis em dois diferentes biomas brasileiros. O controle populacional do javali pode aumentar o risco de exposição humana e, conseqüentemente, a doença transmitida por carrapatos. Os javalis podem estar carregando e espalhando carrapatos de capivaras de seus habitats originais para outros ecossistemas. Novos estudos podem ser necessários para explorar a habilidade de javalis em infectar carrapatos e fazer parte do ciclo de transmissão de *Rickettsia* spp.

Palavras-chave: Febre Maculosa Brasileira, cães de caça, javalis, caçadores, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma aureolatum*.

## ABSTRACT

*Rickettsia* bacteria are responsible for diseases in humans and animals around the world, however few details are available regarding its ecology and circulation among wild animals and human populations at high transmission risk in Brazil. The aim of this study was to investigate the occurrence of ticks and *Rickettsia* spp. in wild boars, corresponding hunting dogs and hunters. Serum samples and ticks were collected from 80 free-range wild boars, 170 hunting dogs and 34 hunters from southern and central-western Brazil, from the Atlantic Forest and Cerrado biomes, respectively, between 2016 and 2018. Serum samples were tested by indirect immunofluorescent-antibody assay (IFA) to detect IgG antibodies against *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia amblyommatis*. Tick species were identified by morphological taxonomic keys, as previously described. A total of 164 ticks including *A. sculptum*, *A. brasiliense* and *A. aureolatum* were tested in PCR assays for Spotted Fever Group (SFG) *Rickettsia* spp. A total of 58/80 (72.5%) wild boars, 24/170 (14.1%) hunting dogs and 5/34 (14.7%) hunters were positive (titers  $\geq 64$ ) to at least one *Rickettsia* species. A total of 669/1,584 (42.2%) ticks from wild boars were identified as *Amblyomma sculptum*, 910/1,584 (57.4%) as *Amblyomma brasiliense*, 4/1,584 (0.24%) larvae of *Amblyomma* spp. and 1/1,584 (0.06%) nymph as *Amblyomma dubitatum*. All 9 ticks found on hunting dogs were identified as *Amblyomma aureolatum* and all 22 ticks on hunters as *A. sculptum*. No tested tick was positive by standard PCR to SFG *Rickettsia* spp. The present study was the concomitant report of wild boar, hunting dog and hunter exposure to SFG rickettsiae agents, performed in two different Brazilian biomes. Wild boar hunting may increase the risk of human exposure and consequently tick-borne disease Wild boars may be carrying and spreading capybara ticks from their original habitats to other ecosystems. Further studies can be required to explore the ability of wild boars to infecting ticks and be part of transmission cycle of *Rickettsia* spp.

Key-words: Brazilian Spotted Fever, hunting dogs, wild boar, hunters, *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma brasiliense*, *Amblyomma aureolatum*.



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	10
2 JUSTIFICATIVA.....	13
3 HIPÓTESES.....	14
4 OBJETIVO GERAL.....	15
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
CAPITULO I.....	16
CAPITULO II .....	41
5 DISCUSSÃO .....	63
7 REFERÊNCIAS.....	68
8 ANEXOS .....	74

## 1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* (família *Rickettsiaceae*; ordem *Rickettsiales*) é formado por bactérias intracelulares gram-negativas e obrigatórias, as quais podem ser filogeneticamente classificados no grupo da febre maculosa (GFM), grupo tifo, grupo 'ancestral' com grupo *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* (MERHEJ; RAOULT, 2011). As riquetsioses transmitidas por carrapatos são colocadas no grupo GFM e são conhecidas por causarem infecção em animais e humanos (PAROLA, RAOULT, 2001; PAROLA et al., 2013), participando de ciclos enzoóticos ou epizoóticos entre vertebrados e vetores artrópodes (TELFORD; PAROLA, 2007). Os carrapatos da família *Ixodidae* têm sido descritos como os principais reservatórios e vetores das riquetsias naturais, principalmente devido à capacidade de transmissão transtadial e transovariana (SOCOLOVSKI et al., 2009). *Rickettsia rickettsii*, o principal agente etiológico da febre maculosa no Brasil, tem sido frequentemente transmitido aos seres humanos pelos carrapatos *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma aureolatum* (LABRUNA et al., 2009; LABRUNA et al., 2011; OGRZEWALSKA et al., 2012). Os carrapatos *Amblyomma sculptum* podem ser caracterizados pelo seu comportamento agressivo e parasitismo não espécie-específico, sendo a espécie de carrapatos de maior prevalência no bioma Cerrado e em áreas degradadas da Mata Atlântica (SZABÓ et al., 2009; MARTINS et al., 2016). Por outro lado, os carrapatos *A. aureolatum* são encontrados principalmente em áreas preservadas da Mata Atlântica, as quais proporcionam condições abióticas favoráveis e presença de carnívoros que são seus hospedeiros primários (OGRZEWALSKA et al., 2012). Em áreas endêmicas do Brasil, capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são reconhecidas como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* (POLO et al., 2015). Nessas áreas no sudeste do Brasil, a densidade populacional de capivaras foi 40 vezes superior do que a registrada em ambientes naturais, provavelmente devido à alta produção e distribuição espacial de cultivos de cana (FERRAZ et al., 2007; POLO et al., 2015). Da mesma forma, as populações de javalis também podem ser encontradas nas áreas de cultivo de cana-de-açúcar do centro-oeste, sudoeste e sul do Brasil (PEDROSA et al., 2015). Essa sobreposição de habitat de javalis e capivaras pode ter impacto na ocorrência de carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos.

Os javalis ou suínos ferais são considerados pelo IBAMA como “espécie exótica invasora do javali-europeu (*Sus scrofa*), em todas as suas formas (nativa, doméstica, asselvajada e miscigenada), linhagens, raças e diferentes graus de cruzamento com o porco doméstico” (FRANKENBERG, 2005). Não são um problema exclusivo do Brasil, estando entre as mais de 100 espécies invasoras de maior agravo no mundo, segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), com populações distribuídas

em todos os continentes, exceto a Antártica (LOWE et al, 2000). Em território brasileiro, os javalis são classificados na “Categoria I de espécies exóticas invasoras” pelo IBAMA, devido à sua presença alterando processos bióticos e ocasionando prejuízos no âmbito social e econômico, sendo sua liberação, soltura ou disseminação na natureza proibidas sob quaisquer circunstâncias (IAP, 2011). Estes animais podem ser encontrados em todos os seis biomas nacionais (Amazônia, cerrado, caatinga, mata atlântica, pantanal e pampa), sendo citados em mais de 500 municípios de 11 estados brasileiros, principalmente nas regiões sul e sudeste (SALVADOR; FERNANDEZ, 2017). Acredita-se que seu estabelecimento no estado do Paraná ocorreu no município de Palmeira, na década de sessenta, região correspondente ao Bioma Mata Atlântica (DEBERDT; SCHERER, 2007). Uma das Unidades de Conservação que tem por objetivo a proteção de um fragmento de Mata Atlântica e conta com a presença de javalis como espécie exótica invasora é o Parque Estadual de Vila Velha- PR (IAP, 2011). Considera-se que espécie exótica invasora aquela que, quando introduzida por meio de soltura ou escape, difunde-se em região diferente do local de origem, ameaçando a biodiversidade nativa (IAP, 2011). O processo de invasão biológica em ambientes constitui-se como uma ameaça ao meio ambiente, acarretando prejuízos à economia, à biodiversidade de ecossistemas naturais, além dos riscos à Saúde Única (LEÃO et al., 2011). A presença de espécies exóticas dentro de Unidades de Conservação, como o javali, pode difundir conceito equivocado sobre as espécies que constituem o ecossistema natural, podendo acarretar em resistência ao seu controle e erradicação (CARPANEZZI, 2007). Os efeitos da presença dos javalis na epidemiologia de doenças infecciosas de transmissão para seres humanos e animais no Brasil ainda é pouco estudado (RAMOS et al, 2014). Os javalis brasileiros são semelhantes aos javalis eurásianos e são classificados no Brasil como espécie exótica invasora (IBAMA, 2013). O impacto ambiental, social e econômico da invasão dos javalis no Brasil corroborou para autorização, pela Instrução Normativa nº 03/2013 de 31 de janeiro de 2013, do seu controle através da captura e abate, sendo comum o uso de cães para o rastreamento (IBAMA, 2013). Estes animais são conhecidos como invasores de áreas naturais e antrópicas, não apenas competindo por recursos com animais selvagens nativos e espécies de gado, mas também contribuindo nos ciclos de vida de carrapatos e patógenos (MERRILLA et al., 2018). Como espécies de mamíferos de grande porte, não-nativas e invasoras, os javalis selvagens têm sido considerados hospedeiros potenciais de carrapatos de *A. sculptum* no bioma Pantanal (LOWE et al. 2000; RAMOS et al., 2014).

Cães de caça (*Canis familiaris*) para rastreamento de javalis são um dos métodos mais populares durante o manejo e controle de javalis no Brasil (ROSA, et al. 2018). No Brasil, cães rurais que acessam áreas naturais têm sido frequentemente parasitados por *A. aureolatum* e soropositivos para *Rickettsia* spp., aumentando potencialmente o risco de

infecções humanas ao trazer carrapatos infectados para o ambiente doméstico (PIRANDA et al., 2008; SZABÓ et al., 2013; MOERBECK et al., 2016). Casos de Febre Maculosa Brasileira em seres humanos são reconhecidos no Brasil desde 1929, associados a alta morbidade e mortalidade (LEMOS et. al, 2001). Em cães, os primeiros relatos da doença datam de 2007 (LABRUNA, 2009). A doença é endêmica na região Sudeste do Brasil, com relatos em parte da região Sul, como no estado do Paraná (LABRUNA, 2009). A reemergência da doença com casos em humanos na década de 1990 pode ser relacionada a fatores ecológicos, como o aumento da população de capivaras, consideradas reservatórios para a doença (LABRUNA, 2009). Apesar da recente associação no Brasil, a ocorrência concomitante em cães e humanos contactantes já era descrita em 1946 nos EUA (SHEPARD; TOPPING, 1946).

Ao realizar o controle populacional de javalis, cães de caça e seres humanos controladores de javalis no Brasil podem estar potencialmente expostos a várias doenças transmitidas por carrapatos. Apesar disso, não há uma descrição da prevalência de infecção por *Rickettsia* spp nessas populações, o que contribuiria para um melhor entendimento da magnitude do problema.

## 2 JUSTIFICATIVA

O impacto ambiental, social e econômico da invasão dos javalis no Brasil corroborou para autorização, pela Instrução Normativa nº 03/2013 de 31 de janeiro de 2013, do seu controle através da captura e abate, sendo comum o uso de cães para o rastreamento. Os biomas Mata Atlântica na região sul e Cerrado na região centro-oeste estão entre as áreas mais afetadas pela presença dessa espécie exótica invasora e contam com o controle através de pessoa física. As consequências da proximidade e interação entre javalis, seres humanos controladores e cães de caça para veiculação de doenças relevantes para Saúde Única como a Febre Maculosa Brasileira, doença transmitida por carrapatos de maior importância no país, permanecem desconhecidas. Portanto o presente trabalho pretendeu avaliar os fatores de risco associados ao controle dos javalis para os seres humanos controladores, se os cães podem ser considerados sentinelas para a Febre Maculosa Brasileira e se os javalis são capazes de manter e transportar populações de carrapatos na Região dos Campos Gerais.

### 3 HIPÓTESES

Javalis são capazes de manter populações de carrapatos importantes para a manutenção do gênero *Rickettsia* spp. nos biomas Mata Atlântica na região sul e Cerrado na região centro-oeste. Javalis, cães de caça e controladores de javalis possuem anticorpos para *Rickettsia* spp. nos biomas Mata Atlântica na região sul e Cerrado na região centro-oeste. A atividade de caça é um fator de risco para exposição de cães de caça e seres humanos controladores a *Rickettsia* spp. nos biomas Mata Atlântica na região sul e Cerrado na região centro-oeste. Cães de caça de javalis podem atuar como sentinelas para a Febre Maculosa Brasileira biomas Mata Atlântica na região sul e Cerrado na região centro-oeste. Carrapatos encontrados em javalis, cães de caça e controladores veiculam *Rickettsia* spp. biomas Mata Atlântica na região sul e Cerrado na região centro-oeste.

## 4 OBJETIVO GERAL

Este estudo será realizado em duas regiões do Brasil correspondentes consideradas como áreas não-endêmicas para Febre Maculosa Brasileira, buscando analisar e comparar fragmentos do bioma Mata Atlântica presentes na região sul do Brasil, e bioma Cerrado presente na região centro-oeste do Brasil a possível circulação do agente etiológico e os fatores de risco associados a exposição ao gênero *Rickettsia* entre javalis, cães de caça e seres humanos controladores de javalis.

### 4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Detectar anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em soros de javalis (*Sus scrofa*), cães de caça utilizados no rastreamento de javalis e seres humanos controladores de javalis provenientes das região sul e centro-oeste, através da Técnica de Imunofluorescência Indireta (RIFI); Realizar a detecção molecular de *Rickettsia* spp. através de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) em carrapatos coletados de javalis, cães de caça e controladores de javalis da regiões sul e centro-oeste; Avaliar os fatores de risco relacionados a Febre Maculosa Brasileira nos bioma Mata Atlântica presentes na região sul do Brasil, e bioma Cerrado presente na região centro-oeste do Brasil; Contribuir com análises sobre a epidemiologia de riquetsioses nos biomas Mata Atlântica presentes na região sul do Brasil e bioma Cerrado presente na região centro-oeste do Brasil e fornecer estes dados para os serviços de vigilância e comunidade científica através de relatórios e artigos publicados.

## CAPITULO I

**Ticks and serosurvey of anti-*Rickettsia* spp. antibodies in wild boars (*Sus scrofa*), hunting dogs and hunters of Brazil .**

*Manuscrito aceito para publicação na Revista PLOS (Public Library of Science) Neglected Tropical Diseases.*



Title: Ticks and serosurvey of anti-*Rickettsia* spp. antibodies in wild boars (*Sus scrofa*), hunting dogs and hunters of Brazil.

Short title: *Rickettsia* spp. in wild boars, dogs and hunters

Louise B. Kmetiuk<sup>1</sup>; Felipe S. Krawczak<sup>2</sup>; Fernanda P. Machado<sup>3</sup>; Igor A. D. Paploski<sup>4</sup>; Thiago F. Martins<sup>5</sup>; Pedro I. Teider-Junior<sup>3</sup>; Maria C. A. Serpa<sup>5</sup>; Amália R. M. Barbieri<sup>5</sup>; Renato V. W. Bach<sup>6</sup>; Ivan R. Barros-Filho<sup>3</sup>; Leandro C. Lipinski<sup>6</sup>; Andrea P. dos Santos<sup>7</sup>; Marcelo B. Labruna<sup>5</sup>; Alexander W. Biondo<sup>1,8</sup>

<sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81531-900, Brazil. lousebachk@gmail.com; abiondo@ufpr.br

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, 74001-970, Brazil. felipekvet@gmail.com

<sup>3</sup>Department of Veterinary Science, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 80035-050, Brazil. fer891@hotmail.com; p\_teider@yahoo.com.br; ivanbarf@ufpr.br

<sup>4</sup>Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA. igorufprm@gmail.com

<sup>5</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, SP, 05508 270, Brazil. thiagodogo@hotmail.com; carolina.serpa@terra.com.br; amalia.barbieri@gmail.com; labruna@usp.br.

<sup>6</sup>Department of Medicine, State University of Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brazil. renatovwbach@gmail.com; leandrolipinski@uepg.br.

<sup>7</sup>Assistant professor, Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907, USA. santos1@purdue.edu

<sup>8</sup>Adjunct professor, Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907, USA. abiondo@ufpr.br

Corresponding Author: abiondo@ufpr.br (AWB)

## Abstract

**Background:** Rickettsia bacteria are responsible for diseases in humans and animals around the world, however few details are available regarding its ecology and circulation among wild animals and human populations at high transmission risk in Brazil. The aim of this study was to investigate the occurrence of ticks and Rickettsia spp. in wild boars, corresponding hunting dogs and hunters.

**Methods:** Serum samples and ticks were collected from 80 free-range wild boars, 170 hunting dogs and 34 hunters from southern and central-western Brazil, from the Atlantic Forest and Cerrado biomes, respectively, between 2016 and 2018. Serum samples were tested by indirect immunofluorescent-antibody assay (IFA) to detect IgG antibodies against Rickettsia rickettsii, Rickettsia parkeri, Rickettsia bellii, Rickettsia rhipicephali and Rickettsia amblyommatis. Tick species were identified by morphological taxonomic keys, as previously described. A total of 164 ticks including A. sculptum, A. brasiliense and A. aureolatum were tested in PCR assays for Spotted Fever Group (SFG) Rickettsia spp.

**Results:** A total of 58/80 (72.5%) wild boars, 24/170 (14.1%) hunting dogs and 5/34 (14.7%) hunters were positive (titers  $\geq 64$ ) to at least one Rickettsia species. A total of 669/1,584 (42.2%) ticks from wild boars were identified as Amblyomma sculptum, 910/1,584 (57.4%) as Amblyomma brasiliense, 4/1,584(0.24%) larvae of Amblyomma spp. and 1/1,584 (0.06%) nymph as Amblyomma dubitatum. All 9 ticks found on hunting dogs were identified as Amblyomma aureolatum and all 22 ticks on hunters as A. sculptum. No tested tick was positive by standard PCR to SFG Rickettsia spp.

**Conclusions:** The present study was the concomitant report of wild boar, hunting dog and hunter exposure to SFG rickettsiae agents, performed in two different Brazilian biomes. Wild boar hunting may increase the risk of human exposure and consequently tick-borne disease Wild boars may be carrying and spreading capybara ticks from their original habitats to other ecosystems. Further studies can be required to explore the ability of wild boars to infecting ticks and be part of transmission cycle of Rickettsia spp.

## Author Summary

The present study reported serological findings and molecular assays of *Rickettsia* spp and ticks of wild boars, simultaneous to their correspondent hunting dogs and hunters. Seropositivity for *Rickettsia* spp. was higher in wild boars when compared to dogs and humans but was similar between dogs and humans. Despite *Rickettsia* spp. prevalence was statistically higher in southern than central-western Brazil for wild boars, no significance was observed in hunting dogs and hunters. For the first time, *A. sculptum* ticks were founded in wild boars from the subtropical climate of southern Brazil. Despite human beings have been considered less exposed to ticks (and therefore rickettsiae) than animals, specific human activities such as wild boar hunting may increase the risk of exposure and consequently tick-borne disease. Wild boars may be carrying and spreading capybara ticks from their original habitats to other ecosystems. These results may provide important findings for public action planning to prevent neglected vector-borne diseases in overlapping areas of wild boars, hunting dogs and hunters. Further studies can be required to explore the ability of wild boars to infecting ticks and be part of transmission cycle of *Rickettsia* spp.

## Introduction

The genus *Rickettsia* (family Rickettsiaceae; order Rickettsiales) comprises gram-negative and obligate intracellular bacteria, which are phylogenetically classified into the spotted fever group (SFG) rickettsiae, the typhus group rickettsiae, the *Rickettsia bellii* group rickettsiae and the *Rickettsia canadensis* group rickettsiae [1]. Tick-borne rickettsioses have been placed into the SFG group, known of causing infection in animals and human beings [2, 3], and participating on enzootic or epizootic cycles among vertebrates and arthropod vectors [4]. Ixodid ticks have been described as the main natural reservoirs and vectors of rickettsiae, with transstadial and transovarial transmission in ticks [5].

*Rickettsia rickettsii*, the main etiological agent of spotted fever in Brazil, has been primarily transmitted to human beings by *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* ticks [6, 7, 8]. *Amblyomma sculptum*, characterized by an aggressive behavior and multispecies parasitism, may be the most prevalent tick species in the Cerrado and degraded areas of the Atlantic Rainforest biomes [9, 10]. On the other hand, *A. aureolatum* ticks have been mostly found in Atlantic Rainforest fragments, which may provide favorable abiotic conditions and native carnivores as primary hosts [8].

Wild boars (*Sus scrofa*) have been classified by Brazilian laws as exotic invasive species originated by Eurasian wild boars and their hybrids, with nationwide hunting officially permitted (Normative Instruction 03/2013) as a strategy for population control and eradication [11]. Wild boars may invade natural and anthropic areas, not only competing for resources with native wildlife and livestock species, but also sustaining life cycle of ticks

and tick-borne diseases [12]. As large-bodied, non-native and the most invasive mammal species, wild boars have been considered as potential hosts of *A. sculptum* ticks in Brazilian biomes, particularly the Pantanal floodplains [13, 14].

Hunting dogs (*Canis familiaris*) have been the most popular method for wild boar tracking and hunting in Brazil [15]. Brazilian rural dogs accessing natural areas have been frequently found to show parasitism for *A. aureolatum* ticks along with antibodies for *Rickettsia* spp., potentially increasing the risk of human infection when bringing infected ticks to household environment [16, 17, 18].

Density population of capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in spotted fever-endemic areas of southeastern Brazil, mostly related to sugarcane crops production [19], has been 40 times higher than those reported in natural environments [20]. Similarly, wild boar populations have also been associated to several cultivated areas of central-western, southwestern and southern Brazil [21]. Hence, it is reasonable to speculate that the overlapping of wild boar and capybara environments may have a synergic impact on occurrence of ticks and tick-borne diseases.

Despite wild boars, hunting dogs and hunters in Brazil may be exposed to several tick-borne rickettsiae, no study to date has concurrently assessed this potential and alternative life cycle of spotted fever in wild boars, hunting dogs and hunters. Accordingly, the aim of the present work was to determine anti-*Rickettsia* antibodies and presence of ticks in wild boars, hunting dogs and hunters in two different Brazilian biomes (Atlantic Forest and Cerrado).

## Methods

### Study area

This is a descriptive cross-sectional study of boars, hunting dogs, hunters and ticks parasitizing them. The study was conducted in preserved and degraded areas in the Atlantic Forest biome of southern Brazil, including the Vila Velha State Park (belongs to Campos Gerais National Park) and Palmeira, Curitiba, Castro, Ponta Grossa, Porto Amazonas and Teixeira Soares municipalities; and in degraded areas in the Cerrado biome of central-western Brazil, the Aporé (Fig 1).

Figure 1. Sampling locations of wild boars, hunting dogs and hunters from southern and central-western Brazil. Locations are numbered as follow: Vila Velha State Park (1), Palmeira (2), Curitiba (3), Castro (4), Ponta Grossa (5), Porto Amazonas (6) and Teixeira Soares (7) from State of Paraná; Aporé (8) from State of Goiás.

### Samples and collection

A total of 22 on-field expeditions were carried out from November 2016 to May 2018, which included summer, autumn, winter and spring. Ticks were collected from wild boars, hunting dogs and hunters during all year seasons, which may have covered all possible

species and stages. Wild boars blood samples were collected by intracardiac puncture immediately after death, by jugular puncture in dogs and by cephalic puncture in hunters. All samples were collected in tubes without anti-coagulant and kept at room temperature (25 °C) until visible clot retraction, centrifuged at 1,500 revolutions per minute for five minutes, and serum separated and kept at -20 °C until processing.

Wild boars were sampled in agricultural areas of Atlantic Forest and Cerrado biomes following legal hunting laws, along hunting dogs and hunters. Additionally, wild boars at the Vila Velha State Park (belongs to Campos Gerais National Park) were baited, photo-monitored, trapped and euthanized. Both hunting and trapping, along with handling of wild boar samples and ticks were authorized by the Brazilian Environmental Biodiversity System (SISBIO license 61805-2).

Tick sampling of each wild boar was randomly obtained by time-independent collection, with ticks picked on all surfaces of the two body sides to ensure maximum yield. After such hunting activities, resting and blood samplings, dogs were carefully examined for ticks and hunters asked for self-examination for tick presence. All ticks obtained from wild boars, hunting dogs and hunters were collected, preserved in isopropyl alcohol and taken to the laboratory for taxonomic identification, which was performed following standard morphological keys [22, 23, 24]. Hunting dogs underwent annual deworming protocols, along flea and tick control according to visual infestation, done by their owners.

#### Laboratory testing of samples

Serum samples were individually tested by indirect immunofluorescent-antibody assay (IFA) for five Brazilian *Rickettsia* isolates: *R. rickettsii* strain Taiaçu, *R. parkeri* strain At24, *R. amblyommatis* strain Ac37, *R. rhipicephali* strain HJ5 and *R. bellii* strain CL as previously described [25, 26]. Individual sera were initially screened at a 1:64 dilution against each of the rickettsial antigens. A fluorescein isothiocyanate-labeled rabbit anti-pig IgG dilution 1: 1,500 (IgG, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, lot 048K4842) as conjugate was used for hunting wild boars samples, fluorescein isothiocyanate-labeled rabbit anti-dog IgG dilution 1:1,000 (IgG, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, lot 102M4795V) was used as conjugate for the hunting dogs samples, and fluorescein isothiocyanate-labeled rabbit anti-human IgG dilution 1:1,500 (IgG, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO, lot 038K4802) as conjugate was used for the hunter samples. In each slide, a serum previously shown to be non-reactive (negative control) and a known reactive serum (positive control) were tested up to the 1:64 dilution. In case of a positive reaction of testing serum, serial dilutions at two-fold increments were tested up to the endpoint titer. Serum showing for a *Rickettsia* species

titer at least fourfold higher than those observed for the remaining *Rickettsia* species was considered possibly homologous to the first *Rickettsia* species, as previously determined [25, 26].

A sample of 164 ticks was randomly selected, individually submitted to DNA extraction by the guanidine isothiocyanate technique [27], and individually tested by standard PCR for tick mitochondrial 16S rRNA [28] and rickettsial *gltA* gene [29]. For each PCR run, a negative control (water) and positive control (*Rickettsia vini* DNA) were included [30].

#### Ethics

This study has been approved by the Ethics Committee of Animal Use (protocol number 059/2017) of the Federal University of Paraná, officially included as part of the annual activities of the City Secretary of Health at Ponta Grossa and approved by National Human Ethics Research Committee (number 97639017.7.0000.0102). In addition, the in-park trapping and tick collection have been authorized by the Environment Institute of Paraná (authorization number 30/17) and by Chico Mendes Institute of Biology (authorization number 61805-2).

#### Data analysis

The absolute and relative frequency of infection was calculated stratifying the observations according to the species and to the region in the country in which samples were collected. The frequency of *Rickettsia* spp. between different species was compared using chi-square test. Observed differences were considered to be significant when the resulting P-value was less than 0.05. A map illustrating the sampling points was constructed using QGIS 2.18.18.

#### Results

Blood samples were collected, and ticks searched from 80 wild boars, 170 hunting dogs and 34 hunters. Samples from 60/80 (75.0%) wild boars were obtained by legal hunting (agricultural areas), while 20/80 (25.0%) by trapping (conservation unit area). Among hunting individuals, 24/60 (40.0%) wild boars, 147/170 (86.5%) hunting dogs and 27/34 (79.4%) hunters were sampled at the Atlantic Forest biome, while 36/60 (60.0%) wild boars, 23/170 (13.5%) hunting dogs and 7/34 (20.6%) hunters at the Cerrado biome.

Through serologic analysis for *Rickettsia* spp., 58/80 (72.5%) wild boars, 24/170 (14.1%) hunting dogs, and 5/34 (14.7%) hunters were seropositive for *Rickettsia* spp. (Table 1). In addition, possible antigen involved in a homologous reaction (PAIHR) for *R. rickettsii*, *R. bellii* or *R. rhipicephali* were found in 4/80 (5.0%) wild boars, *R. bellii* and *R. amblyommatis* in 2/170 (1.17%) hunting dogs (Table 1). Among wild boars, IFA endpoint titers varied from 64 to 1,024 for *R. rickettsii* and *R. bellii*, 64 to 512 for *R. parkeri* and *R. rhipicephali*, and 64 to 256 for *R. amblyommatis*. IFA endpoint titers in hunting dog samples varied from 64 to 512 for *R. rickettsii*, *R. bellii*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommatis*, 64 to 256 for *R. rickettsii*, and 128 to 1,024 for *R. parkeri*. Among hunters, IFA endpoint titers varied

from 128 to 256 for *R. rickettsii*, 64 to 256 for *R. parkeri*, 64 to 128 for *R. bellii*, and 64 to 512 for *R. rhipicephali* and *R. amblyommatis*.

Seropositivity for *Rickettsia* spp. was higher in wild boars when compared to dogs (p-value = 0.001) and humans (p-value = 0.001) but was similar between dogs and humans (p-value = 1.000). Despite *Rickettsia* spp. prevalence was statistically higher in southern than central-western Brazil for wild boars (p-value= 0.002), no significance was observed in hunting dogs (p-value= 1.000) and hunters (p-value= 1.000).

Table 1. Results of indirect immunofluorescent-antibody assay (IFA) for five *Rickettsia* species in wild boars, hunting dogs and hunters from southern and central-western Brazil.

Samples	No. tested samples	No. seroreactive individuals to each of the <i>Rickettsia</i> species					No. with homologous reaction (PAIHR in parentheses) *
		(% seroreactivity)					
		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	<i>R. rhipicephali</i>	<i>R. amblyommatis</i>	<i>R. bellii</i>	
<b>WILD BOARS</b>							
Southern	44	30 (69.8)	22 (51.2)	13 (30.2)	7 (16.8)	23 (53.5)	1 ( <i>R. bellii</i> ), 2 ( <i>R. rickettsii</i> )
Central-western	36	9 (24.3)	13 (35.1)	3 (8.1)	0 (0)	10 (27.0)	1 ( <i>R. rhipicephali</i> )
Total	80	39 (48.7)	35 (43.8)	16 (20.0)	7 (8.7)	33 (41.2)	4 ( <i>R. bellii</i> , <i>R. rickettsii</i> , <i>R. rhipicephali</i> )
<b>HUNTING DOGS</b>							
Southern	147	5 (3.4)	5 (3.4)	8 (5.4)	11 (7.5)	8 (5.4)	1 ( <i>R. bellii</i> ), 1 ( <i>R. amblyommatis</i> )
Central-western	23	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (13.0)	
Total	170	5 (2.9)	5 (2.9)	8 (4.7)	11 (6.5)	11 (6.5)	2 ( <i>R. bellii</i> , <i>R. amblyommatis</i> )
<b>HUNTERS</b>							
Southern	27	4 (14.8)	4 (14.8)	4 (14.8)	4 (14.8)	4 (14.8)	
Central-western	7	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (3.7)	



---

Total	34	4 (11.8)	4 (11.8)	4 (11.8)	4 (11.8)	<sup>27</sup> 5 (18.5)	0
-------	----	----------	----------	----------	----------	---------------------------	---

---

\*PAIHR: A homologous reaction was determined when an endpoint titer to a *Rickettsia* species was at least 4-fold higher than those observed for the other *Rickettsia* species. In this case, the *Rickettsia* species involved in the highest endpoint titer was considered the possible antigen involved in a homologous reaction (PAIHR).

Ticks were collected from wild boars, hunting dogs and hunters during all year seasons, covering all possible species and stages. A total of 1,584 ticks were collected from wild boars, including 669 (42.2%) adults of *A. sculptum*, 910 (57.4%) *Amblyomma brasiliense* composed by 870 (54.9%) adults and 40 (2.5%) nymphs, 4 (0.24%) larvae of *Amblyomma* spp. and one (0.06%) nymph of *Amblyomma dubitatum*. All 9 ticks founded on hunting dogs were identified as *A. aureolatum* adults, and all 22 ticks obtained from the hunters as *A. sculptum* nymphs (Table 2). In addition, 24/44 (54.5%) and 8/36 (22.2%) wild boars had an average infestation of 32.7 and 81.5 ticks per animal in southern and central-western Brazil, respectively. *Amblyomma sculptum* was the dominant tick species infesting central-western wild boars, whereas *A. brasiliense* was so in southern wild boars. All *A. aureolatum*-infested dogs were from the southern region. A total of 164/1,584 (10.4%) ticks, including 162 adults and 2 nymphal, were randomly selected for the detection of SFG rickettsial DNA by PCR. They belonged to one genus including 3 species: 4 *A. sculptum* from 2/44 (4.5%) wild boars of southern Brazil, 53 *A. sculptum* from 8/36 (22.2%) wild boars of central-western Brazil, 100 *A. brasiliense* from 24/44 (54.58%) wild boars of southern Brazil and 7/147 (4.8%) *A. aureolatum* from hunting dogs of southern Brazil (Table 2). No rickettsial DNA was detected in these ticks, despite of each of them yielded a visible amplicon in agarose gel through the PCR targeting the tick 16S rRNA gene.

Table 2. Species and number of ticks (M: males; F: females; N: nymphs; L: larvae) collected from wild boars, hunting dogs and hunters from southern and central-western Brazil.

Hosts	No. tick sampled/No. animal sampled (%)	No. ticks per species					No. ticks tested by PCR
		<i>A. sculptum</i>	<i>A. brasiliense</i>	<i>A. dubitatum</i>	<i>Amblyomma</i> spp.	<i>A. aureolatum</i>	
<b>WILD BOARS</b>							
Southern	24/44 (54.5)	4 F	638 M, 232 F, 40 N	1 N	4 L	-	4 <i>A. sculptum</i> ; 100 <i>A. brasiliense</i>
Central-western	8/36 (22.2)	447 M, 218 F	-	-	-	-	31 <i>A. sculptum</i>
Total	32/80 (40.0)	669	910	1	4	-	35 <i>A. sculptum</i> ; 100 <i>A. brasiliense</i>
<b>HUNTING DOGS</b>							
Southern	7/147 (4.8)	-	-	-	-	1 M, 8 F	7 <i>A. aureolatum</i>
Central-western	0/23 (0)	-	-	-	-	-	-
Total	7/170 (4.2)	-	-	-	-	9	7 <i>A. aureolatum</i>
<b>HUNTERS</b>							
Southern	0/27 (0)	-	-	-	-	-	-
Central-western	7/7 (100)	19 M, 3 F	-	-	-	-	22 <i>A. sculptum</i>

---

Total	7/34 (20.58)	22	-	-	-	-	22 <i>A. sculptum</i>
-------	--------------	----	---	---	---	---	-----------------------

---

## Discussion

The present study reports serological findings and molecular assays of *Rickettsia* spp and ticks of wild boars, simultaneous to their correspondent hunting dogs and hunters. Seropositivity for *Rickettsia* spp. was higher in wild boars when compared to dogs and humans but was similar between dogs and humans. Despite results have apparently shown a higher seropositivity of hunting dogs and hunters in southern than in central- western Brazil, differences were not statistically significant probably due to a reduced statistical power between the prevalence of groups formed by stratification according to region. Since this was not the aim of the present study, further studies should be conducted to fully establish differences on serological rickettsial titers of wild boars, hunting dogs and hunters among different Brazilian regions.

The difference of seropositivity between southern and central-western wild boars could be related to dominant tick species, namely *A. sculptum* in central-western and *A. brasiliense* in southern Brazilian regions. Serological results herein may indicate that, if the *A. sculptum* populations infesting wild boars, dogs and hunters in central-western Brazil were infected by any SFG pathogenic rickettsiae, the infection rate would be very low or only few populations would be infected. In fact, the low rickettsial seropositivity in central - western wild boars, hunting dogs and hunters could be a result of the rare rickettsial infection in *A. sculptum* ticks [31, 32]. The only exceptions may be the spotted fever endemic areas of southeastern Brazil, where some populations of this tick species may be infected by *R. rickettsii* [33, 34]. Thus, all *A. sculptum* tested were negative for *Rickettsia* spp. in molecular analyses.

On the other hand, the much higher seropositivity of wild boars, hunting dogs and even hunters in southern Brazil may suggest that the *A. brasiliense* populations from this region would be infected by one or more SFG rickettsiae, yet to be identified in further studies. To the best of our knowledge, no rickettsial agent has been identified in *A. brasiliense* yet.

Wild boars have been suggested to play a potential role in the eco-epidemiology of rickettsioses. In Catalonia, Spain, 12/23 (52.2%) and 19/23 (82.6%) wild boars sampled were seropositive to *Rickettsia slovaca*, classified into the SFG and associated with *Dermacentor marginatus* ticks [35]. In Mississippi, USA 17/58 (29,3%) feral swine were seropositive to the SFG pathogen *R. parkeri* [36]. Although capybaras have long been recognized as the major host of *A. sculptum* and amplifier species for *R. rickettsii* infection in Brazil [37], future studies should be conducted to fully establish the role of wild boars as hosts, amplifiers and their association to human cases of *R. rickettsii*-caused spotted fever. Despite human beings have been considered less exposed to ticks (and therefore

rickettsiae) than animals [38], specific human activities such as hunting may increase the risk of exposure and consequently of disease. Not surprisingly, individuals from rural areas who visit forest areas, rivers and waterfalls have also shown higher incidence of spotted fever infection [39]. Unfortunately, no information was found about hunting habits of a non-fatal human case of spotted fever illness notified in a nearby area of southern Brazil and other two cases notified in nearby area of central-western Brazil [40, 41], which hinders the risk assessment for this activity in regard to *Rickettsia* spp. transmission.

Important to remark that, as mentioned before, hunting is currently unlawful in Brazil. Actually wild boar hunting has been officially considered as “controlling non-protected invasive exotic species”, therefore the only legal regulated form of hunting activity to date in Brazil (Normative Instruction 03/2013) [11].

The tick species obtained herein on wild boars have been previously involved in *Rickettsia* spp. transmission to dogs and human beings [10, 33]. Association of hunting practices with seroreactivity to *Rickettsia* spp. has been attributed to a higher exposure to *Amblyomma* spp. while hunting, since these ticks have been primarily associated with wildlife in Brazil [42]. Further studies that better estimate the prevalence of infection in these populations are required to better design control strategies.

Although restricted to Brazilian Pantanal biome (floodplains), feral pigs, *Sus scrofa* L. (Artiodactyla, Suidae), have been previously suggested as hosts to *A. sculptum* [13, 14]. For the first time, *A. sculptum* ticks were found in two wild boars of subtropical climate from southern Brazil. In a recent study about the distribution of *A. sculptum* in Brazil, it was shown that this tick is absent from most of the southern region, possibly due to more severe winter temperatures [10]. The repeatedly findings herein of both engorged adults (successfully fed) and engorged nymphs (different stages) of *A. brasiliense* and *A. sculptum* on wild boars in the Atlantic Forest and Cerrado biomes, respectively (Table 2), have shown host adaptation and spreading to two more Brazilian biomes, suggest that these tick species might be adapting and spreading to areas previously thought as unsuitable for their survival.

All ticks collected from wild boars at the conservation unit area of Atlantic Forest were identified as *A. brasiliense*, probably due to predominant high humidity and lower temperatures, important for this tick species development [43], naturally maintained in such areas by native peccaries (*Tayassu* spp.) as primary hosts. However, the relative higher presence (tick average per animal) of adult and nymph stages in wild boars may suggest overlapping of ecological niche, and higher traveling body area as competent *A. brasiliense* hosts. Although *A. brasiliense* has been considered aggressive to human beings [44, 45] and such scenario may impact on higher tick and tick-borne disease spreading, *R. rickettsii*

transmission by *A. brasiliense* ticks have been observed only under experimental conditions [46], and absent in molecular surveys on natural environments [17, 47, 48, 49]. Not surprisingly, no *A. brasiliense* tested herein by standard PCR was positive to *Rickettsia* spp.

Hunting dogs in the present study were only found with *A. aureolatum*, corroborating to previous studies in dogs from rural areas nearby rainforest fragments and hunter activities [50, 51, 52]. In a previous study in southern Brazil, 19/133 (14.3%) rural dogs were reported with ticks, including *A. aureolatum* [53]. These ticks were the second most prevalent among rural dogs of another study from southern Brazil, representing 52/153 (33,9%) of the collected ticks [54]. *Amblyomma aureolatum* ticks have shown high susceptibility to *R. rickettsii* infection, and dogs as one of the most important hosts in spotted fever-endemic areas [51]. The infection by *R. rickettsii* may contribute to lower survival and reproduction in *A. aureolatum* females, resulting in low infection rates (<10%) under natural conditions [7]. While this assumption could be associated to the absence of rickettsial DNA in the *A. aureolatum* ticks of the present study, we are aware that we have tested only a small sample of ticks, precluding a more rational conclusion. Seven hunters in the present study became infested by *A. sculptum* ticks after hunting. *Amblyomma sculptum* is the most frequent human-biting tick in Brazil, and also one of the main vectors of *R. rickettsii* in the country [10, 33]. These findings highlight hunters as a potential risk group for tick-borne spotted fever in Brazil.

Since *Rickettsia* spp usually infect and remain inside host endothelial cells, molecular detection has usually failed when investigating blood samples [55]. Under experimental *R. rickettsii*-infected tick infestation, rickettsial DNA has been detected by PCR in only one of 32 (3.1%) blood samples of infected capybaras, despite serological titers up to 16,384 [56]. In the same study, despite serological titers up to 32,768, direct intraperitoneal inoculation has failed to provide rickettsial DNA detection in blood samples. Thus, in the present study, no molecular investigation was made on blood samples of wild boars, hunting dogs and hunters.

Wild boars may be carrying and spreading capybara ticks from their original habitats to other ecosystems. In Florida, USA, wild boars have been found over long distances and different ecosystem, increasing contact to multiple tick species in their preferential microhabitat [12]. Besides higher-energy requirements obtained in long distance incursions, adult wild pigs have also larger body area [57] than capybaras, which might be an important characteristic of wild boars in spreading ticks in Brazil. Altogether, such overlapping distribution of wild boars and capybaras in Brazil may lead to synergistic spreading of vector ticks, particularly of *R. rickettsii*-caused spotted fever, locally called as

Brazilian spotted fever.

Wild boars may pose an additional threat due to their highly adaptive capacity, spreading themselves to both intact and degraded areas of all six Brazilian biomes, including Atlantic Forest (rainforest), Cerrado (tropical savanna), Pampas (open fields), Pantanal (flood plains), Amazon (rainforest) and Caatinga (semi-arid), as recently recognized by the Brazilian Ministry of Agriculture (map in S1 Figure) [58]. As already mentioned, Brazilian Spotted fever and other rickettsial agents have reportedly overlapped capybara occurrence, therefore wild boars may carry ticks and tick-borne diseases outside capybara original areas, currently restricted to gallery forests and seasonally flooded savannas such as the Atlantic Forest, Pantanal and Cerrado [59]. In such scenario, authors hypothesize that wild boars may overspread ticks and rickettsial diseases to Brazilian biomes lacking capybaras as the Caatinga biome, a dry area found on northern, northeastern and southeastern Brazil.

In addition, the Brazilian Ministry of Environment has warned about the ineffectiveness of wild boar natural population control by Brazilian native predators, mostly due to low populations of already critically endangered species as pumas (*Puma concolor*) and jaguars (*Panthera onca*), associated to wild boar groups weighting up to 220 kg, defending themselves by sticking together and returning the attacks with potential wounds by bites and tusks [60]. Although hunting increase may be necessary to successfully control wild boar populations, authors suggest a governmental nationwide establishment of sanitary hunting guidelines, conducted always with tick-bite prevention and early recognition of rickettsial disease symptoms.

The present study has shown seropositivity for at least one *Rickettsia* species in wild boars, hunting dogs and hunters. Despite an expected lower exposure of humans to ticks (and therefore rickettsiae) than animals, specific human activities such as wild boar hunting may increase the risk of human exposure and consequently tick-borne disease. Wild boars may be carrying and spreading capybara ticks from their original habitats to other ecosystems lacking capybaras, with no effective natural predators. These results may provide important findings for public health action to prevent vector-borne diseases in overlapping areas of capybaras, wild boars, hunting dogs and hunters. Further studies should be conducted to fully establish the wild boar ability to infect ticks and its role on *Rickettsia* spp. transmission cycle.

#### Acknowledgements

Authors are kindly thankful to Dr. Ismail da Rocha Neto and Osvaldir Hartmann for helping with wild boar captures and samplings, researchers Vanessa do Nascimento Ramos and Matias Pablo Juan Szabo for conjugate supply, Dr. João Henrique Perotta and Dr. Laís



Giuliane Felipetto for veterinary assistance, biologist Mauro de Moura-Britto and the personal of the Environmental Institute of Paraná for technical support, and the Campos Gerais National Park for authorization and internal access. The authors also thank the Public Health Secretary of the Ponta Grossa for the human blood samplings. Dr. Kmetiuk has been supported by a PhD fellowship and research funding from Capes-DS through the Graduate College of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná.

#### Funding

This work has been supported by the Higher Education Improvement Coordination (CAPES-DS/ protocol number 40001016007P8), Brazil.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests. References

Merhej V, Raoult D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2011;86: 379-405. doi: 10.1111/j.1469-185X.2010.00151.x.

Parola P, Raoult D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 2001;32: 897-928. pmid: 11247714.

Parola P, Paddock CD, Socolovschi C, Labruna MB, Mediannikov O, Kernif T, et al. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 2013;4: 657-702. doi: 10.1128/CMR.00032-13.

Telford SR, Parola P. Arthropods and Rickettsiae, in: Parola P., Raoult D. (Eds.), *Rickettsial diseases*, New York, Infectious diseases and therapy collection, edited by B.A. Cunha, Informa Healthcare. 2007;27-36.

Socolovschi C, Matsumoto K, Brouqui P, Raoult D, Parola P. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* with *Rickettsia conorii conorii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2009;15(2): 324-325. doi: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02259.x>.

Labruna MB, Kamakura O, Moraes-Filho J, Horta MC, Pacheco RC. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009;15(3): 458-460. doi: 10.3201/eid1503.081227.

Labruna MB, Ogrzewalska M, Soares JF, Martins TF, Soares HS, Moraes-Filho J, et al. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerg Infect Dis.* 2011;17: 829-834. doi: 10.3201/eid1705.101524.

Ogrzewalska M, Saraiva DS, Moraes-Filho J, Martins TF, Costa FB, Pinter A, et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitol.* 2012;139: 1283-1300. doi: 10.1017/S0031182012000546.

Szabó MPJ, Labruna MB, Garcia MV, Pinter A, Castagnolli KC, Pacheco RC, et al. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic

rainforest of Southeastern Brazil. *Ann Trop Med Parasit.* 2009;103(1): 57-72. doi: 10.1179/136485909X384956.

Martins TF, Barbieri ARM, Costa FB, Terassini FA, Camargo LMA, Peterka CRL, et al. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). *Parasit Vectors.* 2016;9: 186. doi: 10.1186/s13071-016-1460-2.

Brazilian Institute of Environment and Natural Renewable Resources – IBAMA. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Instrução Normativa nº 3, 31 Jan 2013. 2013. Available from: <http://www.ibama.gov.br/legislacao/javali>. Cited 14 Oct 2018.

Merrilla MM, Boughtonb RK, Lordc CC, Saylor KA, Wight B, Anderson WM, et al. Wild pigs as sentinels for hard ticks: A case study from south-central Florida. *Int J Parasitol Parasites Wildl.* 2018;7: 161-170. doi: 10.1016/j.ijppaw.2018.04.003.

Lowe S, Browne M, Boudjelas S, De Poorter M. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group, Auckland, 2000.

Ramos VN, Piovezan U, Franco AH, Osava CF, Herrera HM, Szabó MP. Feral pigs as host for *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) populations in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 2014;64: 393-406. doi: 10.1007/s10493-014-9832-9.

Rosa CA, Wallau MO, Pedrosa, F. Hunting as the Main Technique Used to Control Wild boars in Brazil. *Wildl Soc Bull.* 2018;42(1): 111-118. doi: 10.1002/wsb.851.

Piranda EM, Faccini JL, Pinter A, Saito TB, Pacheco RC, Hagiwara MK, et al. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008;103(7): 696-701. pmid: 19057821.

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. *Parasitol.* 2013;140: 719-728. doi: 10.1017/S0031182012002065.

Moerbeck L, Vizzoni VF, Machado-Ferreira E, Cavalcante RC, Oliveira SV, Soares CA, et al. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. *J Med Entomol.* 2016;53(6): 1458-1466. doi: 10.1093/jme/tjw121.

Polo G, Labruna MB, Ferreira F. Satellite hyperspectral imagery to support tick-borne infectious diseases surveillance. *PLoS ONE.* 2015;10(11): e0143736. doi:10.1371/journal.pone.0143736.

Ferraz KMPMB, Ferraz SFB, Moreira JR, Couto HTZ, Verdade LM. Capybara

(*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis. *J Biogeogr.* 2007;34(2): 223-230. doi:10.1111/j.1365-2699.2006.01568.x.

Pedrosa F, Salerno R, Padilha FVB, Galetti M. Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. *Nat Conserv.* 2015;13(1): 84-87. doi: 10.1016/j.ncon.2015.04.005.

Aragão HB, Fonseca F. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de ixodologia. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1961;59: 115-129.

Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. *Vox/International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases/Butantan, São Paulo*, 223 p.; 2006.

Martins TF, Onofrio VC, Barros-Battesti DM, Labruna MB. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks Tick Borne Dis.* 2010;1(2): 75-99. doi: 10.1016/j.ttbdis.2010.03.002.

Horta MC, Labruna MB, Sangioni LA, Vianna MC, Gennari SM, Galvão MA, et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group Rickettsia. *Am J Trop Med Hyg.* 2004;71(1): 93-97. pmid: 15238696.

Labruna MB, Horta MC, Aguiar DM, Cavalcante GT, Pinter A, Gennari SM, et al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7(2): 249-255. doi: 10.1089/vbz.2006.0621.

Sangioni LA, Horta MC, Vianna MC, Gennari SM, Soares RM, Galvão MA, et al. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis.* 2005;11(2): 265-270. doi: 10.3201/eid1102.040656.

Mangold AJ, Barges MD, Mas-Coma S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res.* 1998;84(6): 478-484. pmid: 9660138.

Labruna MB, Whitworth T, Horta MC, Bouyer DH, McBride JW, Pinter A, et al. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *J Clin Microbiol.* 2004;42(1): 90-98. pmid: 14715737.

Novakova M, Costa FB, Krause F, Literak I, Labruna MB. *Rickettsia vini* n. sp. (Rickettsiaceae) infecting the tick *Ixodes arboricola* (Acari: Ixodidae). *Parasit Vectors.* 2016;9: 469. doi: 10.1186/s13071-016-1742-8.

Pacheco RC, Horta MC, Pinter A, Moraes-Filho J, Martins TF, Nardi MS, et al. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. Rev Soc Bras Med Trop. 2009;42(3): 351-353.

Costa FB, da Costa AP, Moraes-Filho J, Martins TF, Soares HS, Ramirez DG, et al. *Rickettsia amblyommatis* infecting ticks and exposure of domestic dogs to *Rickettsia* spp. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. PLoS One. 2017;12(6): e0179163. doi: 10.1371/journal.pone.0179163.

Krawczak FS, Nieri-Bastos FA, Nunes FP, Soares JF, Moraes-Filho J, Labruna MB. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. Parasit Vectors. 2014;7: 7. doi: 10.1186/1756-3305-7-7.

Labruna MB, Krawczaka FS, Gerardi M, Binder LC, Barbieri ARM, Paz GF, et al. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from the tick *Amblyomma sculptum* from a Brazilian spotted fever-endemic area in the Pampulha Lake region, southeastern Brazil. Vet Parasitol Reg Stud Rep. 2017;8: 82–85. doi: 10.1016/j.vprsr.2017.02.007.

Ortuño A, Quesada M, López-Claessens S, Castellà J, Sanfeliu I, Antón E, et al. The Role of Wild Boar (*Sus scrofa*) in The Eco-epidemiology of *R. slovaca* in Northeastern Spain. Vector Borne Zoonotic Dis. 2007;7(1): 59-64. doi: 10.1089/vbz.2006.0576.

Castellaw AH, Cheney EF, Varela-Stokes AS. Tick-borne disease agents in various wildlife from Mississippi. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11(4): 439-442. doi: 10.1089/vbz.2009.0221.

Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. Ann N Y Acad Sci. 2009;1166(1): 156-166. doi: 10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x.

Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Schumaker TTS. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(7): 793-801. de Oliveira S, Guimarães JN, Reckziegel GC, Neves BMC, Araújo-Vilges KM, Fonseca LX, et al. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. J Venom Anim Toxins incl Trop Dis. 2016;22: 22. doi: 10.1186/s40409-016-0077-4

Brasil. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Paraná. 2006. Available from: [http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema\\_nacional\\_vigilancia\\_saude\\_pr\\_5ed.pdf](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_pr_5ed.pdf). Cited 14 Oct 2018.

Brasil. Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação- SinanNet. 2014. Available from: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinanet/fmaculosa/bases/febremaculosabrnet.def>. Cited 14 Oct 2018.

Labruna, MB, Pereira MC. Carrapato em cães no Brasil. *Clín Vet, São Paulo*. 2001;30: 24-32.

Sanches GS, Bechara GH, Garcia MV, Labruna MB, Szabó MP. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol*. 2008;44(1): 43-48. doi: 10.1007/s10493-007-9127-5.

Aragão HB. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrofes. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1936;31(4): 759-844.

Guglielmone AA, Beati L, Barros-Battesti DM, Labruna MB, et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl Acarol*. 2006;40(2): 83-100. doi: 10.1007/s10493-006-9027-0.

Dias E, Martins AV. Spotted fever in Brazil. A summary. *Am. j. trop. med. hyg.* 1939;19: 103-108.

Sabatini GA, 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. *J Med Entomol*. 2010;(47): 913-916. pmid: 20939390.

Luz HR, Faccini JLH, 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*. 2017;8: 657-665. doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.04.012.

Luz HR, Furusawa GP, Flausino W, McIntosh D, Faccini J. A proposed description of the natural life cycle of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) in a primary Atlantic rainforest environment in Brazil. *Syst Appl Acarol*. 2018;23(6): 1138-1147. doi: 10.11158/saa.23.6.9.

Labruna MB, Whitworth T, Bouyer DH, McBride J, Camargo LMA, Camargo EP, et al. *Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol*. 2004;41: 1073-1081.

Pinter A, Dias RA, Gennari, SM, Labruna MB. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol*. 2004;41: 324-332. pmid: 15185932.

Costa AP, Silva AB, Costa FB, Xavier GS, Martins TF, Labruna MB, et al. A survey of ectoparasites infesting urban and rural dogs of Maranhão state, Brazil. *J Med Entomol*. 2013;50(3): 674-678. pmid: 23802466.

Labruna MB, Souza SLP, Guimarães JS, Pacheco RC, Pinter A, Gennari SM. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec*. 2001;53: 553-556.

Barbieri AR, Moraes-Filho J, Nieri-Bastos FA, Souza Junior JC, Szabó MP, Labruna MB. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis*. 2014;5: 848-853. doi: 10.1016/j.ttbdis.2014.07.010.

La Scola B, Raoult D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 1997;35(11): 2715–2727. pmid: 9350721.

Souza CE, Moraes-Filho J, Ogrzewalska M, Uchoa FC, Horta MC, Souza SS, et al. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol.* 2009;161(1-2): 116-121. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.12.010.

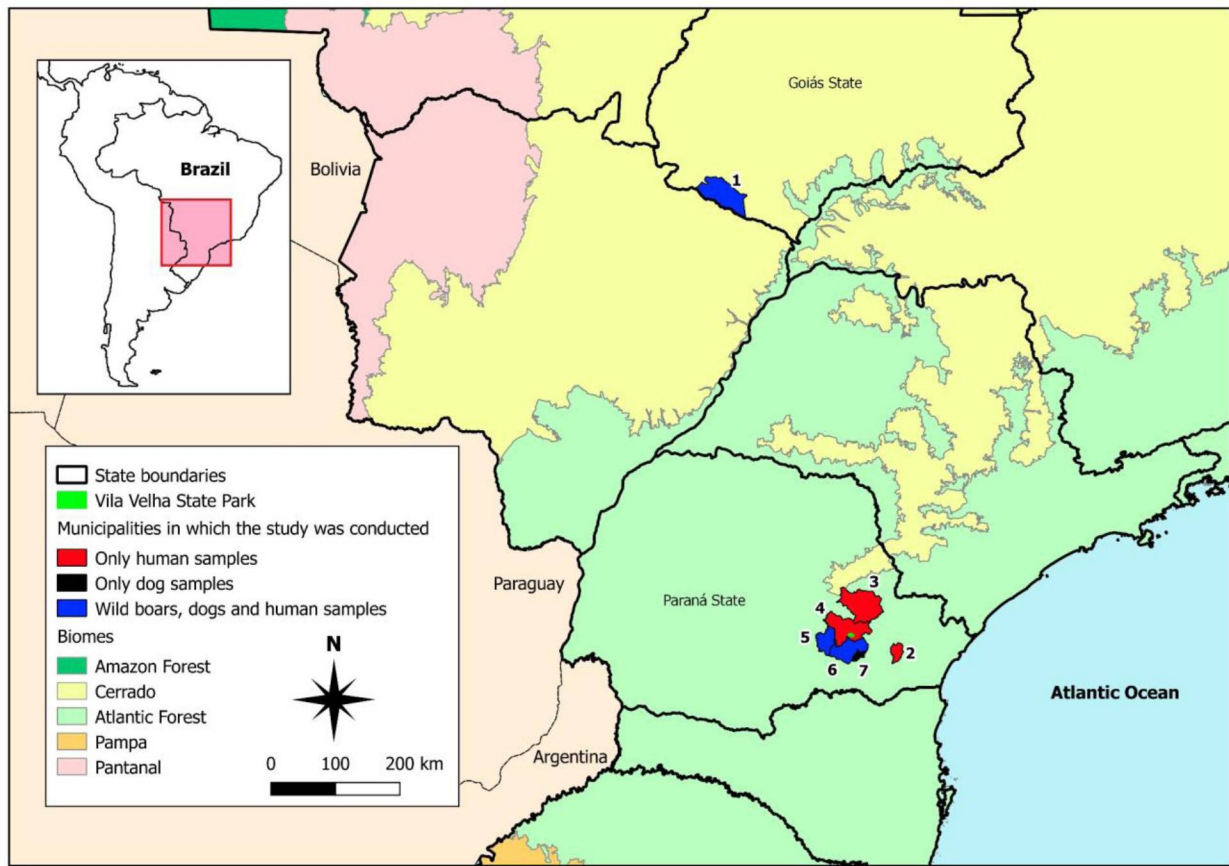
Mace GM, Harvey PH. Energetic constraints on homerange size. *Am Nat.* 1983;121: 120-132.

BRASIL. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). Programa Nacional de Sanidade dos Suídeos – PNSS. Instrução Normativa nº 47, 18 June 2004. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 2004. Available from: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/2018/copy\\_of\\_37a-ro/psa-e-psc.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-setoriais/aves-e-suinos/2018/copy_of_37a-ro/psa-e-psc.pdf). Cited 01 March 2019.

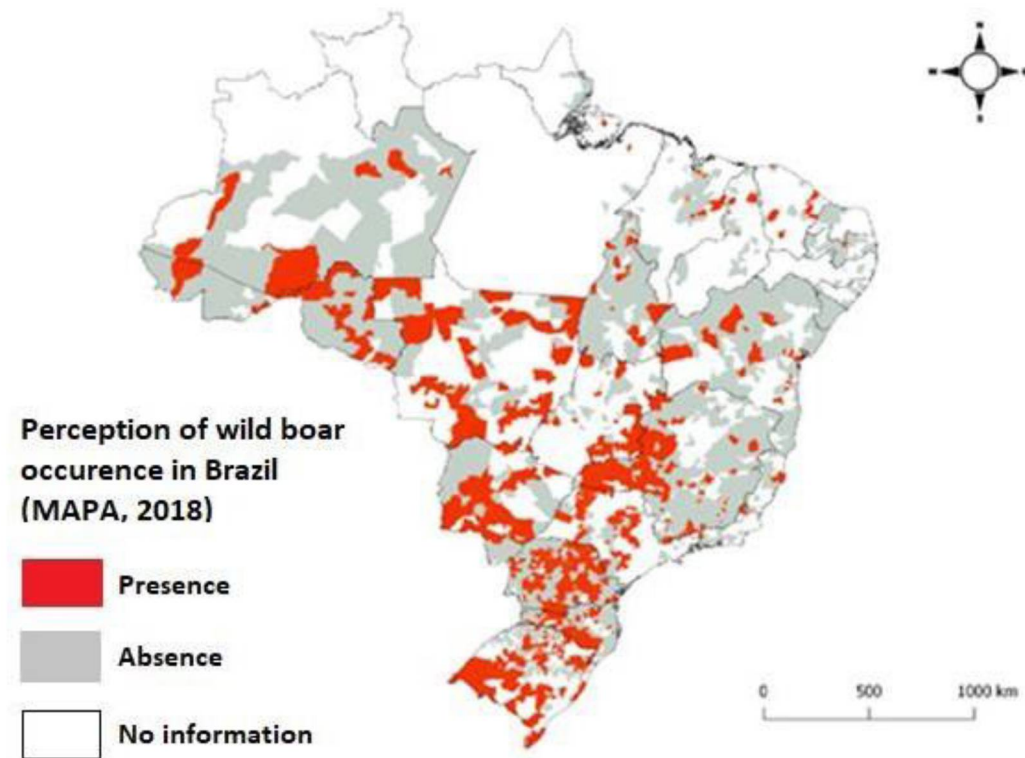
Moreira JR, MacDonald DW. MacDonald. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazônia. Pp. 186-213 in C. Valladares-Padua, R. E. Bodmer & L. Cullen Jr. (eds.). Manejo e Conservação de Vida Silvestre no Brasil. Sociedade Civil Mamirauá. Available from: <https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=185786&biblioteca=vazio&busca=assunto:Amaz%C3%B4nia&qFacets=assunto:Amaz%C3%B4nia&sort=&paginaAtual=69>. Cited 01 March 2019.

Brazilian Institute of Environment and Natural Renewable Resources – IBAMA. Plano Nacional de Prevenção, Controle e Monitoramento do Javali (*Sus scrofa*) no Brasil. 2017. Brasília: Ministério do Meio Ambiente e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available from: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/javali/2017/2017-PlanoJavali-2017.2022.pdf>. Cited 01 March 2019.

Fig. 1



S1 Figure.





## CAPITULO II

**Dog ticks and tick-borne rickettsioses according to Brazilian Biomes**

*Manuscrito a ser submetido para revista Ticks and Tick-borne Diseases.*

Title: Dog ticks and tick-borne rickettsioses according to Brazilian biomes

Running title: Dog ticks and rickettsioses in Brazil

Louise B. Kmetiuk<sup>1</sup>; Felipe S. Krawczak<sup>2</sup>; Andrea Pires dos Santos<sup>3</sup>; Marcelo B. Labruna<sup>4</sup>; Alexander W. Biondo<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81531-900, Brazil. lousebachk@gmail.com; abiondo@ufpr.br.

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine and Animal Science, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, 74001-970, Brazil. felipekvet@gmail.com.

<sup>3</sup>Assistant professor, Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907, USA. santos1@purdue.edu.

<sup>4</sup>Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, SP, 05508 270, Brazil. labruna@usp.br.

<sup>5</sup>Adjunct professor, Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907, USA. abiondo@ufpr.br.

Corresponding Author: Alexander Welker Biondo. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Juvevê, 80035-050, Curitiba, Paraná, Brazil. Phone: +55 41 3350-5812 Fax: +55 41 3350-5623. E-mail: abiondo@ufpr.br

### **Bullet points**

- Dogs may be effective sentinels due to outdoors, natural and frequent infestation by ticks and tick-borne rickettsial diseases;
- Distribution of ticks and tick-borne rickettsial diseases may be better explained by biomes rather than geographical surveys;
- Comparison of different Brazilian biomes may provide reliable information on dynamics, future spreading and prevention of tick and tick-borne rickettsial diseases.

### **Abstract**

Introduction: Rickettsia bacteria have been responsible for both human and animal diseases worldwide. Since dog ticks and tick-borne rickettsioses may vary according to different biomes, geographical survey reports may be mistakenly interpreted and under or overestimated public health threats. Each ecosystem may harbor different scenarios and interactions among dogs, ticks and pathogens, with distinct impact and associated risk factors on human disease. To date, no study has focused on distribution of dog ticks and

tick-borne rickettsioses associated by different Brazilian biomes.

**Objectives:** The aim of the present study was to identify the occurrence, diversity and distribution of dog tick and tick-borne rickettsioses associated to the six Brazilian biomes.

**Methods:** A systematic review and narrative synthesis of published epidemiologic studies on dog ticks and tick-borne rickettsioses by Brazilian biomes have been conducted from 1922 to 2018.

**Results:** An overall of 54 studies were identified. *Rickettsia rickettsii* has been the most likely antigen involved in homologous reactions of tested dogs. Seropositivity for *Rickettsia rickettsii* was the PAIHR found in dogs of 18/54 (33.3%) studies; *Rickettsia parkeri* in 6/54 (11.1%) studies of Amazon; Atlantic Forest and Pampas biomes; *Rickettsia bellii* in 3/54 (5.5%) studies of Amazon, Cerrado, Atlantic Forest biomes; *Rickettsia rhipicephali* in 2/54 (3.7%) studies over the Amazon biome; and *Rickettsia amblyommatis* in 5/54 (9.2%) studies of Amazon, Cerrado and Caatinga biomes. Molecular survey and characterization of *Rickettsia* spp. in ticks collected from dogs described in 17/54 (31.4%) studies. A total of 51/54 (54.4%) studies collected ticks from dogs in 72 different localities of all Brazilian biomes.

**Conclusions:** Ticks and tick-borne rickettsioses should be described and mapped by biomes instead geographical solely location. Such approach may provide a more biological sense of findings, more reliable prediction of spreading and outbreaks and more effective prevention measures.

**Key Words:** ticks-rickettsioses-dogs-biomes-ecology-Brazilian spotted fever

## Introduction

Tick-borne rickettsial diseases, caused by genus *Rickettsia* and worldwide distributed, have been manifested from mild symptoms to severe infection disease in dogs and human beings (Parola et al. 2013). Such pathogens have reportedly infected an overlapping area with multiple vectors and hosts, sharing several other rickettsiae species as the Brazilian spotted fever, probably the most fatal tick-borne disease (Labruna et al, 2017).

Dogs have been naturally and frequently infested by ticks and tick-borne rickettsial diseases, superimposing the same environmental areas of human beings and becoming potential pathogen carriers and/or sentinels, increasing the human risk for *Rickettsia* spp. infection (Piranda et al., 2008). Approximately 12/74 (16.2%) tick species already described to parasite native, exotic and synantropic fauna have been reportedly found also in dogs, mainly *Rhipicephalus sanguineus*, *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma ovale* and *Amblyomma tigrinum* (Piranda et al., 2008). In dogs, *Rickettsia rickettsii* has been associated with *Amblyomma aureolatum* ticks (Pinter, Labruna, 2006), *Rickettsia* sp. strain Atlantic Rainforest associated with *Amblyomma ovale* ticks (Spolidorio, 2010), *Rickettsia*

*parkeri* associated with *Amblyomma tigrinum* (Weck et al., 2016) and *Rhipicephalus sanguineus* associated with *Rickettsia rickettsii* (Cunha et al., 2009). Mixed tick infestations in dogs have been result of interaction with different biomes, ecosystems and tick species (Szabó et al., 2001).

Distinct biomes have been described as characterized regions with specific geography, climate, vegetation and sheltered animals (Streck et al 2008). Brazil has reported six biomes which included the Amazon (rainforest), Cerrado (tropical savanna), Atlantic Forest (rainforest), Caatinga (semi-arid), Pampas (open fields), and Pantanal (flood plains) (Dantas-Torres et al., 2012). Such ecosystems may provide different scenarios for tick-borne diseases ecology, based on different tick vectors and *Rickettsia* species affecting dogs and other species. Due to ecological changes, ticks may have become accidental hosts for *Rickettsia* species, behaving as reservoirs and/or amplifiers, particularly in peri-urban and rural areas (Ogrzewalska et al, 2012; Parola et al. 2013). The constant change and fragmentation of environmental characteristics associated to introduction of susceptible vertebrate hosts may favor tick populations and facilitate the transmission of *Rickettsiae* species (Labruna et. al, 2000, Labruna et. al, 2011). Epidemiological occurrence of different rickettsioses may be determined by specific tick geographic and microenvironmental distribution, associated with specific ecological requirements of vectors (Szabó et. al, 2013).

Since dog ticks and tick-borne rickettsioses may change according to different biomes and degradation levels, geographical reports by state may be mistakenly interpreted, posing under or overestimated risks to animal and public health. Six Brazilian biomes have been described and may harbor several scenarios and different interactions among dogs, ticks and rickettsial species, impacting on associated risk factors for human disease.

To date, no study has focused on dog ticks and associated rickettsioses on different Brazilian biomes. Accordingly, the aim of the present review has been to provide a comprehensive approach of currently reports on distribution of dog ticks and rickettsial species, as well as reports of ticks infesting dogs in each Brazilian biome.

## Materials and Methods

The present survey was conducted throughout the available literature of different bases including PubMed/Medline, Web of Science, and Google Scholar, from 1922 to 2019. Search terms were combinations of words "rickettsia", "dogs", "ticks" and "Brazil", including ticks found in dogs, serology for *Rickettsia* spp. in dogs and molecular detection in dogs and their ticks, along with data from observational and epidemiologic studies, case reports, dissertations and theses.

Regarding serologic surveys of rickettsial species in dogs, seropositivity was considered

when titers were at least four-fold higher than the titers to the remaining *Rickettsia* species, as defined as “possible antigen involved in a homologous reaction” (PAIHR).

For the purposes of the present study, Brazilian biomes have been considered out of 8.516.000 km<sup>2</sup> total territory as 1. Amazon (rainforest, total 4,196,943 km<sup>2</sup>, 49.29%), 2. Cerrado (tropical savanna, 2,036,448 km<sup>2</sup>, 23.92%), 3. Atlantic Forest (rainforest, 1.110.182 km<sup>2</sup>, 13,04%), 4. Caatinga (semi-arid, 844,453 km<sup>2</sup>, 9.92%), 5. Pampas (open fields, 176,496 km<sup>2</sup>, 2.07%) and 6. Pantanal (flood plains, 150,355 km<sup>2</sup>, 1,76%), as previously and officially described (IBGE, 2018).

In short, the 1. Amazon biome has been composed by tropical rainforest with high diversity, hot and moist weather and high precipitation levels; the 2. Cerrado biome by a tropical savanna with subtropical climate and dry and rainy well-defined seasons; the 3. Atlantic Forest biome by rainforest areas spreading along the coast; the 4. Caatinga biome by semiarid, xeric shrubland and thorn forest with low precipitation and humidity; the 5. Pampa biome by open fields with temperate climate and four well-differentiate seasons, plains and grasslands; the 6. Pantanal biome by flood plains and tropical wetland with alternated inundation periods. In addition, Brazilian political state division was also shown and used for comparison, currently formed by five regions (southern, southeastern, central-western, northeastern and northern) and subdivided into 26 states and the Federal District (capital city Brasília).

Data of study, design, biome, dog population, tick species, *Rickettsia* spp. infecting dogs and their ticks from each paper were gathered and analyzed. Comparative and spatial analysis were conducted.

### 3.Results and Discussion

Seropositivity for *Rickettsia rickettsii* was the PAIHR found in dogs of (33.3%) 18/54 studies; *Rickettsia parkeri* in 6/54 (11.1%) studies of Amazon; Atlantic Forest and Pampas biomes; *Rickettsia bellii* in 3/54 (5.5%) studies of Amazon, Cerrado, Atlantic Forest biomes; *Rickettsia rhipicephali* in 2/54 (3.7%) studies over the Amazon biome; and *Rickettsia amblyommatis* in 5/54 (9.2%) studies of Amazon, Cerrado and Caatinga biomes (Table 1). Molecular survey and characterization of *Rickettsia* spp. in ticks collected from dogs described in 17/54 (31.4%) studies (Table 1).

Table 1: Occurrence of tick species, *Rickettsia* spp. from ticks and *Rickettsia* spp. infecting dogs in Brazil.

Biomes	Ticks species	<i>Rickettsia</i> species from ticks	<i>Rickettsia</i> species from dogs	PAIHR	References
Amazon	<i>Rh. sanguineus</i> ; <i>A. parvum</i> ; <i>A. ovale</i> ; <i>A. oblongoguttatum</i> ; <i>Rh. microplus</i> ; <i>A. cajennense</i> ; <i>A. naponense</i> ; <i>A. oblongoguttatum</i> and <i>A. scalpturatum</i>	<i>R. belli</i> ( <i>A. ovale</i> ); <i>R. amblyommatis</i> ( <i>A. cajennense</i> )	<i>R. bellii</i> ; <i>R. amblyommatis</i> ; <i>R. rickettsii</i> ; <i>R. parkeri</i> ; <i>R. rhipicephali</i> ; <i>R. amblyommatis</i> ; <i>R. parkeri</i> ; <i>R. felis</i>	<i>R. bellii</i> ; <i>R. rhipicephali</i> ; <i>R. amblyommatis</i> ; <i>R. rickettsii</i> .	Costa et al., 2017; Castro et al., 2016; Gordon, Young, 1922; Spolidorio et al., 2013; Labruna et al., 2000; Spolidorio et al., 2013; Soares et al., 2014.
Cerrado	<i>Amblyomma</i> sp; <i>Rh. microplus</i> ; <i>A. ovale</i> ; <i>A. sculptum</i> and <i>Rh. sanguineus</i>		<i>R. rickettsii</i>	<i>R. rickettsii</i>	Costa et al., 2017; Figueiredo et al., 1999; Labruna et al., 2000;

---

			Martins et al., 2016.
Atlantic Forest	<i>A. sculptum</i> ; <i>Rh. sanguineus</i> ; <i>A. ovale</i> ; <i>A. aureolatum</i> ; <i>Rh. microplus</i> ; <i>A. nodosum</i> ; <i>A. fuscum</i> ; <i>A. brasiliense</i> ; <i>A. naponense</i> ; <i>Amblyomma spp.</i> ; <i>A. tigrinum</i>	<i>R. felis</i> ( <i>Rh. R. rickettsii</i> , <i>R. sanguineus</i> ); <i>Rickettsia sp.</i> ( <i>R. rhipicephali</i> , <i>R. bellii</i> , <i>R. parkeri</i> , <i>R. africae</i> ; <i>Amblyomma sp.</i> ); <i>R. felis</i> . <i>R. rickettsii</i> ( <i>Rh.</i> <i>sanguineus</i> ); <i>Rickettsia spp.</i> and <i>R. bellii</i> ( <i>A. ovale</i> ); <i>Rickettsia sp. strain</i> Atlantic Forest ( <i>A.</i> <i>ovale</i> , <i>A. aureolatum</i> and <i>Rh.</i> <i>sanguineus</i> ).	Cardoso et al., 2006; Cunha et al., 2009; Fortes et al., 2010; Galvão et al., 2002; Horta et al., 2007; Sabatini et al., 2010; Horta et al., 2004; Labruna et al., 2000; Labruna et al., 2001; Labruna et al., 2009; Luz et al., 2016; Luz et al., 2004; Milagres et al., 2010; Mazioli et al.,

---

				2012; Pena et al., 2009; Ribeiro et al., 1997; Rozental et al., 2002; Sangioni et al., 2005; Scinachi et al., 2017; Spolidorio et al., 2010; Szabó et al., 2013; Tamekuni et al., 2011; Otomura et al., 2016.
Caatinga	<i>A. aureolatum</i> ; <i>A. ovale</i> ; <i>A. sculptum</i> ; <i>Dermacentor nitens</i> ; <i>Rh. microplus</i> ; <i>Rh. sanguineus</i>	<i>A. Rickettsia sp. strain Atlantic Forest (A. ovale and Rh. sanguineus)</i> ; <i>Rickettsia spp (Rh. sanguineus)</i>	<i>R. rickettsii</i> ; <i>R. amblyommatis</i> ; <i>R. felis</i> ; <i>R. rhipicephali</i> ; <i>R. bellii</i> ; <i>R. parkeri</i>	Araes-Santos et al., 2015; Rotondano et al., 2017;
Pampas	<i>A. ovale</i> ;	<i>Rickettsia sp. strain Atlantic Forest (A.</i>	<i>R. parkeri</i> ; <i>R. rickettsii</i> ;	<i>R. parkeri</i> Krawczak et al., 2016.



	<i>Rh. sanguineus</i> ; <i>A. ovale</i> ; <i>A. tigrinum</i> <i>aureolatum</i> ; <i>A. tigrinum</i> , <i>Rh.</i> <i>sanguineus</i>	<i>R. amblyommatis</i> ; <i>R. rhipicephali</i> ; <i>R.</i> <i>felis</i> ; <i>R. bellii</i> . <i>R. amblyommatis</i> , <i>R.</i> <i>felis</i>	Ribeiro et al., 1997 Weck et al., 2016
Pantanal	<i>Rh. sanguineus</i> ; <i>A.</i> <i>cajennense</i> ; <i>A. ovale</i>	<i>R. amblyommii</i> ; <i>R. R. amblyommatis</i> <i>rhipicephali</i> ; <i>R.</i> <i>parkeri</i> ; <i>R. rickettsii</i> ; <i>R. bellii</i> ; <i>R. felis</i>	Melo et al., 2011

Although dog seropositivity may not always indicate a recent infection, long periods of seroreactivity may denote rickettsial circulation, posting dogs as important sentinels for different biomes, particularly on Brazilian Spotted fever surveillance (Paddock et al. 2002; Sangioni et al. 2005). Indirect immunofluorescence assay has been considered as accurate identification of circulating rickettsial agent when an endpoint titer for a given *Rickettsia* species has shown at least four-fold higher than for any other *Rickettsia* species, considered homologous to the first *Rickettsia* species or to a very closely related genotype. Such guideline has been reinforced by an experimental infection with infected *A. aureolatum* for *R. rickettsii*, with most (six) sera showing titers to *R. rickettsii* with at least four-fold higher than to remaining *Rickettsia* species and no dog presented a higher titer to heterologous antigens (Piranda et al., 2008).

First reported in Brazil during the 1920s, *Rickettsia rickettsii* has been the most important tick-borne zoonotic agent, primarily transmitted to human beings and other vertebrates by *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* ticks (Labruna et al., 2009; Labruna et al., 2011; Ogrzewalska et al., 2012).

Observational studies of dogs that naturally acquired *R. rickettsii* showed fever, lethargy, anorexia, anemia, and thrombocytopenia. Besides clinical signs and compatible epidemiologic history, paired serum samples with >8-fold rise in antibody titer to *R. rickettsii* antigen; titers to *R. rickettsii* >4-fold higher than titers to other rickettsial antigens known to occur in Brazil and detection of Rickettsial DNA in canine blood have been supported the definitive diagnoses (Labruna, 2009).

Experimental study in Brazil demonstrated dog susceptibility to *R. rickettsii*. Clinical and hematological abnormalities, detectable levels of Rickettsial DNA (rickettsemia) and reactive antibodies in their blood were related. The antibody response to *R. rickettsii* was first documented on 8 days following infestation (DPI) for at most 10 infection *A. aureolatum* per dog, which mimics the natural exposition in endemic areas of Atlantic Forest, reaching a mean titer by 44 DPI and decreased slowly to 180 DPI (Piranda et al., 2008). In earlier experimental infection, was detected rickettsii-reactive antibodies in dogs 12 months DPI (Keenan et al. 1977). In North America, dogs were experimentally exposed *Dermacentor variabilis* ticks infected with *R. rickettsii*. Alterations in differential blood as severe thrombocytopenia with detectable levels of Rickettsial DNA (rickettsemia) in blood of the dogs between 5 and 13 DPI were reported. Also, antibody response to *R. rickettsii* was first documented on 10 to 13 DPI. Differently to Brazilian Spotted Fever, dogs developed petechiae on both ocular and oral mucosa, and ocular lesions that can be used in early diagnosis (Levin et al., 2014). Thus, clinical disease caused by *R. rickettsii* in dogs may be similar outlines in Brazil and North America.

Dogs can be role as amplifier of *R. rickettsii* for ticks. Brazilian experimental study.

*R. rickettsii* intraperitoneal inoculated dogs provided as infection source for 15.2% larvae, 37.9% nymphs, and 100% adults of *Rh. sanguineus*. Dogs infected by tick bite performed as infection source for 7.1% larvae, 35.8% nymphs, and 100% adults of *Rh. sanguineus*. Vector competence was confirmed since infected nymphs and adults effectively transmitted *R. rickettsii* to guinea pigs. Transovarial transmission of *R. rickettsii* was viewed in engorged females that had been infected as nymphs. Higher blood rickettsial concentration with higher tick infection rates suggested rickettsial strain more virulent to dogs than *R. rickettsia* strain used in similar experimental study of North America (Norment; Burgdorfer et al., 1984). Although the minority of immature ticks demonstrated of experimental studies, *Rh. sanguineus* would not maintain *R. rickettsii* through successive without horizontal transmission (Piranda et al., 2011).

The first Brazilian reported of *Rickettsia parkeri* infected *Amblyomma triste* from Atlantic Forest biome (Silveira et al., 2007). Necrotic inoculation eschar forms days following the bite of infected ticks followed a low to moderate spotted fever illness in humans have been related (Silveira et al., 2007). Recently, novel spotted fever group agent (strain NOD), *Parvitarsum* and Atlantic rainforest was reported as the three South American strains of *R. parkeri*, isolated respectively from *Amblyomma nodosum*, *Amblyomma parvitarsum* and *A. ovale* ticks (Nieli-Bastos et al., 2018). *Rickettsia bellii* group represents a distinct basal group isolated from ixodids and argasids ticks in the United States, properly described in 1983. In Brazil, *R. bellii* has been reported infecting 11 tick species, such as *A. ovale*, *A. dubitatum*, *A. aureolatum*, *Amblyomma incisum*, *Amblyomma oblongoguttatum*, *Amblyomma nodosum*, with 14 strains described (Parola et al., 2013; Pacheco et al., 2007; Krawczak et al., 2018). Despite serological evidence of animal natural infection or exposure, *R. bellii* has unknown pathogenicity and never been isolated from vertebrate host (Pacheco et al., 2007; Parola et al., 2013).

*Rickettsia rhipicephali* was first described in 1975 next its isolation from *Rhipicephalus sanguineus* tick collected in dogs of North America (Wikswow et al., 2008). Even though never been associated with human disease, laboratory experiments have shown. induce moderately illness in guinea pigs (Burgdorfer et al., 1978).

*Rickettsia amblyommatis* was first reported in 1981 and has been associated with asymptomatic or relatively mild illnesses in humans of North America (Apperson et al., 2008). In Brazil, have been related in *A. cajennense*, *Amblyomma coelebs*, *Amblyomma longirostre*, *Amblyomma geayi*, and *Amblyomma auricularium* (Berrada et al., 2011; Cohen et al., 2009). High rates of *R. amblyommatis* may also play ecology and epidemiology role by inhibiting of *R. rickettsii* and *R. parkeri*, transovarial transmission (Macaluso et al., 2002). Besides, *R. amblyommatis* infection in guinea pigs showed level of protection against successive infection by *R. rickettsii* (Blanton et al., 2014).

A total of 51/54 (54.4%) studies collected ticks from dogs in different 72 localities of

all Brazilian biomes. *Rhipicephalus sanguineus* was described infesting dogs in 24/54 (44.4%) studies throughout all six Brazilian biomes; *Amblyomma ovale* in 20/54 (37%) studies of all Brazilian biomes; *Amblyomma sculptum* in 15/54 (27.7%) studies of Atlantic Forest, Cerrado, Caatinga and Pantanal biomes; *Amblyomma aureolatum* in 6/54 (11.1%) studies of Atlantic Forest, Cerrado and Caatinga biomes; and *Amblyomma cajennense* in 1/54 (0.018%) study of the Amazon biome were reported (Table 1).

Epidemiologically important vector of *Rickettsia rickettsii* in North and Central America, *Rhipicephalus sanguineus* tick was introduced in Brazil through the colonization period and present in urban areas since 1930s and parasitizing mainly urban dogs (Aragão, 1936; Szabo et al., 2001). *Rh. sanguineus* complex have been recognized as the most widespread ectoparasite of dogs with intra and interspecific morphological variation with reproductive incompatibility. Due, molecular analyses were conducted across ticks collected in Brazilian regions that shows two different clades of *Rh. sanguineus* associated with temperature and geographical coordinates (Caetano et al., 2017). Temperate clade has been restricted to areas with annual mean temperature from 10 to 20°C, whereas the tropical clade has been occupied localities with an annual mean temperature above 20°C (Caetano et al., 2017). Temperate and tropical clades were associated, respectively, with presence and absence of diapause by adult ticks (Caetano et al., 2017).

In general, the greater diversity of ticks finds in rural or suburban areas allowed that rural dogs showed higher infestations and seroprevalence than urban dogs. In urban environments, indoor or outdoor, dogs cannot share areas with carnivores and other mammals. The low diversity of ticks may be associated with acaricide pressure. Due to outdoors life and hunting practice of rural dogs that access to different environments were several wild and domestic animals might be present such the contact with equines and free-roaming capybaras population and environmental exposure to *A. sculptum*. In this area, dogs and other carnivores are the primary hosts of *A. aureolatum*, occurring rate seroprevalence compared to BMF endemic areas (Melo et al, 2011; Labruna et al. 2005). *Amblyomma sculptum* is the tick species predominant degraded areas of Forest Atlantic and due to aggressiveness behavior and unspecific parasitism can be transmit *Rickettsia rickettsii* among wild, domestic animals like a dogs and humans (Szabó et al, 2009; Garcia et al 2011). The complex process of Atlantic Forest Biome fragmentation may be impacting the occurrence of seroprevalence of *R. rickettsii* in dogs in the endemic areas of Brazilian Spotted Fever in Southeastern Brazil. The annual lethality in human in these areas can extent 80% and the distribution according the interaction of domestic and wild carnivores and environmental factors (Scinachi et al. 2016). *Amblyomma aureolatum* have the high susceptibility to *Rickettsia rickettsii* infection, whose the principal host is dog and a known vector of the disease in humans (Pinter et. al, 2004). Due to infection for *R. rickettsia* contribute to lower reproductive and survival in *A. aureolatum* females, can be

affected to the low infection rates (<1%). The horizontal transmission through the participation of canids amplifier vertebrate hosts looks required to maintain the circulation of *R. rickettsii* among ticks in endemic areas (Labruna et al., 2011). Dogs that have free access to the city-forest interface showed frequently parasitism and antibodies for *Rickettsia* spp. and may be responsible for bringing infected ticks to the home environment and increasing the risk of human infection (Viana et al., 2008; Szabó et al., 2013; Moerbeck et al., 2016).

*Amblyomma ovale* ticks were collected from Caatinga biome associated with high-altitude forests. Due to elevated humidity and mild temperatures differs from the vulnerable neighboring areas, is possible that there may be many additional silent BSF (Moerbeck et al., 2016). Originally, the Caatinga Biome consists primarily of xeric shrubland and thorn forest with the low precipitation and humidity regimes of the semiarid ecosystems in northeastern region, the northern part of Minas Gerais State, which is in the southeastern region, comprises to 11% of the Brazil's (Castelletti et al. 2003; Moerbeck et al., 2016). *A. ovale* ticks are identified to be spread in large forest areas along the Atlantic coast of the country (low altitude ≤100m over sea level) where wild carnivores are the primary hosts of adults of *A. ovale* and is recurrent parasites domestic dogs and humans (Barbieri et al., 2015; Labruna et al., 2005). Dogs can be important in the epidemic cycle of this area because the infestation with ticks *A. ovale* and *R. sanguineus* infected with *Rickettsia* sp. strain Atlantic Rainforest, responsible for a milder febrile human disease a typically inoculation eschar (tache noire) at the tick bite site (Spolidorio et al., 2010; Moerbeck et al., 2016). *A. ovale* recovered from dogs was positive for *Rickettsia* sp. strain Atlantic Rainforest in others Atlantic Rainforest areas in in the state of São Paulo, southeast Brazil, and Santa Catarina, southern Brazil. Experimental infections showed that *A. larvae*, nymphs and maybe adults are competent vector to *Rickettsia* sp. strain Atlantic rain forest (Barbieri et al., 2014; Szabó et al., 2013; Krawczak et al., 2016).

Dogs living in Amazon biome can be infested with *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma coelebs* associated with *R. amblyommatis*, suspected to be pathogenic for human (Costa et al, 2017). The Amazon biome is composed by tropical forest with high diversity, characterized the hot and damp weather by levels of precipitation be around 2,000 mm yearly and moderate dry from June to November (Mittermeier et al. 2003; Tourrand et al., 1996). Besides, *R. parkeri*, *R. rhipicephali*. *R. parkeri* have been isolated from *Amblyomma triste* and *R. rhipicephali* was reported in *Haemaphysalis juxtakochi* tick infecting dogs in Amazon biome (Labruna et al. 2005).

Domestic dogs may be involved in translocation of ticks *Amblyomma tigrinum* and *A. ovale* from forest fragments to the peridomicile and domicile. Thus, dog may act as amplifier to the spreading area of the *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, possible agent associated with Spotted Fever in the Pampa biome (Weck et al, 2017). The Pampa Biome

is located below the Tropic of Capricorn, between latitudes 28°00' S and 34°00' S and longitudes 49°30' W and 58°00' W, four well-differentiate seasons and temperate climate. Plains and grasslands with predominant vegetation of tree formations and meager shrub (Berreta et al, 2001).

The greatest exposure of rural dogs to *Rickettsia amblyommatis* or very closely related agent, followed by *R. parkeri*, *R. rickettsii*, *R. rhipicephali* or *R. bellii* in certain fragment of Pantanal biome may be related to living in rural areas, hunting practice and infestation by *Amblyomma* sp. (Amorim et al, 2013). The Pantanal Biome comprises the tropical wetland in which periods of inundation and drying oscillate yearly. Have been characterized by preserved area mixed with exotic pasture and livestock population. The high diversity of mammalian hosts that contributing to involve in complex and dynamic interactions with tick species (Alho et al., 1987; Amorim et al., 2013).

*Amblyomma sculptum* have been the tick specie predominant in preserved areas of Cerrado, generally tapirs, capybaras and horses are their hosts. Due to tick aggressiveness, rural and hunting dogs can be infested by *A. sculptum* (Labruna et al., 2002; Szabó et al., 2007). *R. sanguineus* also had high prevalence in rural dogs, occurring in fences or close human dwellings seems the microenvironmental of urban dogs. Dogs may be suitable host for *A. parvum* adults in Cerrado biome and have been associated with *A. ovale* and *Rh. microplus*, that indicate the approach with bovine pastures (Szabó et al., 2001; Szabó et al., 2007; Szabó et al., 2010). The Cerrado Biome has been described as a savanna ecoregion with subtropical climate and two well-defined seasons: That biome has been biodiversity hot spot composed for deciduous and seasonal vegetation considered despite around half of this original biome has been changed to agriculture in the last 35 years (Souza et al., 2016).

Studies of transition areas has shown that ticks cannot simultaneously maintain separate species of *Rickettsia* by vertical transmission (Costa et al., 2017). In addition to Amazon and Cerrado mixed areas, the natural vector was *A. sculptum* associated with *R. rickettsii* transmission in deciduous and seasonal forests, area of tropical climate of the Caatinga, Pantanal and Atlantic Forest biomes. *Amblyomma sculptum* ticks have been located in areas with or without natural vegetation cover, coinciding with anthropic damage. Different from, in Amazon areas where *A. cajennense* was restricted and commonly infected by *R. amblyommatis*, founded (Costa et al, 2017; Martins et al., 2016). The Amazon Biome have water submerged areas named Varzea an Igapó lands less appropriate for ticks completed a life circle and find the host. This situation is related with low human and canine exposure to genera *Amblyomma* and *Haemaphysalis* (Soares et al, 2014).

Conclusion

A complete understanding of the risk factors for dog infection with *Rickettsia* spp. transmitted by ticks is a critical gap in the current literature. This findings indicate broad variability in seroprevalence to *Rickettsia* species and ticks by biome, study period, and the explanation for these discrepancies, especially in transition areas of biomes, remain unclear.

#### Funding

This work has been supported by the Higher Education Improvement Coordination (CAPES-DS/ protocol number 40001016007P8), Brazil.

#### Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

#### References

- Alho, C.J.R., Júnior, T.E.L., Campos, Z.M.S., Gonçalves, H.C., 1987. Mamíferos da Fazenda Nhumirim, sub-região de Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul. I. Levantamento preliminar de espécies. *Rev. Bras. Zool* 4:151-164.
- Amorim, M.V., Melo, A.L.T., Freitas, A.L.S., 2013. Detection of antibodies anti-*Rickettsia* spp. in dogs and horses in the state of Mato Grosso, Brazil. *Ciências Agrárias* 34(6):3755-3766.
- Apperson, C.S., Engber, B., Nicholson, W.L., Mead, D.G., Engel, J., Yabsley, M.J., Dail, K., Johnson, J., Watson, D.W., 2008. Tick-borne diseases in North Carolina: is “*Rickettsia amblyommii*” a possible cause of rickettsiosis reported as Rocky Mountain spotted fever? *Vector Borne Zoonotic Dis* 8:597-606.
- Araes-Santos, A.I., Moraes-Filho, J., Peixoto, R.M., et al., 2015. Ectoparasite Infestations and Canine Infection by *Rickettsiae* and *Ehrlichiae* in a Semi-Arid Region of Northeastern Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis* 15 (11).
- Aragão, H., 1936. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 31(4):759-843.
- Barbieri, A.R., Moraes-Filho, J., Nieri-Bastos, F.A., et al., 2014. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* 5:848-853.
- Barbieri, J.M., Da Rocha, C.M.B.M., Bruhn, F.R.P., et al., 2015. 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* 52(5):170-1174.
- Berrada, Z.L., Goethert, H.K., Cunningham, J., Telford, S.R., 2011. *Rickettsia rickettsii* (*Rickettsiales: Rickettsiaceae*) in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) from Kansas.

J Med Entomol 48:461-467.

Berreta, E., 2001. Ecophysiology and management response of the subtropical grasslands of Southern America. In Proceedings of the XIX International Grassland Congress 939-946.

Blanton, L.S., Mendell, N.L., Walker, D.H., Bouyer, D.H., 2014. 'Rickettsia amblyommii' induces cross protection against lethal Rocky Mountain spotted fever in a guinea pig model. Vector Borne Zoonotic Dis 14:557-562.

Burgdorfer, W., Brinton, L. P., Krynski, W. L., Philip, R. N., 1978. Rickettsia rhipicephali, a new spotted fever group rickettsia from the brown dog tick, Rhipicephalus sanguineus. In J. Kazar 307-316.

Caetano, R. L., Vizzoni, V. F., Bitencourth, K., Carriço, C., Sato, T. P., Pinto, Z. T., Gazeta, G. S., 2006. Ultrastructural Morphology and Molecular Analyses of Tropical and Temperate "Species" of Rhipicephalus sanguineus sensu lato (Acari: Ixodidae) in Brazil. Journal of Medical Entomology 54(5), 1201-1212.

Cardoso, L.D., Freitas, R.N., Mafra, C., Neves, C.V.B., 2006. Caracterização de Rickettsia spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. Cad. Saúde Pública 22(3):495-501.

Câmara, I.G., 2003. Brief history of conservation in the Atlantic Forest. In: Galindo Leal, CIG (Eds.), The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook. CABS and Island Press, Washington; 31-42.

Castelletti, C.H.M., Santos, A.M.M., Tabarelli, M., et al., 2003. Quanto ainda resta da caatinga? Uma estimativa preliminar. Ecologia e Conservação da Caatinga; 719-734.

Cohen, S.B., Yabsley, M.J., Garrison, L.E., Freye, J.D., Dunlap, B.G., Dunn, J.R., Mead, D.G., Jones, T.F., Moncayo, A.C., 2009. Rickettsia parkeri in Amblyomma americanum ticks, Tennessee and Georgia, USA. Emerg Infect Dis 15:1471-1473.

Costa, A.P., Silva, A.B., Costa, F.B., et al., 2013. A Survey of Ectoparasites Infesting Urban and Rural Dogs of Maranhão State, Brazil. Journal of Medical Entomology 50(3):674-678.

Costa, A.P., Costa, F.B., Labruna, M.B., Silveira, I., 2015. A serological and molecular survey of Babesia vogeli, Ehrlichia canis and Rickettsia spp. among dogs in the state of Maranhão, northeastern Brazil. Braz. J. Vet. Parasitol 24(1)28-35.

Costa, I.R., Araújo, F.S., Lima-Verde, L.W., 2004. Flora e aspectos auto-ecológicos de um enclave de cerrado na Chapada do Araripe, nordeste do Brasil. Acta Bot Bras 18(4): 759-770.

Costa, F.B., Costa, A.P., Moraes-Filho, J., 2017. Rickettsia amblyomma is infecting ticks and exposure of domestic dogs to Rickettsia spp. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. PLoS ONE 12(6).

Cordeiro, M.D., Raia, V.A., Pinter, A., Cunha, N.C., et al., 2015. Seroprevalence of rickettsia spp. and a study of the tick fauna in dogs from the municipality of Seropédica,



- State of Rio de Janeiro. *Semina: Ciências Agrárias* 36(6):3787-3794.
- Cunha, N.C., Fonseca, A.H., Rezende, J., et al., 2009. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the state of Rio de Janeiro. *Pesqui Vet Bras* 29:105-108.
- Dantas-Torres, F. 2010 Biology and ecology of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Parasites & Vectors* 3:26.
- Dantas-Torres, F., Melo, M.F., Figueredo, L.A., Brandão-Filho, S.P., 2009. Ectoparasite infestation on rural dogs in the municipality of São Vicente Férrer, Pernambuco, Northeastern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 18(3):75-77.
- Dantas-Torres, F., Venzal, J.M., Bernardi, L.F., et al., 2012. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. *J. Parasitol.* 98: 36-45.
- Dantas-Torres, F., Onofrio, V., Barros-Battesti, D.M., 2009; The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Syst. Appl. Acarol* 4:30-46.
- Galvão, M.A.M., Lamounier, J.A., Bonomo, E., Tropia, M.S., et al., 2002. Emerging and reemerging rickettsiosis in an endemic area of Minas Gerais State, Brazil. *Cad. Saúde Pública* 18(6): 1593-1597.
- Garcia, M.V., Silva, D.C., Almeida, R.F.C., 2013. Environmentally associated ticks (Acari: Ixodidae) in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22(1): 124-128.
- Hii, S.F., Kopp, S.R., Thompson, M.F., et al., 2012. Canine vector-borne disease pathogens in dogs from south-east Queensland and north-east Northern Territory. *Aust Vet J* 90(4): 130-135.
- Keenan, K.P., Buhles, W.C., Huxsoll Jr, D.L., et al., 1977. Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain spotted fever. *J Infect Dis* 135: 911-917.
- Krawczak, F.S., Nieri-Bastos, F.A., Nunes, F.P., Soares, J.F., Moraes-Filho, J., Labruna, M.B. 2014. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. *Parasit Vectors* 7: 7.,
- Krawczak, F.S., Agostinho, W.C., Polo, G., et al. 2016. Comparative evaluation of *Amblyomma ovale* ticks infected and noninfected by *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest, the agent of an emerging rickettsiosis in Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases* 7: 502-507.
- Krawczak, F.S., Binder, L.C., Oliveira, C.S., Costa, F.B., 2016. Ecology of a tick-borne spotted fever in southern Brazil. *Exp Appl Acarol* 70: 219–229.
- Krawczak, F.S., Labruna, M.B., Hecht, J.A., Paddock, C.D., Karpathy, S.E., 2018. Genotypic Characterization of *Rickettsia bellii* Reveals Distinct Lineages in the United States and South America. *BioMed Research International* 1-8.
- Labruna, M.B., Homem, V.S.F., Heinemann, M.B., Neto, J.S.F., 2000. Ticks (Acari:

- Ixodidae) Associated with Rural Dogs in Uruará, Eastern Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomol.* 37(5): 774-776.
- Labruna, M.B., Souza, S.L.P., Guimarães J.S., Pacheco R.C. 2001. Prevalência de carrapatos em cães de áreas rurais da região norte do Estado do Paraná. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 53: 553-556.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Bouyer, D.H., McBride, J., et al. 2004. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *J Med Entomol.* 41: 1073-1081.
- Labruna, M.B., Jorge, R., Sana, D., Jacomo, A., et al. 2005. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology* 36: 149-163.
- Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Camargo, E.P. et al. 2005a. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondônia, Brazil. *Vet Parasitol.* 127:169-174
- Labruna, M.B., Camargo, L.M.A., Terrassini, F., et al., 2005b. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Syst Appl Acarol.* 10:17-32.
- Labruna, M.B., Pacheco RC, Richtzenhain LJ, et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* ticks in the state of São Paulo, Brazil. *Appl Environ Microbiol.* 2007;73: 869-73.
- Labruna, M.B., Horta, M.C., Aguiar, D.M., Cavalcante, G.T., 2007. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 7(2): 249-255.
- Labruna, M.B., Venzal, J.M., 2009a. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. *Acta Parasitol* 54: 355-363.
- Labruna, M.B., Kamakura, O., Moraes-Filho, J., et al. 2009b. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 15(3).
- Labruna M.B., Ogrzewalska, M., Soares, J.F., et al., 2011. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerg Infect Dis.* 17: 829-834.
- Labruna, M.B., Krawczak, F.S., Gerardi, M., Binder, L.C., Barbieri, A.R.M., Paz, G.F., et al., 2017. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from the tick *Amblyomma sculptum* from a Brazilian spotted fever-endemic area in the Pampulha Lake region, southeastern Brazil. *Vet Parasitol Reg* 8:82–5.
- Lemos, E.R.S., Machado, R.D., Pires, F.D.A., Machado, S.L. 1997. *Rickettsiae*-infected Ticks in an Endemic Area of Spotted Fever in the State of Minas Gerais, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 92(4): 477-481.
- Levin, M.L., Killmaster, L.F., Zemtsova, G.E., Ritter, J.M., Langham, G., 2014. Clinical Presentation, Convalescence, and Relapse of Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs Experimentally Infected via Tick Bite. *PLoS ONE.* 9(12), e115105.
- Luz, H.R., Mathias, C., Faccini, J.L.H., 2004. Carrapatos parasitando cães em uma área

- insular do estado do Rio de Janeiro, RJ, Brasil. *Rev. Bras. Med. Vet.* 36(4): 437-442. Luz, H.R., McIntosh, D., Furusawa, G.P., et al., 2016. Infection of *Amblyomma ovale* with *Rickettsia* species Atlantic rainforest in Serra do Mar, São Paulo State, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis* [Internet] 7(6): 1265-7.
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M., Azad, A.F., 2002. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *J Med Entomol* 39:809-813.
- Martins, T.F., Barbieri, A.R.M., Costa, F.B. et al., 2016. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). *Parasites & Vectors* 9:186.
- Martins, M.E.P., Brito, W.M.E.D., Labruna, M.B., Moraes-Filho, J. et al., 2016. Inquérito Epidemiológico de suposto foco de Febre Maculosa. *Cienc. anim. bras.*; 17(3): 459-471.
- Mazioli, R., Szabó, M., Mafra, C., 2012. *Amblyomma nodosum* (Acari: Ixodidae) parasitizing a domestic dog in Colatina, Espírito Santo, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 21(4): 428-429.
- Melo, A.L.T., Martins, T.F., Horta, M.C. et al., 2011. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases* 213-218.
- Milagres, B.S., Padilha, A.F., Barcelos, R.M. et al., 2010. *Rickettsia* in synanthropic and domestic animals and their hosts from two areas of low endemicity for Brazilian spotted fever in the Eastern Region of Minas Gerais, Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 83(6): 1305-1307.
- Moerbeck, L., Vizzoni, V.F., Machado-Ferreira, E., et al., 2016. *Rickettsia* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. *Journal of Medical Entomology* 53(6):1-9.
- Moura-Martinião, N.O., Machado-Ferreira, E., Cardoso, K.M. et al., 2014. *Rickettsia* and vector biodiversity of spotted fever focus, atlantic rain forest biome, Brazil. *Emerg. Infect. Dis* 20: 498-500.
- Nava, S., Beati, L., Labruna, M.B. et al., 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* 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*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 5:252-276.
- Nieri-Bastos, F.A., Marcili, A., De Sousa, R., Paddock, C.D., Labruna, M.B., 2018. Phylogenetic evidence for the existence of multiple strains of *Rickettsia parkeri* in the New World. *Appl Environ Microbiol.* 84:e02872-17.
- Norment, B.R., Burgdorfer, W. 1984. Susceptibility and reservoir potential of the dog to spotted fever-group rickettsiae. *Am J Vet Res*; 45:1706–1710.

- Ogrzewalska, M., Saraiva, D.G., Moraes-Filho, J. et al., 2012. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology* 139(10):1283-1300.
- Otomura, F.H., Sangioni, L.A., Pacheco, R.C., Labruna, M.B., 2010. Anticorpos anti-rickettsias do grupo da febre maculosa em equídeos e caninos no norte do Estado do Paraná, Brasil. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(3):761-764.
- Pacheco, R.C., Horta, M.C., Moraes-Filho, J., Ataliba, A.C., Pinter, A., Labruna, M.B., 2007. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Sao Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. *Biomedica* 27:364 -371.
- Paddock, C.D., Brenner, O., Vaid, C., et al., 2002. Short report: Concurrent Rocky Mountain spotted fever in a dog and its owner. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 66(2): 197-199.
- Parola, P., Davoust, B., Raoult, D., 2005. Tick and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Vet. Res.* 36: 469-492.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., et al., 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 657-702.
- Pena, D.C.H., Mafra, C.L., Calic, S.B., 2009. Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. *Clin Microbiol Infect.* 15(2): 243–244.
- Pinter, A., Dias, R.A., Gennari, S.M., et al., 2004. Study of the seasonal dynamics, life cycle and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 41: 324-332.
- Pinter, A., Labruna, M.B., 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Ann N Y Acad Sci.* 1078: 523-529.
- Pinter, A., Horta, M.C., Pacheco, R.C., Moraes-Filho, J., 2008. 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*, 24(2): 247-252.
- Piranda, E.M., Faccini, J.L.H., Pinter, A., et al., 2008. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103(7):696-701.
- Ribeiro, V.L.S., Weber, M.A., Fetzer, L.O., Vargas, C.R.R., 1997. Espécies e prevalência das infestações por carrapatos em cães de rua da cidade de Porto Alegre, RS, Brasil. *Cienc. Rural [online]* 27(2): 285-289.
- Rotondano, T.E.F., Krawczak, F.S., Barbosa, W.O., Moraes-Filho, J., 2017. Ehrlichia canis and Rickettsia spp. in dogs from urban areas in Paraíba state, northeastern Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 26(2): 211-215.
- Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C.B., et al., 2005. Rickettsial infection in animals

- and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerg Infect Dis.* 11(2):265-70.
- Saito, T.B., Cunha-Filho, N.A., Pacheco, R.C., 2008. Canine Infection by Rickettsiae and Ehrlichiae in Southern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79(1): 102-10.
- Scinachi, C.A., Gabriela, A.C.G., Takeda, L., et al., 2016. Association of the occurrence of Brazilian Spotted Fever and Atlantic Rain Forest fragmentation in the Sao Paulo Metropolitan Region, Brazil. *Acta Tropica* 166: 225-233.
- Selbach, J.F., Leite, J.R.S.A., 2008. Meio ambiente no Baixo Parnaíba: olhos no mundo, pés na região. São Luis: EDUFMA.
- Silva, M.E., Ribeiro, R.R., Costa, J.O., Moraes-Filho, J., 2000. Prevalência de anticorpos anti-Rickettsia spp. em cães da cidade de Belo Horizonte, MG. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 62(4):1007-1010.
- Silveira, I., Pacheco, R.C., Szabo, M.P., Ramos, H.G., Labruna, M.B., 2007. Rickettsia parkeri in Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1111-1113.
- Soares, H.S., Camargo, L.M.A., Gennari, S.M. et al., 2014. Survey of canine tick-borne diseases in Lábrea, Brazilian Amazon: 'accidental' findings of Dirofilaria immitis infection. *Braz. J. Vet. Parasitol.*; 23(4): 473-480.
- Souza, R.C., Mendes, I.C., Reis-Junior, F.B., Carvalho, F.M., Nogueira, M.A., Vasconcelos, A.T.R., Hungria, M., 2016. Shifts in taxonomic and functional microbial diversity with agriculture: How fragile is the Brazilian Cerrado? *BMC Microbiology* 16(1).
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Mantovani, E., et al., 2010. Novel spotted fever group rickettsioses, Brazil. *Emerg Infect Dis* 16: 521-523.
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Machado, R.Z. et al., 2010. Survey for tick-borne zoonoses in the State of Espírito Santo, Southeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 83(1):201-206.
- Spolidorio, M.G., Labruna, M.B., Mantovani, E. et al., 2010. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 16(3): 521.
- Spolidorio, M.G., Minervino, A.H.H., Valadas, S.Y.O.B., Soares, H.S., et al., 2013. Serosurvey for tick-borne diseases in dogs from the Eastern Amazon, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22(2):214-219.
- Streck, E.V., Kämpf, N., Dalmolin, R.S.D. et al., 2008. Solos do Rio Grande do Sul. EMATER/RS-ASCAR 2 ed.
- Szabó, M.P.J., Cunha, M., Santos, A.P. et al., 2001. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with domestic dogs in Franca region, São Paulo, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 25:10-11.
- Szabó, M.P.J., Olegário, M.M.M., Santos, A.L.Q., 2007. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. *Exp. Appl. Acarol.* 43, 73-84.
- Szabó, M.P.J., Labruna, M.B., Garcia, M.V. et al., 2009. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasit.* 103, 57-72.

- Szabó, M.P.J., de Souza, L.G.A., Olegário, M.M.M. et al., 2010. Ticks (Acari: Ixodidae) on Dogs from Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. *Transboundary and Emerging Diseases* 57:72-74.
- Szabó, M.P.J., Pinter, A., Labruna, M.B., 2013a. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12: 27.
- Szabó, M.P.J., Nieri-Bastos, F.A., Spolidorio, M.G. et al., 2013. 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. *Parasitol.* 140:719-728.
- Vianna, M.C.B., Horta, M.C., Sangioni, L.A. et al. 2008. Rickettsial spotted fever in capoeirão Village, Itabira, Minas Gerais, Brazil. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo* 50(5): 297-301.
- Weck, B., Dall'Agnol, B., Souza, U. et al. 2017. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma dubitatum* ticks in a spotted fever focus from the Brazilian Pampa. *Acta Tropica*; 171: 182-185.
- Wikswa, M.E., Hu, R., Dasch, G.A., Krueger, L., Arugay, A., Jones, K., Hess, B., Bennett, S., Kramer, V., Ereemeeva, M.E., 2008. Detection and identification of spotted fever group rickettsiae in *Dermacentor* species from southern California. *J. Med. Entomol.* 45: 509-516.

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo relatou análises sorológicas e moleculares para *Rickettsia* spp. em carrapatos e javalis, cães de caça e seres humanos controladores de javalis no Brasil. Em relação a soropositividade para *Rickettsia* spp., essa foi maior em javalis, quando comparados a cães e seres humanos, porém semelhante entre esses. Apesar dos resultados mostrarem aparente soropositividade maior em seres humanos controladores da região sul do Brasil, as diferenças não foram estatisticamente significativas. A diferença de soropositividade entre javalis do sul e centro-oeste podem estar associadas às espécies dominantes de carrapatos relacionados, ou seja, o *Amblyomma sculptum* no centro-oeste e *Amblyomma brasiliense* no sul do Brasil. A menor soropositividade rickettsial em javalis, cães de caça e seres humanos controladores na região sul pode ser resultado da rara infecção rickettsial em carrapatos de *A. sculptum* em áreas consideradas não-endêmicas para a Febre Maculosa Brasileira (PACHECO et al., 2009; COSTA et al., 2017; KRAWCZAK et al., 2014; LABRUNA et al., 2017). Isso justifica todos os carrapatos *A. sculptum* testados no presente trabalho serem negativos para *Rickettsia* spp. nas análises moleculares. *Amblyomma sculptum* tem sido considerada a espécie de carrapato predominante em áreas degradadas de Mata Atlântica e Cerrado, e devido ao seu comportamento agressivo e parasitismo não-específico, pode ser relacionada a transmissão de *Rickettsia rickettsii* entre animais domésticos, selvagens e seres humanos em áreas endêmicas (SZABÓ et al., 2009; GARCIA et al. 2011). Por outro lado, a maior soropositividade de javalis, cães de caça e até de seres humanos controladores no sul do Brasil pode sugerir que as populações de *Amblyomma brasiliense* dessa região seriam infectadas por uma ou mais riquetsias do Grupo da Febre Maculosa Brasileira, ainda a serem identificadas em estudos posteriores. Nenhum representante de *Amblyomma brasiliense* foi positivo para *Rickettsia* spp. no presente trabalho.

As espécies de carrapatos coletadas em javalis, *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma brasiliense*, são associadas a transmissão de *Rickettsia* spp. para cães e seres humanos (MARTINS et al., 2016; KRAWCZAK et al., 2014). Uma vez que esses carrapatos foram relacionados principalmente a áreas naturais e naturais degradadas no Brasil, atividades de caça podem estar associadas a uma maior sororeatividade para *Rickettsia* spp., devido a maior exposição a *Amblyomma* spp. Não surpreendentemente, indivíduos de áreas rurais que visitam áreas de mata, rios e cachoeiras mostraram maior incidência de infecção por *Rickettsia* spp. e casos de febre maculosa (DE OLIVEIRA et al., 2016). Um total de sete seres humanos controladores de javalis da região centro-oeste no estavam parasitados por carrapatos *A. sculptum* após a atividade de caça, presente estudo. O *Amblyomma sculptum* é o carrapato humano mais frequente no Brasil, e também um dos principais vetores da *R. rickettsii* no país (KRAWCZAK et al., 2014;

MARTINS et al., 2016). Esses achados alertam que os seres humanos controladores de javalis podem ser um grupo de risco potencial para febre maculosa no Brasil. Infelizmente, nenhuma informação foi encontrada sobre os hábitos de caça de um caso humano notificado e não-fatal de febre maculosa em uma área próxima do local de estudo no sul do Brasil e em outros dois casos notificados na área próxima ao centro-oeste do Brasil (BRASIL, 2018), o que dificulta a análise de risco para esta atividade em relação a exposição para *Rickettsia* spp.

Todos os carrapatos coletados de javalis na unidade de conservação Parque Estadual de Vila Velha-PR foram identificados como *Amblyomma brasiliense*, provavelmente devido à alta alta umidade relativa e a temperaturas mais baixas encontradas nesse fragmento conservado de do bioma Mata Atlântica, características importantes para o desenvolvimento desses carrapatos (SANCHES et al., 2008), mantidas naturalmente nessas áreas por taiassuídeos (*Pecari tajacu*) como hospedeiros primários. No entanto, a presença de carrapatos nos estágios de adulto e ninfa em javalis podem aludir a sobreposição de nicho ecológico com taiassuídeos, aliada a maior área de superfície corporal, e sugeri-los como hospedeiros competentes de *A. brasiliense*. Embora *A. brasiliense* tenha sido considerado agressivo para seres humanos (ARAGÃO, 1936; GUGLIELMONE et al., 2006) e tal cenário possa ter impacto na propagação de mais carrapatos e doenças transmitidas por carrapatos, a transmissão de *R. rickettsii* por carrapatos *A. brasiliense* tem sido observada apenas sob condições experimentais (DIAS et al., 1939) e ausente em levantamentos moleculares em ambientes naturais (SABATINI et al., 2010; LUZ et al., 2017; LUZ et al. ; 2018; SZABÓ et al., 2013). Não surpreendentemente, nenhum *A. brasiliense* testado molecularmente por PCR padrão no presente trabalho foi positivo para *Rickettsia* spp.

Cães rurais tem sido frequentemente relatados com infestação por carrapatos e doenças transmitidas por vetores (PIRANDA et al., 2008; SPOLIDORIO et al. 2010; WECK et al., 2016). Visto que podem ocupar o mesmo ambiente do ser humano, há possibilidade de transporte de carrapatos para o ambiente peridomiciliar, o que pode aumentar o risco de exposição a bactérias do gênero *Rickettsia* spp. para seres humanos, ou quando somente forem previamente expostos, tornam-se sentinelas para a Saúde Pública de doenças transmitidas por vetores (PIRANDA et al., 2008). Além disso, há evidências de que os cães podem desempenhar o papel de amplificadores de *R. rickettsii*, principalmente em áreas endêmicas na região sudeste do Brasil com o bioma Mata Atlântica, demonstrados em um estudo experimental no Brasil (PIRANDA et al., 2008). Nesse estudo, a competência vetorial de *Amblyomma aureolatum* foi confirmada, uma vez que ninfas e adultos foram efetivamente infectados após repasto em cães, e foram capazes de transmitir a *R. rickettsii* para cobaias (*Cavia porcellus*) (PIRANDA et al., 2008). A transmissão transovariana de *R. rickettsii* foi observada em fêmeas ingurgitadas que



havia sido infectadas ainda quando ninfas. Cães de caça amostrados no presente estudo foram encontrados apenas com *A. aureolatum*, o que corrobora com estudos anteriores com cães em áreas rurais próximas a fragmentos de floresta tropical, e que realizavam a atividade de caça (LABRUNA et al., 2004; PINTER et al., 2004; COSTA et al., 2013). Como mencionado, os carrapatos da espécie *Amblyomma aureolatum* mostraram alta suscetibilidade à infecção por *R. rickettsii* e cães como um dos hospedeiros mais importantes em áreas endêmicas de febre maculosa (PINTER et al., 2004). Apesar disso, a infecção por *R. rickettsii* pode acarretar menor sobrevivência e taxa de reprodução em fêmeas de *A. aureolatum*, resultando em baixas taxas de infecção (<10%) em condições naturais (LABRUNA et al., 2011). No presente estudo, embora essa suposição possa estar associada à ausência de DNA de riquetsial nos exemplares de *A. aureolatum*, uma pequena amostra de carrapatos foi testada, limitando as conclusões.

Um provável papel dos javalis na eco-epidemiologia das riquetsioses tem sido sugerido ao redor do mundo. Na Catalunha, Espanha, 12/23 (52,2%) e 19/23 (82,6%) de javalis foram soropositivos para *Rickettsia slovaca*, classificados no GPL e associados a carrapatos *Dermacentor marginatus* (ORTUÑO et al., 2007). No Mississippi, EUA, 17/58 (29,3%) suídeos selvagens foram soropositivos para o *Rickettsia parkeri* (CASTELLAW et al., 2011). Os javalis podem transportar e disseminar carrapatos de capivaras de seus habitats originais para outros ecossistemas. Na Flórida, EUA, javalis foram observados em diferentes ecossistemas e percorrendo longas distâncias, o que poderia aumentar o contato com várias espécies de carrapatos em seus diferentes microhabitats preferenciais (MERRILLA et al., 2018). Além das exigências de energia relacionadas às incursões em longas distâncias, os suídeos asselvajados também possuem maior área corpórea em comparação com as capivaras, o que pode ser uma característica importante para a manutenção e disseminação de carrapatos por javalis no Brasil (MACE et al., 1983). No total, essa distribuição sobreposta de javalis e capivaras no Brasil pode levar à disseminação sinérgica de carrapatos. Assim, embora as capivaras sejam reconhecidas como o principal hospedeiro da família *Ixodidae*, importantes na transmissão de *Rickettsia* spp., e como hospedeiros amplificadores de *Rickettsia rickettsii* no Brasil (HORTA et al., 2007; LABRUNA et al., 2009), futuros estudos devem ser realizados para estabelecer plenamente o papel dos javalis como possíveis hospedeiros amplificadores de *Rickettsia* spp.

Devido à alta capacidade adaptativa dos javalis, invadindo áreas intactas e degradadas dos seis biomas brasileiros, incluindo a Mata Atlântica (floresta tropical), Cerrado (savana tropical), Pampas (campos abertos), Pantanal (planícies), Amazônia (floresta tropical) e Caatinga (semi-árido), conforme recentemente reconhecido pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento do Brasil (BRASIL et al., 2018). Como já mencionado, a febre maculosa brasileira e outros agentes riquetsiais supostamente se

sobrepõem à ocorrência de capivaras e, portanto originais da capivara, atualmente restritas a matas ciliares e savanas inundadas sazonalmente, como a Mata Atlântica, Pantanal e Cerrado (MOREIRA et al., 2019).

Nesse cenário, há a hipótese de que os javalis podem disseminar os carrapatos e doenças transmitidas por eles para outros biomas brasileiros que não apresentam as capivaras, como por exemplo o bioma Caatinga, encontrado no norte, nordeste e sudeste do Brasil. Além disso, o Ministério do Meio Ambiente no Brasil alertou sobre a ineficácia do controle da população natural de javalis por predadores nativos, principalmente devido à baixa população de espécies já criticamente ameaçadas como onças pardas (*Puma concolor*) e jaguatiricas (*Panthera onca*). No Brasil, grupos de javalis pesando até 220 kg são frequentemente encontrados, defendendo-se dos ataques com potenciais feridas por mordeduras e com suas presas (IBAMA et al., 2017).

Como as bactérias do gênero *Rickettsia* spp normalmente infectam e permanecem no interior das células endoteliais do hospedeiro, a detecção molecular geralmente falha ao investigar amostras de sangue (LA SCOLA, RAOULT et al., 1997). Até mesmo em capivaras submetidas a infestação experimental com carrapatos infectados por *R. rickettsii*, o DNA riquetsial foi detectado por PCR em apenas uma de 32 (3,1%) amostras de sangue de um grupo de capivaras infectadas, e apesar dos títulos sorológicos até 16.384 (SOUZA et al., 2009). No mesmo estudo, apesar dos títulos sorológicos de até 32.768, a inoculação intraperitoneal direta não foi suficiente para fornecer DNA riquetsial detectável em amostras de sangue. Assim, no presente estudo, não foi realizada a investigação molecular de *Rickettsia* spp. em amostras de sangue de javalis, cães de caça e caçadores.

## 6 CONCLUSÕES FINAIS

O presente estudo relatou pela primeira vez análises sorológicas e moleculares para *Rickettsia* spp em carrapatos e javalis, cães de caça e seres humanos controladores de javalis ao redor do mundo, e os resultados de soropositividade para *Rickettsia* spp. foi maior em javalis quando comparados a cães e seres humanos, porém semelhante entre cães e seres humanos.

Pela primeira vez, carrapatos *A. sculptum* coletadas em javalis foram identificados clima subtropical do sul do Brasil. Apesar de os seres humanos terem sido considerados menos expostos aos carrapatos (e, portanto, a riquetsias) que os animais, atividades humanas específicas, como a de controle populacional de javalis, podem aumentar o risco de exposição e, conseqüentemente, a ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos.

Os javalis podem ainda transportar e disseminar carrapatos de capivaras de seus

habitats originais para outros ecossistemas. Além da disseminação para outros ecossistemas, diferentes de áreas de beira de rios, os javalis podem levar carrapatos e doenças transmitidas por vetores para biomas não que contam com a presença de capivaras.

Seres humanos controladores e seus cães de caça foram parasitados por exemplares de carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. após atividades de caça. Esses achados alertam que os seres humanos controladores de javalis e cães de caça podem ser um grupo de risco para febre maculosa no Brasil.

As atividades de controle populacional dos javalis pela caça (Instrução Normativa IBAMA 03/2013) podem aumentar o risco de exposição dos controladores e seus cães a estes carrapatos, com consequente exposição à Febre Maculosa Brasileira.

Ainda, esses resultados e discussão podem fornecer informações importantes para o planejamento de ações públicas direcionadas a prevenção de doenças transmitidas por vetores em áreas sobrepostas capivaras, javalis, cães de caça e seres humanos controladores de javalis. O presente estudo sugere que houve perda de habitat de espécies nativas devido a presença de javalis na Unidade de Conservação Parque Estadual de Vila Velha, inclusive com informes de catetos buscando alimento em plantações de cereais presentes na zona de amortecimento da UC. A presença maciça dos estágios de ninfas e adultos do carrapato *Amblyomma brasiliense* suportam a sugestão de sobreposição de nicho ecológico de javalis e catetos, hospedeiros naturais dessa espécie de carrapatos

Novos estudos podem ser necessários para explorar a habilidade de javalis em infectar carrapatos e de fazer parte do ciclo de transmissão de *Rickettsia* spp.

## 7 REFERÊNCIAS

- ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1936;31(4):759-844.
- ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Lista e chave para os representantes da fauna Ixodológica Brasileira. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1961; 59:115-129.
- BARBIERI, A. R.; MORAES-FILHO, J.; NIERI-BASTOS, F. A. et al. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. Ticks Tick Borne Dis. 2014;5:848-853.
- BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M., BECHARA, G.H., 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases/Butantan, São Paulo, p. 223.
- BRASIL. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply (MAPA). Programa Nacional de 1796 Sanidade dos Suínos – PNSS. Instrução Normativa nº 47, 18 June 2004. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil, Brasília, 2004. Available from: [http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-1799\\_setoriais/aves-e-suinos/2018/copy\\_of\\_37a-ro/psa-e-psc.pdf](http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-1799_setoriais/aves-e-suinos/2018/copy_of_37a-ro/psa-e-psc.pdf). Cited 01 March 2019.
- BRASIL. Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Paraná. 2006. [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema\\_nacional\\_vigilancia\\_saude\\_pr\\_5ed.pdf](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/sistema_nacional_vigilancia_saude_pr_5ed.pdf). Accessed 14 Oct 2018.
- BRASIL. Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - SinanNet. <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/dh?sinannet/fmaculosa/bases/febremaculosaabrnet.def>. Accessed 14 Oct 2014.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente Mata Atlântica. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>. Acesso em 03 maio 2016. BYWATER, K.A, et. al. Litter size and latitude in a large mammal: The wild boar *Sus scrofa*. Mammal Review. 40: 212– 220, 2010.
- Brazilian Institute of Environment and Natural Renewable Resources – IBAMA. Plano Nacional de Prevenção, Controle e Monitoramento do Javali (*Sus scrofa*) no Brasil. 2017. Brasília: Ministério do Meio Ambiente e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Available from: <http://www.ibama.gov.br/phocadownload/javali/2017/2017-PlanoJavali-2017.2022.pdf>. Cited 0. March 2019.
- BURGDORFER, W. Hemolymph test. American Journal of Tropical Medicina and Hygiene. 19(6): 1010-1014, 1970.

- CASTELLAW, A. H.; CHENNEY, E. F.; VARELA-STOKES, A.S. Vector Borne Zoonotic Dis. 2011;11(4):439-42.
- COSTA, A.P.; SILVA, A.B.; COSTA, F.B.; XAVIER, G.S., et al. A survey of ectoparasites infesting urban and rural dogs of Maranhão state, Brazil. J Med Entomol. 2013;50(3):674-678.
- COSTA, F.B.; DA COSTA, A.P.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; SOARES, H.S.; RAMIREZ, D.G., et al. Rickettsia amblyommatis infecting ticks and exposure of domestic dogs to Rickettsia spp. in an Amazon-Cerrado transition region of northeastern Brazil. PLoS One. 2017;12(6): e0179163. doi: 182010.1371/journal.pone.0179163.
- CHAPMAN, A. S. et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis— United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. MMWR Recomm Rep. 55:1– 27, 2006.
- DE OLIVEIRA, S.; GUIMARÃES, J.N.; RECKZIEGEL, G.C.; NEVES, B.M.C. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases. 2016;22:22.
- DEBERDT, A. J.; SCHERER, S. B. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. 2 ed. Goiás: Artigos Técnico-científicos, 2007. DIAS E, MARTINS AV. Spotted fever in Brazil. A summary. American Journal of Tropical Medicine. 1939;19:103-108.
- FERRAZ, K.; DE BARROS FERRAZ S.; MOREIRA, J.; COUTO, H.; VERDADE L. Capybara (Hydrochoerus hydrochaeris) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis. Journal of Biogeography. 2007;34(2):223- 230.
- FRANKENBERG, V. S. T. Levantamento e validação da Portaria 138/02 e Instrução Normativa 25/04, que regulamentaram o controle do javali (Sus scrofa) no Rio Grande do Sul no período compreendido entre 2003 e 2005. Produto PNUD, Projeto BRA/01/037, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, 2005.
- HORTA, M. C. et. al. Rickettsia infection in five áreas of the state of São Paulo, Brazil. Memórias Oswaldo Cruz. 102(7):793 -801, 2007. HALLIDAY JEB, MEREDITH AL, KNOBEL DA, SHAW DJ. A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. J. R. Soc. Interface. 2007;4:973-984.
- GUGLIELMONE, A.A; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA M. B. et al. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Experimental & Applied Acarology. 2006;40(2):83-100. Horta MC, Labruna MB, Pinter A, Linardi PM, Schumaker TTS. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(7): 793-801.
- JACKSON J. JABALÍES Y CHANCHOS SALVAJES. Presencia. 3(17):8-10, 1989. IBAMA.

- Instrução Normativa número 3 de 31 de janeiro de 2013 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2013. IBGE, 2010. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/>
- KRAWCZAK, ET. AL. Ecology of a tick-borne spotted fever in Southern Brazil. *Experimental and Applied Acarology*. 69(5), 2016.
- KRAWCZAK, F.S.; NIERI-BASTOS, F.A.; NUNES, F.P.; SOARES, J.F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. *Parasit Vectors*. 2014;7: 7. doi: 10.1186/1756-3305-7-7.
- LABRUNA, M. B. ET. AL. *Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommi* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 41:1073-1081, 2004. LABRUNA, M.B., et. al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, western Amazon, Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis*; 7:249–255, 2007.
- LABRUNA, M.B. et al. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 15(3): 458-460, 2009.
- LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann N Y Acad Sci*. 1166:156– 166, 2009. LABRUNA, M. B. et. al. Genetic identification of rickettsial isolates from fatal cases of Brazilian spotted fever and comparison with *Rickettsia rickettsii* isolates from the American continents. *J Clin Microbiol* 52:3788–379, 2014. LABRUNA, M. B., et. al. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. *Vector Born and Zoonotic Disease*. 7: 249-256, 2007a.
- LABRUNA, M. B., et al. Infection by *Rickettsia bellii* and Candidatus “*Rickettsia amblyommi*” in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. *Microb. Ecol*. 54:126–133, 2007b.
- LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol*. 1997;35(11): 2715–2727. pmid: 9350721.
- LUZ, H.R.; FACCINI, J.L.H.; MCINTOSH, D. Molecular analyses reveal an abundant diversity of ticks and rickettsial agents associated with wild birds in two regions of primary Brazilian Atlantic Rainforest. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2017;8:657-665.
- LUZ, H.R.; FURUSAWA, G.P.; FLAUSINO, W.; MCINTOSHA, D. Proposed description of the natural life cycle of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) in a primary Atlantic rainforest environment in Brazil. *Systematic & Applied Acarology*. 2018;23(6): 1138 1147.
- LE MOS, E.R.S. et. al. Spotted fever in Brazil: an epidemiological study and description of

- clinical cases in an endemic area in the state of Sao Paulo. *Am. J. Trop. Med.* 65: 329–334, 2001.
- LOWE, S., BROWNE, M. BOUDJELAS, S., DE POORTER, M. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group, Auckland, 2000.
- MACE, G.M.; HARVEY, P.H. Energetic constraints on homerange size. *American Naturalist*. 1983;121:120-132.
- MARTINS, T.F.; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1(2): 75-99, 2010. MARTINS, T.F. 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*. 9:186, 2016. MARTINS TF, ONOFRIO V.C., BARROS-BATTESTI D.M., et al. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. *Ticks Tick Borne Dis*. 2010;1(2):75-99.
- MARTINS, T.F.; BARBIERI, A.R.M.; COSTA, F.B.; TERASSINI, F.A. 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.
- MCNEILL, W.H. *Plagues and Peoples*. Anchor Books, New York, 2010.
- Merhej, V.; Raoult. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2011;86:379-405.
- MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2011;86:379-405.
- MERRILLA, M.M.; BOUGHTONB, R.K.; LORDC; C.C. Wild pigs as sentinels for hard ticks: A case study from south-central Florida. *IJP: Parasites and Wildlife*. 2018;7:161-170.
- MORAES-FILHO, J. et al. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of Sao Paulo, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 9: 73–78, 2009.
- MOERBECK, L.; VIZZONI, V.F.; MACHADO-FERREIRA, E. et al. Rickettsia (Rickettsiales: Rickettsiaceae) Vector Biodiversity in High Altitude Atlantic Forest Fragments Within a Semiarid Climate: A New Endemic Area of Spotted-Fever in Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 2016;53(6):1-9.
- MOREIRA, J.R.; MACDONALD, D.W. Técnicas de manejo de capivaras e outros grandes roedores na Amazônia. Pp. 186-213 in C. Valladares-Padua, R. E. Bodmer & L. Cullen Jr. (eds.).
- Manejo e Conservação de Vida Silvestre no Brasil. Sociedade Civil Mamirauá. Available

from:

<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=185786&biblioteca=vazio&busca=>

assunto:Amaz%C3%B4nia&qFacets=assunto:Amaz%C3%B4nia&sort=&paginacao=t&paginaAtual=69. Cited 01 March 2019.

OGRZEWALSKA, M. ET. AL. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology*. 139 (10): 1283-1300, 2012.

OLIVEIRA, P. R. et al. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedr Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 92, n. 4, p. 295-301, 2000.

OLIVEIRA, E. Monitoramento de *Sus Scrofa* (Mammalia, Suidae) no Parque Estadual de Vila Velha, Paraná, Brasil. *Coletânea de Pesquisas Parques Estaduais de Vila Velha, Cerrado e Guartelá*. Instituto Ambiental do Paraná (IAP), 2011.

ORTUÑO, A.; QUESADA, M.; LÓPEZ-CLAESSENS, S.; CASTELLÀ, J. et al. The Role of Wild

Boar (*Sus scrofa*) in The Eco-epidemiology of *R. slovacia* in Northeastern Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2007;7(1):59-64.

PACHECO, R.C.; HORTA, M.C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T.F.; NARDI, M.S.;

et al. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2009;42(3): 351-353.

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat, *Clin. Infect. Dis*. 2001;32:897-928.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenge in gold concepts. *Clin. Microbiol. Rev*. 2005;18:719-756.

Pedrosa F, Salerno R, Padilha Fvb, Galetti M. Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. *Natureza & Conservação*. 2015;13(1):84-87.

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). *J Med Entomol*. 2004;41:324-32.

POLO, G.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA F. Satellite hyperspectral imagery to support tick borne infectious diseases surveillance. *PLoS ONE*. 2015;0119190.

POLO, G.; MERA ACOSTA, C., LABRUNA, M.B.; FERREIRA F. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017;11(6):0005613.

RAMOS, V.N.; PIOVEZAN, U.; FRANCO, A.H.A.; OSAVA, C.F. et. al. Feral pigs as host for



- Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) populations in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 2014; 64:393-406.
- ROSA, C.A.; WALLAU, M.O.; PEDROSA, F. Hunting as the Main Technique Used to Control Wild boars in Brazil. *Wildlife Society Bulletin.* 2018;42(1):111-118.
- SOCOLOVSKI, C.; MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P., et al. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* with *Rickettsia conorii conorii*. *Clin. Microbiol. Infect.* 2005;15(2):324- 325.
- SABATINI, G.A.; 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 Sao Paulo, Brazil. *Journal of Medical Entomology.* 2010;(47)913-916.
- SANCHES, G.S.; BECHARA, G.H.; GARCIA, M.V., et al. Biological aspects of *Amblyomma brasiliense* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp Appl Acarol.* 2008;44(1):43-8.
- SZABÓ, M.P.J.; LABRUNA, M.B.; GARCIA, M.V., Et al. Ecological aspects of free-living ticks (Acari:Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of Southeastern Brazil. *Ann. Trop. Med. Parasit.*2009;103:57-72.
- SZABÓ, M.P.J.; NIERI-BASTOS, F.A.; SPOLIDORIO, M.G., et al. 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. *Parasitol.* 2013;140:719-728.
- SOUZA, C.E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F.C., et al. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Veterinary Parasitology.* 2009;161(1):116-121.
- TELFORD, S.R.; PAROLA, P. Arthropods and Rickettsiae, in: Parola P., Raoult D. (Eds.), *Rickettsial diseases*, New York, Infectious diseases and therapy collection, Informa Healthcare. 2007;27-36.

## 8 ANEXOS

Anexo I

SEÇÃO: SAÚDE ÚNICA

TÍTULO: Cães como sentinelas da Saúde Única

\*Louise Bach Kmetiuk, MV, Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). [louisebachk@gmail.com](mailto:louisebachk@gmail.com)

\*Caroline Constantino, MV, MSc, Residente do Programa de Residência Multiprofissional em Saúde da Família, Departamento de Saúde Comunitária, Universidade Federal do Paraná (UFPR). [caroline.const01@gmail.com](mailto:caroline.const01@gmail.com)

Vivien Midori Morikawa, MV, MSc, PhD. Disciplina de Saúde Pública Veterinária do Departamento de Saúde Comunitária, UFPR. Coordenadora do Unidade de Vigilância de Zoonoses, Secretaria Municipal de Saúde de Curitiba. [vmorikawa@sms.curitiba.pr.gov.br](mailto:vmorikawa@sms.curitiba.pr.gov.br)

Alexander Welker Biondo, MV, MSc, PhD. Disciplinas de Zoonoses e Medicina Veterinária do Coletivo, Departamento de Medicina Veterinária, UFPR. [abiondo@ufpr.br](mailto:abiondo@ufpr.br)

\*Ambos os autores contribuíram igualmente na produção do texto.

**Sentinela** é um indivíduo ou população naturalmente mais suscetível e provavelmente mais acometida que a população-alvo por um determinado agravo ou patógeno<sup>1</sup>(Figura 01). Diversas doenças humanas são subnotificadas em virtude de sintomatologia inespecífica, assintomatologia, falha nos métodos de detecção ou período prolongado de latência, dificultando o diagnóstico<sup>2</sup>. Apesar das relações patógeno-hospedeiro serem heterogêneas, o uso de animais sentinelas permite explorar essa variação para a vigilância de doenças, num sistema de coleta, análise, interpretação e divulgação de dados para a tomada de decisões<sup>1</sup>. Determinadas questões podem ser elucidadas a partir do seu inquérito, relacionadas à ecologia do patógeno, testes de medidas de controle, direção e propagação de patógenos, flutuações na prevalência, na incidência e na emergência de patógenos, bem como variações na área de ocorrência<sup>3</sup>.

O reconhecimento precoce do estado de saúde do sentinela possibilita a estimativa de frequências de doenças e a distribuição geográfica de patógenos, antes que o agravo atinja a espécie em risco. Algumas características são importantes para um indivíduo sentinela, como período de latência reduzido e resposta imunológica precoce e mensurável por longo tempo, o que facilita a detecção do patógeno, delimitação dos riscos e elaboração de medidas de prevenção e controle associadas a espécie-alvo (Quadro 01)<sup>4</sup>.

Mas afinal, o que são animais sentinelas? Desde o século XIX, canários já eram utilizados intuitivamente como sentinelas para avaliar a viabilidade de trabalho em minas de carvão, ainda inacessíveis. Como são animais muito sensíveis a altas concentrações de monóxido de carbono gerado nas minas, alertavam o risco aos mineiros, poupando suas vidas, ao perderem sua consciência ou mesmo morrerem<sup>1</sup>. Na verdade, os aspectos etológicos dessas espécies domésticas permitiram condições similares de exposição ou até o contato prévio com uma infinidade de contaminantes ambientais e agentes causadores de doenças.

A análise de animais sentinela pode também auxiliar na investigação de possíveis ataques bioterroristas, como que ocorreu na *Rússia em 1979, onde 77 pessoas adquiriram infecção por antraz. Sugeriu-se, a princípio, que os casos se deviam a ingestão de carne contaminada. Mais tarde, associando-se a localização dos casos em animais e pessoas, constatou-se que ovelhas eram mais suscetíveis e que se tratou de infecção por inalação de esporos liberados de uma instalação militar*<sup>5</sup>.

A presença de resposta (sensibilidade) a essas exposições propicia o uso

também de animais de companhia como potenciais sentinelas em saúde<sup>1</sup>. O estudo da relação de proximidade entre o homem e o cão é um exemplo desta abordagem. É inegável a coevolução e o estreitamento deste vínculo, mais evidente nos últimos 50 anos, quando notamos que os cães se transferiram do quintal para dentro das residências e até compartilham a mesma cama que os seus donos<sup>6</sup>. Dividimos com os animais de companhia o estilo de vida, o ambiente, fontes de alimento e água, portanto é natural que a saúde do animal reflita o ambiente em que vive e antecipe ameaças aos seres humanos<sup>1</sup> (Fig 03). Assim, os cães são considerados bons bioindicadores de contaminação ambiental, predizendo dados a respeito dos níveis de exposição e de possíveis efeitos adversos a população humana<sup>7</sup>.

Por ocuparem, juntamente com as pessoas, o topo da cadeia trófica, os cães e gatos podem também ser sentinelas da segurança alimentar (Fig 02). Nos Estados Unidos, entre os anos de 2004 e 2007 foram noticiados nestas espécies surtos de insuficiência renal associados à ingestão de ração que continha glúten de trigo importado da China. Tais substratos para indústria alimentícia foram enriquecidos com melamina e ácido cianúrico, com objetivo de elevar o teor proteico. A adição na dieta animal ocasionou formação de cristais que obstruíam os túbulos renais, levando ao quadro clínico, antecipando a possibilidade desse cenário em seres humanos<sup>5</sup>.

Com relação a contaminação ambiental, a presença de agentes poluentes, como o chumbo, pode ser detectada a partir da intoxicação em cães. O composto largamente utilizado no passado, pode ser liberado a partir de tinta em deterioração de prédios antigos. Nos Estados Unidos, em residências onde o cão apresentava sinais de intoxicação por chumbo, foi verificado que os valores séricos desse metal nas crianças também estavam superiores aos níveis recomendados, porém ainda sem manifestação clínica<sup>5</sup>.

*Cães passivos de fumaça de cigarros são considerados bioindicadores de danos ocasionados em mucosa orofaríngea, antecipando quadros presumíveis de alterações histopatológicas e na integridade do DNA em decorrência da exposição aos agentes químicos presentes no cigarro*<sup>9</sup> (Fig 04).

Doenças transmitidas por vetores possuem grande impacto mundial. Cães podem atuar como sentinelas dessas doenças quando são expostos antes das pessoas, enquanto há expansão do vetor na região<sup>4</sup>. Alguns fatores podem aumentar a exposição de animais a patógenos e vetores, amplificando seu

potencial como indivíduo sentinela. Como exemplo, temos os cães de rua e cães comunitários que se deslocam livremente na área urbana, ficando mais expostos a vetores e agentes patogênicos que os domiciliados<sup>10, 11</sup>. Os jovens e os em estado de circulação sanguínea periférica do agente infeccioso tendem a atrair vetores para repasto sanguíneo, o que reduz a transmissão vertical para a população humana<sup>12</sup>. Além disso, o cão é a principal fonte de repasto para o mosquito *Culex* e algumas espécies de flebotomíneos, podendo assim atuar como sentinelas para a infecção humana pelo vírus do Nilo Ocidental e leishmaniose em áreas não endêmicas<sup>13</sup>.

Cães comunitários podem ser considerados sentinelas da saúde única, baseado em estudo realizado em Curitiba-PR. Essa população representa animais que habitam locais públicos como estações de ônibus e parques, dividindo estes espaços com milhares de pessoas diariamente, onde circulam livremente e são alimentados por um ou mais indivíduos. Foi realizado inquérito sorológico de doenças transmitidas por vetores (como para babesiose, anaplasrose, ehrliquiose, leishmaniose, bartonellose e micoplasmose) e protozoonoses (toxoplasmose, doença de chagas e neosporose). Ainda que potenciais reservatórios e multiplicadores de patógenos visto sua exposição, neste estudo esses animais apresentaram baixa prevalência para os patógenos pesquisados, além de estado de saúde satisfatório. Foi observada ainda baixa soroprevalência para protozoonoses, sugerindo baixo risco alimentar e ambiental para infecção humana e animal nestes espaços<sup>14</sup>.

Cães e humanos são hospedeiros intermediários do *Toxoplasma gondii*, sendo a exposição a fatores risco de infecção para ambos semelhante, pela ingestão de água e alimentos contaminados com oocistos. Assim, cães podem ser considerados sentinelas ideais para toxoplasmose humana<sup>15</sup>, exceto em países onde há consumo de carne dessa espécie, como a China quando passam da posição de sentinelas para fonte de infecção para humanos.

Leptospirose é uma zoonose em expansão, ocasionada pela bactéria do gênero *Leptospira*, sendo o rato (*Rattus norvegicus*) o principal reservatório. O cão pode atuar tanto como sentinela, como também pode fazer parte do ciclo da doença. O monitoramento de animais saudáveis e doentes possibilita a instituição de medidas para redução da contaminação ambiental e de novos casos tanto em pessoas e animais<sup>16</sup>. No papel de indicadores de zoonoses, a probabilidade de transmissão pelos animais sentinela deve ser baixa, não devendo operar como amplificador e reservatório, o que invalidaria sua função em prever o risco de

infecção<sup>1</sup>.

Cães errantes dispostos em abrigos podem atuar como potenciais sentinelas para zoonoses pelo contato direto com outros animais nesta mesma situação nas ruas, busca de alimento através da caça de roedores e no lixo, além do consumo de água parada. Tais situações aumentam a chance de doenças como toxoplasmose, leptospirose e brucelose<sup>17</sup>. É válido chamar atenção para o fato de que funcionários de abrigos de animais são contactantes diretos de cães errantes, o que pode expô-los a estes riscos biológicos.

A oncologia comparativa prevê a utilização de cães e outras espécies animais como modelos naturais de estudo de cânceres de ocorrência comum ao homem. O menor tempo de vida e a reduzida variabilidade genética em raças individuais de cães facilita a busca pelas homologias, antecipando a compreensão das vias de desenvolvimento, o prognóstico e as medidas terapêuticas plausíveis para ambas as espécies<sup>18</sup>. Um exemplo é o melanoma, que apesar das diferenças de prevalência no homem e no cão, possuem mutações somáticas afins, justificando tais comparações<sup>19</sup>.

Em casos de violência doméstica, acredita-se que tanto os cães quanto crianças e idosos são alvos preferenciais e correm maior risco de dano intencional e/ou negligência<sup>20</sup>. Indivíduos que agem com violência com seus cães tendem a agir da mesma forma com outros seres humanos vulneráveis<sup>21</sup>. Esse contexto qualifica também os animais de companhia como sentinelas do comportamento humano, e exige que médicos veterinários estejam preparados para reconhecer tal situação e recorrer as autoridades<sup>22</sup>.

Em resumo, os cães podem ser utilizados como bioindicadores de contaminação ambiental, de alimentos e da água, além de evidenciar doenças infecciosas, não infecciosas e até mesmo de ataques bioterroristas, atuando como sentinelas da saúde humana, animal e ambiental (saúde única). A ocorrência de “casos índice” de determinada doença ou agravo na população animal sugere a necessidade de alerta para melhoria de estratégias de prevenção. Equipes multidisciplinares e intersetoriais envolvendo médicos veterinários e outros profissionais da saúde pública podem colaborar para o monitoramento de riscos para a saúde, otimizando o diagnóstico e intervenções para prevenir que a afecção se dissemine na população-alvo. A Medicina Veterinária do Coletivo contribui neste cenário, uma vez que trabalha na relação entre seres humanos e os animais de companhia, em particular nas populações humanas em vulnerabilidade social e

animais em risco.

#### Referências

- 01- SCHMIDT, P. L. Companion animals as sentinels for public health. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 39, n. 2, p. 241-250, 2009.
- 02- SCHURER, J.M. People, Pets, and Parasites: One Health Surveillance in Southeastern Saskatchewan. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 90, n.6, p. 1184–1190, 2014.
- 03- MCCLUSKEY, B. J. Use of sentinel herds in monitoring and surveillance systems. In *Animal disease surveillance and survey systems: methods applications* (ed. M. D. Salman), p. 119-133, 2003.
- 04- FARKAS, R. et al. Seroprevalence of Some Vector-Borne Infections of Dogs in Hungary. **Vector Borne Zoonotic Dis.** V.14, n. 4:256-60, 2014.
- 05- RABINOWITZ, P. et al. Human and Animal Sentinels for Shared Health Risks. *Vet Ital.* vol. 45, n.1, p. 23–24, 2009.
- 06- **CHOMEL**, B. B.; SUN, B. Zoonoses in the Bedroom. **Emerg Infect Dis.** 17(2): 167– 172, 2011.
- 07- BACKER, L. C. et al. Pet dogs as sentinels for environmental contamination. **Science of the Total Environment**, v. 274, n. 1, p. 161-169, 2001.
- 08- BROWN, C. A. et al. Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v. 19, n. 5, p. 525-531, 2007.
- 09- PÉREZ, N. et al. Exposure to cigarette smoke causes DNA damage in oropharyngeal. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.** v.769, n. 5:13-9, 2014.
- 10- NEYRA, R. C. et al. The potential of canine sentinels for reemerging *Trypanosoma cruzi* transmission. **Preventive Veterinary Medicine.** v. 120, n. 3, p. 349-356, 2015.
- 11- VIEIRA, T. S. et al. Serosurvey of tick-borne pathogens in dogs from urban and rural areas from Parana State, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v. 22, n. 1, p. 104109, 2013.
- 12- HALLIDAY, J. E. et al. A framework for evaluating animals as sentinels for infectious disease surveillance. **Journal of the Royal Society Interface**, v. 4, n. 16, p. 973-984, 2007.
- 13- MOLAEI, G. et al. Host feeding pattern of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) and its role in transmission of West Nile virus in Harris County, Texas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, n. 1, p. 73-81, 2007.

- 14- CONSTANTINO, C. et al. Serosurvey for *Leishmania* spp., *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi* and *Neospora caninum* in neighborhood dogs in Curitiba-Paraná, Brazil. **Vet. Parasitol.** ISSN 1984-2961 (Electronic). Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612016062>.
- 15- ARAÚJO, D. A. D.; SILVA, A. V. D.; ZANETTE, D. F.; SILVA, D. R. D.; CORREA, N. A. B.; VESLASQUEZ, L. G.; PINTO NETO, A. Investigação dos fatores associados à infecção pelo *Toxoplasma gondii* em cães e seres humanos de Porto Figueira, PR. **Veterinária e Zootecnia**, v. 18, n. 1, p. 98-111, 2011.
- 16- MARTINS, C.M. et al. Incidence of canine leptospirosis in the metropolitan area of Curitiba, State of Paraná, Southern Brazil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 46, p. 772- 775, 2013.
- 17- DREER, M. K. P. Toxoplasmosis, leptospirosis and brucellosis in stray dogs housed at the shelter in Umuarama municipality, Paraná, Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**. 19: 23, 2013.
- 18- SCHIFFMAN J.D., BREEN M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Phil. Trans. R. Soc. B** 370: 20140231, 2015. <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2014.0231>.
- 19- GILLARD, M. et al. Naturally occurring melanomas in dogs as models for non-UV pathways of human melanomas. **Pigment Cell Melanoma Res.** 27; 90–102. 2013.
- 20- FIELDING, W. J. Domestic violence and dog care in New Providence, The Bahamas. **Society & Animals**, v. 18, n. 2, p. 183-203, 2010.
- 21- WILLIAMS, V. M. et al. Animal abuse and family violence: Survey on the recognition of animal abuse by veterinarians in New Zealand and their understanding of the correlation between animal abuse and human violence. **New Zealand Veterinary Journal**. v. 56, n. 1, p. 21-28, 2008.
- 22- ARKOW, P. Recognizing and responding to cases of suspected animal cruelty, abuse, and neglect: what the veterinarian needs to know. **Veterinary Medicine: Research and Reports**. v. 6 p. 349-359, 2015.





Figure 2(Fig 01: O cão pode ser um ótimo sentinela para Saúde Única, monitorando os riscos para a população-alvo e sendo um alerta para estratégias de prevenção de doenças e agravos em seres humanos).

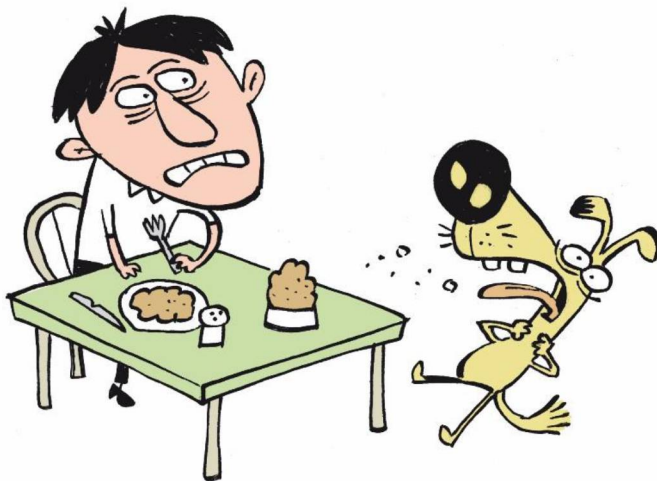


Figure 3(Fig 02: Em 2007, o recolhimento de glúten chinês para consumo humano contaminado com melamina foi feito na Europa e EUA baseado na detecção de insuficiência renal em cães que ingeriam ração com a mesma matéria prima<sup>5</sup>).



*Figure 4* (Fig 03. No íntimo contato com seus donos, cães e gatos comem alimentos similares, compartilham as mesmas camas, e servem de companheiros de viagens, com risco similar de doenças. A saúde do animal de companhia frequentemente espelha a saúde ou sugere os riscos à saúde às pessoas da mesma moradia<sup>1</sup>.)



*Figure 5*(Fig 04. O cão pode ser sentinela para situações de contaminação ambiental, violência doméstica e zoonoses. Estudos mostram que cães mimetizam inclusive as doenças humanas do fumante passivo<sup>9</sup>. Figura ilustrativa.)

Quadro 01 – O que torna o cão doméstico um animal sentinela da saúde única

SEU COMPORTAMENTO/HÁBITO DE...	O TORNA POTENCIAL SENTINELA
	PARA...
Proximidade com o ser humano (mesmo ambiente e mesmas fontes de água e alimentos)	Zoonoses, doenças transmitidas por vetores, saúde ambiental, alterações do comportamento humano, segurança alimentar
Proximidade com o solo	Doenças comuns em crianças, bioterrorismo, saúde ambiental
Topo de cadeia trófica	Zoonoses, segurança alimentar

81

Anexo II

**SEÇÃO: SAÚDE ÚNICA****TÍTULO:** Capivaras, carrapato estrela e a Febre Maculosa Brasileira**SUBTÍTULO:** O elo entre amplificador, vetor e patógeno

Louise Bach Kmetiuk, MV, MSc. Doutoranda do Programa de Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná (UFPR). louisebachk@gmail.com

Thiago Fernandes Martins, MV, MSc, PhD. Pós-Doutorado em Ciências na Área de Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP). thiagodogo@hotmail.com

Aurea Maria Oliveira Canavessi, MV, MSc, PhD. Médica veterinária responsável técnica pelas Instalações de pesquisa de animais de produção do Campus “Luiz de Queiroz” – USP/Piracicaba. acanavessi@usp.br

Alexander Welker Biondo, MV, MSc, PhD. Disciplina de Zoonoses e Medicina Veterinária do Coletivo, Departamento de Medicina Veterinária, UFPR. abiondo@ufpr.br

**Introdução**

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), doença mais letal transmitida por carrapatos, tem a bactéria *Rickettsia rickettsii* como principal agente etiológico, com casos relatados no Brasil desde 1929 (1). Apesar de poucos casos notificados nos 80 anos seguintes, a doença reemergiu na região Sudeste associada ao aumento significativo da população de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e seus carrapatos (*Amblyomma sculptum*) em meados do século XXI, especialmente no estado de São Paulo (Figura 1) (2).

A doença causada pela *R. rickettsii* tem como sinal clínico mais característico a ocorrência de erupções cutâneas ao quinto dia da infecção, além de quadro febril e sintomatologia inespecífica, particularmente no estado de São Paulo (3). Na ausência destas erupções cutâneas, a doença pode ser confundida com outras de quadro febril e maior prevalência na população como dengue, doenças eruptivas virais e leptospirose (4).

A FMB tornou-se de notificação compulsória para o Ministério da Saúde em 2001 (5). Com sua notificação imediata em 2014, os profissionais da saúde passaram

a registrar casos suspeitos ou confirmados no Sistema de Informação de Agravos e Notificação (SINAN) dentro de 24 horas (6). Devido ao aumento do número de casos e da expansão das áreas de ocorrência, a FMB é atualmente considerada como doença emergente no Brasil e endêmica em vários municípios da região Sudeste (3, 7).

### **O carrapato estrela e a Febre Maculosa Brasileira**

Sendo o elo central entre a fonte de *R. rickettsii* e os seres humanos, os carrapatos adquirem a infecção através da alimentação em animais vertebrados sob bacteremia, chamados de hospedeiros amplificadores, ou ainda por transmissão transovariana (1, 2).

O *Amblyomma cajennense* sensu lato, popularmente conhecido como carrapato estrela, era classificado no Brasil dentro de uma única espécie até 2014 (8). Estudos moleculares, morfológicos, biológicos e ecológicos demonstraram que esse táxon correspondia, na verdade, a duas espécies no país, o *A. cajennense* sensu stricto e o

*A. sculptum* (Figura 2) (8, 9). O *A. cajennense* s. s. é de distribuição quase limitada ao clima equatorial e dentro do bioma Amazônia, e o *A. sculptum*, é de distribuição praticamente restrita ao clima tropical, e dentro dos biomas Pantanal, Cerrado e áreas degradadas da Mata Atlântica, sendo mais comum na região Sudeste (Figura 3) (9).

O *A. sculptum* apresenta uma geração por ano, com predomínio de larvas no outono, ninfas no inverno e adultos na primavera e verão (10), sendo associado à vegetação nas áreas do Pantanal, Cerrado e em áreas degradadas da Mata Atlântica, coincidindo assim com espaços antrópicos (11). A infestação humana é frequente e pode ocorrer com dezenas a centenas de carrapatos por episódio, especialmente ninfas durante o inverno (12). As ninfas de *A. sculptum* são menores que os adultos, também possuem alta agressividade e parasitismo pouco específico, disseminando-se amplamente sob a área infestada e com competência vetorial superior à de larvas infectadas pela *R. rickettsii* (13).

O carrapato *A. sculptum* é reconhecido como o principal vetor da FMB em áreas endêmicas no interior do estado de São Paulo (13). Apesar da competência vetorial, estudos experimentais com o carrapato *A. sculptum* demonstraram sua baixa eficiência em manter o agente *R. rickettsii* através de sucessivas gerações. Menos da metade das fêmeas ingurgitadas transmitiram verticalmente riquetsias e somente parte da prole se tornou realmente infectada (13).

Além disso, a bactéria também é patogênica para os carrapatos, refletindo em

menor desempenho reprodutivo (13). Ovos de *A. sculptum* só podem ser infectados se a geração anterior adquirir infecção nas fases de larva ou ninfa, já que o tempo de infecção pela *R. rickettsii* em carrapatos é superior ao tempo de postura (15, 16). Sendo assim, a manutenção da *R. rickettsii* no ambiente depende da transmissão horizontal de hospedeiros amplificadores, possibilitando que novos carrapatos se infectem e participem na formação de linhagens infectadas (15, 16).

### **Capivaras como principais hospedeiros amplificadores**

Capivaras são mamíferos roedores abundantes em áreas endêmicas para a FMB, especialmente no estado de São Paulo, sendo hospedeiras primárias para todos os estágios parasitários de *A. sculptum* (17). Considerados os maiores roedores do mundo, de hábito semiaquático e gregário, o qual depende da água para sua reprodução, regulação térmica e proteção contra predadores, encontram-se amplamente distribuídos em habitats naturais e antrópicos (18). Foram consideradas ameaçadas de extinção em 1950, mas fatores como a proibição da caça pela lei de proteção a fauna, declínio de potenciais predadores naturais, alta capacidade reprodutiva e capacidade de suporte do ambiente, associado ao aumento do cultivo da cana de açúcar, possibilitaram o significativo aumento populacional (19). Coincidentemente, áreas antrópicas como parques urbanos e periurbanos com corpos de água, jardins de condomínios residenciais e empresas têm sido ambientes adequados tanto para habitação de capivaras quanto de seus carrapatos (20).

Em 1940, estudos com infecção experimental relataram que capivaras inoculadas com a *R. rickettsii* não apresentaram febre durante o período de ricketsemia, sugerindo que fossem amplificadoras do patógeno (20). A reemergência de casos de FMB no estado de São Paulo, concomitante ao aumento populacional de capivaras, fez ressurgir essa suspeita de que fossem verdadeiros hospedeiros amplificadores (16). Em um estudo mais atual, capivaras foram divididas em dois grupos e infectadas experimentalmente por infestações de *A. sculptum* e pela inoculação intraperitoneal de bactérias (16). Depois de infectadas, as capivaras mantiveram a *R. rickettsii* na circulação sanguínea em torno de 7 a 10 dias (16). Nesse período, as capivaras infectadas por carrapatos foram capazes de infectar 20 a 25% e por inoculação de 30 a 35% dos carrapatos, comprovando a capacidade das capivaras em amplificarem o patógeno (16).

Todas as capivaras possuem a mesma susceptibilidade e podem ser infectadas

por larvas, ninfas ou adultos do carrapato *A. sculptum* (16). Dessa forma, o ciclo da doença se perpetua em um grupo de capivaras à medida que novos indivíduos susceptíveis (nascimento e imigração) incrementam o grupo. Após a bacteremia, a resposta imune desenvolvida protege o animal de novas infecções (16), ou seja, a manutenção de capivaras adultas já resistentes por vasectomia ou laqueadura é mais interessante que a retirada parcial, que poderá refletir em futuros filhotes ou jovens susceptíveis.

### **Classificação de áreas quanto à Febre Maculosa Brasileira e manejo populacional de capivaras**

A Secretaria do Meio Ambiente (SMA) e a Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) ambas do estado de São Paulo, publicaram uma resolução conjunta em 2016 com diretrizes de manejo populacional de capivaras como uma das ferramentas para controle da FMB, associado ao seu inquérito sorológico (21). A resolução também propôs uma nova classificação das áreas de ocorrência da FMB, baseada na notificação de caso suspeito confirmado ou compatível com a doença: 1. Áreas silenciosas; 2. Sem infestação; e 3. Infestadas, sendo esta subdividida em 3.1. Áreas de Risco, 3.2. De transmissão, 3.3. Predispostas e 3.4. De alerta (Figuras 4 e 5) (21).

Em áreas endêmicas para a FMB, em torno de 50 a 80% das capivaras são soropositivas para *R. rickettsii* (22). A Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) é o teste de referência para a FMB, com utilização de antígenos para *R. rickettsii* e *Rickettsia parkeri*, realizado em laboratórios públicos ou privados, credenciados junto à SUCEN (21).

Em estudo recente, um modelo matemático foi utilizado para avaliar o papel das capivaras na dinâmica de transmissão da *R. rickettsii*. Descobriu-se que, em área não-endêmica, a introdução de uma única capivara infectada, com pelo menos um carrapato infectado, são suficientes para estabelecer uma nova área endêmica (22). O mesmo estudo matemático considerou apenas a taxa de natalidade como fator para incremento populacional em um grupo de capivaras e observou que, um declínio de 80% levou ao desaparecimento de capivaras infectadas no quarto ano (22). Já um declínio de 90% na taxa de natalidade levou ao desaparecimento de capivaras infectadas no segundo ano (22).

Nestas áreas de risco e transmissão, as principais estratégias de redução da natalidade podem ser a diminuição da capacidade de suporte do ambiente (corte baixo da massa vegetal, o controle reprodutivo e a eutanásia) (22). O manejo reprodutivo por métodos contraceptivos é interessante em locais sem

possibilidade de cercamento, enquanto a eutanásia de grupos inteiros pode ser necessária em áreas com cercamento completo e onde não haja possibilidade de reintrodução (21). Apesar de alterar o comportamento reprodutivo natural da fauna nativa, a vasectomia ou laqueadura de capivaras não tem se mostrado prejudicial para o comportamento de indivíduos ou grupos, como defesa de território e migração (23).

Larvas e ninfas de *A. sculptum* também se alimentam em proporções menores de outros mamíferos e aves, porém além da sua capacidade generalista de parasitismo, carrapatos em vida livre residem em vegetação acima de 15 cm do solo, altura que facilita seu ataque às capivaras (24). Deste modo, as capivaras representam a única espécie amplificadora de maior porte capaz de albergar significativa população de *A. sculptum* em parte das áreas endêmicas de FMB (25).

Os javalis (*Sus scrofa*) são espécies de mamíferos de grande porte, não nativos e invasores, hospedeiros mantenedores confirmados de grandes populações de *A. sculptum* (28). A ampla distribuição e expressivo aumento da densidade populacional de javalis em áreas endêmicas para a FMB, localizadas principalmente nas mesmas áreas de cultivo de cana de açúcar da região Sudeste do Brasil, têm sido um alerta para o aumento da doença (28). Além disso, como as capivaras também apresentam um aumento populacional desequilibrado, com densidade populacional até 40 vezes maior em áreas endêmicas que em ambientes naturais (26), essa sobreposição de habitats entre javalis e capivaras pode ter impacto na ocorrência de carrapatos e doenças transmitidas por esses vetores, particularmente a FMB.

## **Conclusões**

A notificação da FMB é obrigatória e imediata (dentro de 24 horas) no SINAN desde 2014. O carrapato estrela é na verdade o nome popular de duas espécies, o *A. cajennense* s. s. e o *A. sculptum*. Capivaras são mamíferos roedores abundantes em áreas endêmicas para a FMB, especialmente no estado de São Paulo, sendo hospedeiras primárias para todos os estágios parasitários de *A. sculptum*.

A translocação e a vasectomia ou laqueadura de capivaras podem ser consideradas no manejo populacional de áreas geográficas não infestadas e silenciosas para a FMB, sejam elas fisicamente abertas ou fechadas. A vasectomia ou laqueadura de capivaras deve ser considerada tanto em áreas abertas de risco e de transmissão da doença, buscando aumento proporcional



de adultos resistentes e redução de filhotes e jovens susceptíveis. A eutanásia de capivaras deve ser considerada em áreas de risco e transmissão de FMB quando a área geográfica é fechada.

Finalmente, a superpopulação e sobreposição de habitats entre capivaras e javalis pode ter impacto na ocorrência de carrapatos, particularmente *A. sculptum*, bem como de doenças transmitidas por carrapatos, particularmente a FMB.

## Referências

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, n. 27. p. 1-9, 2013. doi:10.3389/fcimb.2013.00027.

LABRUNA, M. B. Ecology of *Rickettsia* in South America. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1166, n. 1, p. 156-166, 2009. doi:10.1111/j.1749-6632.2009.04516.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA,

M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11, p. 266 -70, 2005. 10.3201/eid1102.040656.

ANGERAMI, R. N.; CÂMARA, M.; PACOLA, M. R.; REZENDE, R. C. M; DUARTE R. M.

R.; NASCIMENTO, E. M. M. Features of Brazilian spotted fever in two different endemic areas in Brazil. **Ticks and Tick Borne Diseases**. v. 3, n. 5-6, p. 346-8, 2012. Doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.10.010.

BRASIL. Portaria nº 1.943, de 18 de outubro de 2001, sobre doenças de notificação compulsória. **Informação Epidemiológica SUS**. v. 10, n. 1, p. 57-8, 2001. <http://dx.doi.org/10.5123/S0104-16732001000100007>.

BRASIL. **Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016**. Define a Lista Nacional de Notificação Compulsória de doenças, agravos e eventos de saúde pública nos serviços de saúde públicos e privados em todo o território nacional, nos termos do anexo, e dá outras providências. Disponível

em:

<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/abril/25/Portaria-n---2014-de-17--Fevereiro-2016.pdf>. Acessado em: 19 de novembro de 2018.

DE 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-GONÇALVES, R. An update on the epidemiological situation of spotted fever in Brazil. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. v. 22, n. 1, 2016.

doi:10.1186/s40409-016-0077-4. NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M.B.; CÁCERES, A.G.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. 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*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Diseases**. v. 5, n. 3, p. 252-276, 2014.

doi: 10.1016/j.ttbdis.2013.11.004.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R. M.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L.

M. A.; PETERKA, C. R. L.; A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORTA, M. C.; GUILLOUX, A. G. A.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (*sensu lato*) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (*sensu stricto*). **Parasites & Vectors**. v. 9, n. 1, 2016. doi:10.1186/s13071-016-1460-2. LABRUNA, M. B.; KASAI, N; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo Brazil. **Veterinary Parasitology**. v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002. doi:10.1016/s0304-4017(01)00649-5.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S. P.; SANA, D. A.; JÁCOMO, A. T. A.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S.A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A. ; ADANIA, C. H. ; TEIXEIRA, R. H. ; GOMES, A. A. ; CONFORTI, V. A. ; AZEVEDO, F. C. ;, PRADA, C. S. ; SILVA, J. C. ; BATISTA, A. F. ; MARVULO, M. F. ; MORATO, R. L. ; ALHO, C. J. ; PINTER, A. ; FERREIRA, P. M. ; FERREIRA, F. ; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. *Experimental and Applied Acarology*. v.36, p. 149-163, 2005. doi: 10.1007/s10493005-2563-1. PINTER, A.; FRANÇA, A. C.; SOUZA, C. E.; SABBO, C.; NASCIMENTO, E. M. M.;

SANTOS, F. C. P.; et al. *Febre Maculosa Brasileira. Suplemento Bepa 8. ISSN 1806-4272. (online), 2011.*

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. **Medicine Veterinary Entomology**. v. 26, p. 139-151, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2915.2011.00982.
- POLO, G.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F. Basic reproduction number for the Brazilian Spotted Fever. **Journal of Theoretical Biology**. 2018. doi:10.1016/j.jtbi.2018.09.01. 16 virou 15
- DUMLER, J.S.; WALKER, D.H. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. **The New England Journal of Medicine**. v. 353, p. 551-553, 2005. doi:10.1056/nejmp058138.
- SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S. L.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**. v. 161, n.1-2, p. 116-121, 2009 doi:10.1016/j.vetpar.2008.12.010.
- VIEIRA, A.M.L.; SOUZA, C.E.; LABRUNA, M.B.; MAYO, R.C.; SOUZA, S.S.L.;
- CAMARGO-NEVES, V.L.F. Manual de Vigilância Acarológica Estado de São Paulo. **Secretaria de Estado da Saúde, São Paulo**. p. 62, 2004.
- MOREIRA, J.R.; MACDONALD, D.W. Capybara use and conservation in South America. **The exploitation of mammal populations**. Chapman & Hal In: V. J. Taylor & N. Dunstone (eds.). p. 88-101, 1996.
- FERRAZ, K. M. P.; FERRAZ, S. F. B.; MOREIRA, J. R.; COUTO, H. T. Z.; VERDADE, L. M. Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a crossscale habitat analysis. **Journal of Biogeography**. v. 34, p. 223-230, 2007. doi: 10.1111/j.1365-2699.2006.01568.
- TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da Febre Maculosa. Possibilidade de esses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. **Memórias Instituto Butantan**, v.15, p.73-86, 1942.
- GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO. **Resolução conjunta SMA/SUCEN nº 01, de 24 de março de 2016**.
- Disponível em: <<http://arquivos.ambiente.sp.gov.br/legislacao/2016/12/Resolu%C3%A7%C3%A3o-Conjunta-SMA-SUCEN-001-2016-Processo-15257-2011-Aprova%C3%A7%C3%A3o->

das-diretrizes-t%C3%A9cnicas-para\_vigil%C3%A2ncia-e-controle-da-febre-maculosa-brasileira-no-Estado-de-SP.pdf>. Acessado em 19 de novembro de 2018.

POLO, G.; MERA ACOSTA, C.; LABRUNA, M. B.; FERREIRA, F. Transmission dynamics and control of *Rickettsia rickettsii* in populations of *Hydrochoerus hydrochaeris* and *Amblyomma sculptum*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 11, n. 6, p. e0005613, 2017. doi:10.1371/journal.pntd.0005613.

RODRIGUES, M. **Aspectos Ecológicos e Controle Reprodutivo em uma População de Capivaras Sinantrópicas no Campus da Universidade Federal de Viçosa MG**. Ph.D. Thesis, 2013 Disponível em: <http://repositorio.ufv.br/handle/123456789/1457>. Acessado em 19 de novembro de 2018.

LABRUNA, M.; PINTER, A.; CASTRO, M.; CASTAGNOLLI, K.; GARCIA, M.; SZABO,

M. Some records on host questing behavior of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) larvae. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v. 11, p. 91-93, 2002. LABRUNA, M. B.; KRAWCZAK, F. S.; GERARDI, M.; BINDER, L. C.; BARBIERI, A. R. M.; PAZ, G. F.; RODRIGUES D. S.; ARAÚJO R. N.; BERNARDES, M. L.; LEITE, R. C. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from the tick *Amblyomma sculptum* from a Brazilian spotted fever-endemic area in the Pampulha Lake region, southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**. v. 8, p. 82-85, 2017. doi:10.1016/j.vprsr.2017.02.007.

POLO, G.; LABRUNA, M.B.; FERREIRA, F. Satellite hyperspectral imagery to support tick-borne infectious diseases surveillance. **PLoS ONE**. p. 0119190, 2015. doi:10.1371/journal.pone.0143736.

PEDROSA, F.; SALERNO, R.; PADILHA, F. V. B.; GALETTI, M. Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. **Natureza & Conservação**. v. 13, n. 1, p.84-87, 2015. doi:10.1016/j.ncon.2015.04.005.

RAMOS, V.N.; PIOVEZAN, U.; FRANCO, A. H. A. ; OSAVA, C. F. ; HERRERA, H. M. ;

SZABO, M. P. J. Feral pigs as host for *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) populations in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**. v. 64, p. 393-406, 2014. doi: 10.1007/s10493-014-9832-9.



Figure 6 (Figura 1: A vasectomia ou laqueadura de capivaras deve ser considerada tanto em áreas de risco como de transmissão, abertas ou de contato exterior, pois mantém os animais menos susceptíveis à doença por mais tempo na área. (Fonte: Fernando Gonsales)



Figure 7 (Figura 2: Imagem de exemplares adultos macho (esquerda) e fêmea (direita) de *Amblyomma sculptum*, conhecidos popularmente como carrapato estrela, e até 2014 identificados erroneamente como *Amblyomma cajennense*. (Fonte: auto)



Figure 8 (Figura 3: Mapa do Brasil com os climas, demonstrando a distribuição geográfica dos carrapatos *Amblyomma cajennense sensu stricto* e *Amblyomma sculptum* no país. (Fonte: (9) modificado de Martins et al., 2016)

Figure 9 (Figura 4: Classificação de áreas quanto à Febre Maculosa Brasileira no estado de São Paulo. (Fonte: 21)

<b>Tipo de Área</b>	<b>Presença do vetor <i>Amblyomma</i> Soroprevalência de capivaras e outros animais</b>	<b>Tipo de manejo das capivaras</b>
1. Silenciosa	- Sem informações da ocorrência do vetor; - Necessidade de estimular notificação parasitismo humano por <i>Amblyomma</i> .	- Controle populacional pela translocação e vasectomia ou laqueadura.
2. Sem infestação	- Após duas pesquisas acarológicas de <i>Amblyomma</i> (intervalo mínimo 3 e máximo de 6 meses).	- Controle populacional pela translocação e vasectomia ou laqueadura.
3. Com infestação	- Após pesquisa acarológica <i>Amblyomma</i> .	
3.1 De transmissão	- LPI* casos notificados últimos 10 anos.	- Controle populacional pela vasectomia ou laqueadura, ou eutanásia.
3.2 De risco	- Superior a 10% ou - Mínimo 1 animal título $\geq 2.048$ .	- Controle populacional pela vasectomia ou laqueadura, ou eutanásia.
3.3 Predisposta	- Presença de hospedeiros amplificadores.	- Coleta material biológico; - Controle populacional pela vasectomia ou laqueadura, ou eutanásia.
3.4 De alerta	- Baixa infestação por carrapatos; - Animais títulos $< 2.048$ .	- Coleta material biológico; - Controle populacional pela vasectomia ou laqueadura, ou eutanásia.

\*LPI= Local Provável de Infecção.

Figure 10(Figura 5. Avaliação periódica das áreas de alerta para a Febre Maculosa Brasileira, através de pesquisa sorológica. (Fonte: 21)

<b>Tipo de área de alerta</b>	<b>Tamanho da amostra e espécie</b>	<b>Periodicidade</b>	<b>Repetições análises</b>
Com alta frequência humana e abundância de capivaras, parques e campus universitário.	Amostragem de capivaras seguindo fórmula: $n^* = 83 \times N^{**} / (83 + N^{**})$ .	12 meses	Ano todo
Condomínios ou propriedades rurais com presença de capivaras.	Amostragem de capivaras seguindo fórmula: $n^* = 83 \times N^{**} / (83 + N^{**})$ .	24 meses	De maio a novembro***
Condomínios, propriedades rurais ou áreas públicas sem presença de capivaras e com presença de cavalos.	- Mínimo de 15 equinos entre 2 e 20 anos de idade; - Pelo menos 3 anos na área.	36 meses	De maio a novembro***
Comunidades adjacentes a áreas de Mata Atlântica e presença do carrapato <i>Amblyomma aureolatum</i> ou <i>Amblyomma ovale</i> .	- Mínimo de 30 cães saudáveis; - 1 e 6 anos de idade que tenham acesso à mata.	36 meses	Qualquer época do ano

\*n representa o tamanho da amostra.

\*\*N representa o número de indivíduos adultos do grupo.

\*\*\*Período em que as fases imaturas do carrapato *Amblyomma sculptum* procuram por hospedeiros para alimentação. Visa representar a geração de carrapatos do ano vigente.

## Anexo III

Artigo submetido e sob revisão na Revista Acta Tropica.

Title: Serosurvey of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* in sheltered and free-roaming cats from an endemic university campus area for Brazilian Spotted Fever.

Running title: *Rickettsia rickettsii* and *R. parkeri* in sheltered and free-roaming cats.

Authors: Juliana Cristina Rebonato Mendes<sup>a</sup>, Louise Bach Kmetiuk<sup>a</sup>, Camila Marinelli Martins<sup>b</sup>, Igor Adolfo Dexheimer Paploski<sup>c</sup>, Aurea Maria Oliveira Canavessi<sup>d</sup>, Tatiana Jimenez<sup>e</sup>, Maysa Pellizzaro<sup>f</sup>, Thiago Fernandes Martins<sup>e</sup>, Vivien Midori Morikawa<sup>g</sup>, Andrea Pires dos Santos<sup>h</sup>, Marcelo Bahia Labruna<sup>e</sup>, Alexander Welker Biondo<sup>a, 1</sup>

<sup>a</sup> Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81531-900, Brazil. [jcrebonato@hotmail.com](mailto:jcrebonato@hotmail.com); [louisebachk@ufpr.br](mailto:louisebachk@ufpr.br); [abiondo@ufpr.br](mailto:abiondo@ufpr.br).

<sup>b</sup> Department of Nursing and Public Health, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brazil. [camimarinelli@gmail.com](mailto:camimarinelli@gmail.com).

<sup>c</sup> Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA. [igorufprmv@gmail.com](mailto:igorufprmv@gmail.com).

<sup>d</sup> Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 13418-900, Brazil. [acanavessi@usp.br](mailto:acanavessi@usp.br).

<sup>e</sup> Department of Preventive Veterinary Medicine and Animal Health, School of Veterinary Medicine and Animal Science, University of São Paulo, SP, 05508-270, Brazil. [tatiana.jimenezv@usp.br](mailto:tatiana.jimenezv@usp.br); [thiagodogo@hotmail.com](mailto:thiagodogo@hotmail.com); [labruna@usp.br](mailto:labruna@usp.br).

<sup>f</sup> Department of Veterinary Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Sao Paulo State University, Botucatu, São Paulo, 18618-681 Brazil. [maysa.pellizzaro@gmail.com](mailto:maysa.pellizzaro@gmail.com).

<sup>g</sup> Department of Collective Health, Federal University of Parana, Curitiba, PR, 80060-240, Brazil. [vmmorikawa@gmail.com](mailto:vmmorikawa@gmail.com).

<sup>h</sup> Assistant professor, Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907, USA. [santos1@purdue.edu](mailto:santos1@purdue.edu).

<sup>1</sup>Corresponding Author: Alexander Welker Biondo. Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Paraná, Rua dos Funcionários 1540, Juvevê, 80035-050, Curitiba, Paraná, Brazil. Phone: +55 41 3350-5812 Fax: +55 41 3350-5623. E-mail: [abiondo@ufpr.br](mailto:abiondo@ufpr.br)

## Highlights

- *Rickettsia* bacteria have been responsible for human and animal tick-borne diseases worldwide;
- Capybaras have been the main rickettsial amplifiers in Brazilian endemic areas;



- The impact of an overlapping of capybara and free-roaming cat populations remains to be fully established;
- Cats may play a role as sentinels for human exposure to spotted fever group rickettsiae in such areas.

#### Abstract

*Rickettsia* bacteria have been responsible for human and animal tick-borne diseases worldwide, maintained in Brazilian endemic areas mostly by capybaras, which are rickettsial amplifiers. The University of São Paulo at Piracicaba, southeastern Brazil is an endemic area for Brazilian Spotted Fever (BSF), with a high density of free-roaming seropositive capybaras infested by *Amblyomma* spp. ticks, along with confirmed BSF human cases. Besides capybaras, the university has also an in-campus population of sheltered and free-roaming cats. Accordingly, the aim of this study was to determine the prevalence and characteristics associated with rickettsial infection in cats from an endemic BSF area. Out of 51 cats sampled, 23/35 (65.7%) sheltered cats and 5/16 (31.2%) free-roaming cats were positive (titers  $\geq 64$ ) to at least one *Rickettsia* species. Ticks species were present in 3/16 (18.8%) free-roaming cats, consisting in 4 larvae of *Amblyomma* sp., 5 nymphs of *Amblyomma sculptum* and 1 adult *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato. Young cats (<1yo) are statistically more susceptible to ticks and rickettsial infections, probably due to the less efficient tick self-cleaning habit of the kitten, leading to a potential outbreak when associated to infected tick infestation. Despite sharing capybara environment, seropositivity of free-roaming and sheltered cats herein was lower than in owned cats from other endemic areas. As equally or less exposed to rickettsial infection than owned cats in endemic areas, free-roaming and sheltered cats may be used as environmental sentinels for human exposure to spotted fever group rickettsiae in such areas.

#### Keywords

*Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri*, Brazilian Spotted Fever Abbreviations

BSF, Brazilian Spotted Fever; ESALQ-USP, "Luiz de Queiroz" College of Agriculture - University of São Paulo; HDI, Human Development Index; IFA, Indirect Immunofluorescence Assay; PAIHR, Possible antigen involved in a homologous reaction; PCR, Polymerase Chain Reaction; SF, Spotted Fever; SFG, Spotted Fever Group

#### 1. Introduction

*Rickettsia* bacteria is responsible for human and animal diseases worldwide; Brazilian Spotted Fever (BSF) is described as the main natural reservoir and the Ixodid ticks the main vectors of rickettsiae (Beninati et al., 2005; Labruna, 2009). BSF cases in endemic areas of southeastern Brazil have been mostly related to *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* (Horta et al., 2007; Parola et al., 2005). Capybaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) have been reportedly associated to BSF endemic areas of southeastern Brazil, and are recognized as *Rickettsia* spp. amplifiers as well as tick hosts, mainly *Amblyomma sculptum* (Labruna, 2009).

Despite the urban localization at Piracicaba city, the campus of University of São Paulo has been composed of an extensive green area, with native vegetation and natural river courses, historically described as the capybara's natural habitat. Due to increment and expansion of surrounding

sugarcane crops, the main capybara food source, an increase of in-campus population of capybaras infested by ticks have been described (Gheler- Costa et al., 2002). Not surprisingly, the Piracicaba city itself has accounted for 59/784 (7.5%) human BSF cases of São Paulo state in the past 10 years, out of the 650 state cities. The most publicized case was a university faculty child who died of BSF after being bitten by a tick inside the campus in 2003 (Brasil, 2003).

Despite the variable cat (*Felis catus*) seroprevalence for *Rickettsia* spp. in trapped stray cats in four São Paulo state endemic areas (including Piracicaba), reports have shown the highest cat seropositivity worldwide with 16/19 (84.21%) for *Rickettsia rickettsii* and 15/19 (78.94%) for *Rickettsia parkeri* (Horta et al., 2007) (Table 1). Similarly high prevalence seropositive cats for *Rickettsia rickettsii* (23/29; 79.31%) has been observed in owned cats from rural communities in Northern California, USA, where wildlife reservoirs and vectors may have spread rickettsial pathogens among pet and human hosts (Stephenson et al., 2017).

Although the impact of capybara population on human BSF cases has been extensively studied, the impact of an overlapping free-roaming cat population remains to be fully established. Accordingly, the aim of this study was to determine the prevalence and characteristics associated to rickettsial infection in free-roaming cats from an endemic BSF area overlapped by positive capybaras.

## 2. Methods

### 2.1. Study area

The study herein was conducted in the University of São Paulo at Piracicaba city, “Luiz de Queiroz” School of Agriculture (ESALQ-USP) from July to October 2017. The city of Piracicaba has a total area of 1,378.069 km<sup>2</sup>, altitude of 554 meters, temperatures varying from 16.0° to 37.5° Celsius, annual rainfall of 123 centimeters. The estimated city population at the time of survey was 400,100 (ranked 61<sup>th</sup>) habitants, with a high Human Development Index (HDI) of 0.785 (ranked 92<sup>th</sup>) out of the total 5,570 Brazilian cities (IBGE, 2017).

The university campus of 297 hectares is located within the urban area of Piracicaba city and divided in forest remnants of Atlantic Forest Biome and diverse anthropic occupations including landscape and idle areas, crops and rural facilities, pasture and restoration forests. Campus has harbored native fauna, mostly by birds, capybaras and opossums, with four kilometers of in-campus river stream (Esalq-USP, 2016).

### 2.2. Animal sampling and testing

Around 250 free-roaming resident cats were estimated on campus area at the time of survey, living on offered cat food, hunting birds and rodents. Traps were distributed in several in-campus locations during a four-month trapping time. In addition, 72 cats and 12 dogs from a provisory in-campus animal shelter with were sampled.

After trapping and/or physical restrain, blood samples from 35/72 (48.6%) sheltered and 16/250 (6.4%) free-roaming cats were successfully collected. Due to the death of a feral sheltered cat following blood sampling, caused by a preexistent hypertrophic cardiomyopathy found later at the necropsy, samplings of free-roaming feral cats were limited to the four-month trapping period only.

All samples were collected in tubes without anti-coagulant and kept at room temperature (25°C) until visible clot retraction, centrifuged at 1,500 revolutions per minute for five minutes, and serum separated and kept at -20°C until Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) procedure (Zavala-Velazquez et al., 1996). Serum samples were tested by IFA to detect IgG antibodies against *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*, Spotted Fever Group (SFG) rickettsiae, with titers  $\geq 64$  considered positive.

### 2.3. Tick collection and testing

After blood puncture, cats were carefully examined for tick presence. All ticks obtained were collected and preserved in isopropyl alcohol until analysis at the laboratory for taxonomic identification, which was performed following standard morphological keys, as previously described (Aragão and Fonseca, 1961; Barros-Battesti et al., 2006; Martins et al., 2010).

*Amblyomma sculptum* tick nymphs were individually submitted to DNA extraction by the guanidine isothiocyanate technique (Sangioni et al., 2005) and individually tested by standard PCR for tick mitochondrial 16S rRNA (Mangold et al., 1998) and rickettsial gltA gene (Labruna et al., 2004). For each PCR run, negative (water) and positive (*Rickettsia vini* DNA) controls were also included, as previously described (Novakova et al., 2016).

### 2.4. Epidemiological data and statistical analysis

Individual information and epidemiological data were obtained and analyzed. Statistical analysis was performed by use of a statistical software Epi Info version 3.5.2 (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA) to determine the association between *Rickettsia* sp. antibodies and the variables (age, sex and sterilization). The data were evaluated by determining the odds ratios and 95% confidence intervals. Non-parametric test (Fisher's exact test) was used for univariate analysis and the significance was determined as  $p < 0.05$ .

The map relative to spatial location of capybaras sightings and location of sheltered and free-roaming cats was designed with the software ArcGIS version 10.0. (figure 1).

### 2.5. Ethical approval

The present study was approved by the Ethics Committee on Animal Use of the Agricultural Sciences Sector at the Federal University of Paraná (protocol 103/2017).

## 3. Results

A total of 28/51 (54.9%) cats were seropositive to at least one of the two *Rickettsia* species tested; 23/35 (65.7%) sheltered and 5/16 (31.2%) free-roaming cats. Seropositivity was higher in cats maintained in the shelter ( $p=0.03$ ) when compared to free-roaming cats.

Among free-roaming cats, 3/16 (18.8%) reacted to *R. rickettsii* and 5/16 (31.2%) reacted to *R. parkeri*, and IFA endpoint titers varied from 64 to 1024 for *R. rickettsii* and 64 to 256 for *R. parkeri*. Among sheltered cats, 16/35 (45.7%) reacted to *R. rickettsii* and 17/35 (48.6%) reacted to *R. parkeri*, and IFA endpoint titers varied from 64 to 512 for *R. rickettsii* and 64 to 1024 for *R. parkeri* (Table 2). No statistically significant differences were found between groups (shelter and free-roaming) and frequency of *R. rickettsii* (OR 0.2 CI 95% 0.07-1.13  $p=0.12$ ) and *R. parkeri* (CI 95% OR 0.5 0.14-1.68

p=0.36).

Among the sheltered dogs, 6/12 (50.0%) were seropositive to at least one of the two *Rickettsia* species tested, 3/6 (50.0%) reacted to *R. rickettsii* and 6/6 (100.0%) reacted to *R. parkeri*. The IFA endpoint titers varied from 64 to 1024 for both antigens (Table 2). Four larvae of *Amblyomma* sp., 5 nymphs of *Amblyomma sculptum* and 1 adult *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato were collected from free-roaming cats; 1/5 (20%) from seropositive cats and 2/11 (18.2%) from seronegative had ticks (Table 2). No statistically significant association was found between the presence of ticks and rickettsiae seropositivity (CI 95% OR 1.1 0.08-16.31 p=1.00). Three nymph ticks *A. sculptum* collected from 3/16 (18.75%) free-roaming cats were randomly selected for the detection of SFG rickettsial DNA by PCR. No rickettsial DNA was detected in these ticks, despite producing amplicons on PCR targeting tick 16S rRNA gene to ensure successful extraction.

Frequencies and associations between individual and epidemiologic data is shown in table 3. Data has shown a statistically significant association between *Rickettsia* seropositivity and age (p=0.04), but not with sex (p=1.00) and sterilization (p=0.77). The differences in seroprevalence between shelter and free-roaming were also statistically significant (p=0.03). Animals under 12 months old had 4.3 (CI 95% 1.22 – 15.54) times higher chance to be infected than animals over 12 months old. The association was independent of the environment since age was not significant when cats were separated into sheltered (p=0.16) and free-roaming (p=0.45) groups (Table 3).

#### 4. Discussion

To the authors knowledge, the present study has been the first concomitant report of overlapping free-roaming cat and capybara populations in a BSF endemic area. Despite *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri* have been previously reported in cats and human cases from BSF endemic and nonendemic areas of São Paulo State (Horta et al., 2007), only stray or owned cats were surveyed. *Rickettsia rickettsii* has been the most important tick-borne zoonotic agent, primarily transmitted to human beings and other vertebrates by *Amblyomma sculptum* and *Amblyomma aureolatum* ticks (Labruna et al., 2017, 2011).

Only two cats have presented possible antigen involved in a homologous reaction (PAIHR) for *Rickettsia rickettsia*. As previously described in IFA tests, *Rickettsia rickettsia* and *Rickettsia parkeri* have been showed considerable cross-reactivity (Beati et al., 1994). Regardless, seropositivity of free-roaming cats overlapping capybara distribution may suggest their role as sentinels for human exposure to SFG rickettsiae, as previously observed in owned cats (Horta et al., 2007; Matthewman et al., 1997).

Owned cats from households of recent confirmed human cases of BSF areas from Piracicaba city were all 7/7 (100%) seropositive for *Rickettsia rickettsii* and 6/7 (85.7%) for *Rickettsia parkeri* (Horta et al., 2007), which is a higher frequency than the serosurvey of free-roaming and sheltered cats herein. These differences are probably due to the high numbers of infected ticks within the households studied.

The IFA endpoint titers for *Rickettsia* spp. varied from 64 to 1024 in both groups. Similar outcome for

both antigens has been previously reported; however, a few cats have presented higher titers of 2048 for both antigens (Horta, 2006). Contrary to previous studies that did not show significant association between rickettsiae seropositivity and habitat or outdoor activities (Case et al., 2006; Segura et al., 2014), the present study has shown that free-roaming cats had 80% lower likelihood of infection by *Rickettsia* than sheltered ones. Authors hypothesize that a rickettsial outbreak prior to cat rescue or during sheltering may have occurred and seroconverted shelter cats.

Cats younger than 12 months have 4.3 times higher chance of infection than older cats in the present study (Table 2). Although a previous study has found evidence of increasing exposure to *R. rickettsii* as a function of cat age (Case et al., 2006), other studies have found no association between age and rickettsiae seropositivity (Segura et al., 2014; Solano-Gallego et al., 2006). Kittens and younger cats have been statistically more susceptible to rickettsial infection maybe due to less efficient self-cleaning habits, particularly to Ixodid ticks, when compared to adult cats, making them more susceptible and leading to a potential outbreak when associated to infected tick infestation. Likewise, infestation of cat fleas (*Ctenocephalides felis*) has been higher in younger than older cats, as a direct relationship between host's ability to groom and ectoparasite intensity (Hinkle et al., 1998).

*Rickettsia* spp usually infect and remain inside host endothelial cells and molecular detection has been failed when investigating blood samples (La Scola and Raoult, 1997). Under experimental *Rickettsia rickettsii*-infected tick infestation, Rickettsial DNA has been detected by PCR in only one of 32 (3.1%) blood samples of infected capybaras, although serological titers up to 16,384 (Souza et al., 2009). In the same study, despite serological titers up to 32,768, direct intraperitoneal inoculation has failed to afford Rickettsial DNA detection in blood samples. Thus, in the present study, no molecular investigation was made on blood samples of free-roaming and sheltered cats. Previous studies in the same area of Piracicaba city have shown 3/7 (42.8%) (Horta et al., 2007) and 6/7 (85.7%) (Perez et al., 2008) seropositive cats to *Rickettsia* sp. concomitantly parasitized by nymphs of *Amblyomma* sp.. Despite neither previous study has molecularly tested ticks, *Rickettsia* spp. was not detected herein by PCR in *A. sculptum* ticks. Besides, in this study 3/7 (42.8%) dogs were seropositive to *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia parkeri*. Similarly, 6/12 (50%) shelter dogs were seropositive to *Rickettsia* spp. All dogs were rescued within campus limits but originary from outside campus, due to a no in-campus roaming dog policy. Finally, feral (free-roaming) cat movement has demonstrated periodical shift on home ranges with a 1.2 km mean distance between the centers of their successive home ranges (Edwards et al., 2001). Although the present study has found a relatively low frequency of Ixodidae tick infestation and cat seropositivity, the overlapping with capybaras' natural habitat sites may post cats as potential source for human infection. As equally or less exposed to rickettsial infection as owned cats in endemic areas, free-roaming and sheltered cats may be used as environmental sentinels for human exposure to SFG rickettsiae in such areas.

## 5. Conclusions

To the authors' knowledge, the present study was the first concomitant report of high free-roaming cat and capybaras populations overlapped in BSF endemic area. Cats under one year old may be

more susceptible to ticks and rickettsial infections probably due to kitten less efficient tick self-cleaning habit, leading to a potential outbreak when associated to infected tick infestation. Free-roaming and sheltered cats may be used as environmental sentinels for human exposure to SFG rickettsiae in such areas.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no competing interests.

#### Availability of data and material

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

#### Funding

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

## Acknowledgements

Authors are kindly thankful the “Luiz de Queiroz” Campus Administration Center (PUSP- LQ) for the study support and sample processing, and Dr. Amanda Haisi for the cat trappings and veterinary assistance. Dr. Mendes and Dr. Kmetiuk have been supported by graduate fellowships from CNPq and

101

Table 1. Cat worldwide seroprevalence against *Rickettsia rickettsii* and *R. parkeri*, according to available literature.

Location	Cat population	<i>Rickettsia</i> spp. and seropositivity (%)	Reference
28 States, USA	Paired samples from febrile and non-febrile owned cats.	Overall 8/182 (4.4) for <i>R. rickettsii</i> , with 6/91 (6.6) febrile and 2/91 (2.2) non-febrile cats.	Bayliss et al.(2009)
California and Wisconsin, USA	Owned, sheltered and feral cats.	29/170 (17.05) for <i>R. rickettsii</i> . 14/114 (12.3) sheltered and 9/36 (25.0) feral cats.	Case et al.(2006)
São Paulo State, Brazil	Cats from four endemic areas (trapped stray cats).	Overall 16/19 (84.2) for <i>R. rickettsii</i> and 15/19 (78.9) for <i>R. parkeri</i> . Piracicaba city with 7/7 (100%) for <i>R. rickettsii</i> and 6/7 (85.7%) <i>R. parkeri</i> .	Horta et al. (2007)
St Kitts, West Indies	Feral cats	22/52 (42.3) <i>R.rickettsii</i>	Kelly et al. (2017)
Northern California, USA	Owned cats from rural communities	23/29 (79.3) <i>R. rickettsii</i>	Stephenson et al.(2017)

Table 2. Seropositivity of cats and dogs sampled at the University of São Paulo at Piracicaba city, “Luiz de Queiroz” School of Agriculture (ESALQ-USP) from July to October 2017.

Specie	Habitat	Age	Sex	Ectoparasites	Titles
Cat					

		(months)			<i>R. rickettsii</i>	<i>R. parkeri</i>	PAIHR*
12	Sheltered	7	Sterilized male	-	64	NR	-
14	Sheltered	7	Female	-	128	512	-

102

15	Sheltered	12	Sterilized male	-	256	NR	-
17	Sheltered	7	Sterilized female	-	128	128	-
19	Sheltered	7	Female	-	128	NR	-
21	Sheltered	9	Sterilized male	-	64	64	-
22	Sheltered	12	Sterilized male	-	NR	64	-
23	Sheltered	7	Female	-	256	128	-
25	Sheltered	7	Sterilized male	-	NR	128	-
26	Sheltered	7	Sterilized male	-	64	NR	-
27	Sheltered	60	Sterilized male	-	512	64	<i>R. rickettsii</i>
28	Sheltered	60	Sterilized female	-	NR	64	-
29	Sheltered	7	Sterilized female	-	128	NR	-
31	Sheltered	7	Female	-	NR	64	-
33	Sheltered	7	Sterilized female	-	256	512	-
34	Sheltered	48	Sterilized female	-	NR	256	-
35	Sheltered	48	Sterilized female	-	NR	512	-
36	Sheltered	7	Sterilized male	-	128	NR	-
37	Sheltered	48	Sterilized female	-	256	512	-
38	Sheltered	36	Sterilized female	-	512	1024	-
39	Sheltered	24	Sterilized female	-	128	64	-
41	Sheltered	3	Male	-	NR	64	-
42	Sheltered	3	Male	-	256	128	-



06	Free-roaming	36	Male	-	128	256	-
07	Free-roaming	-	Female	-	64	64	-
08	Free-roaming	-	Male	-	NR	64	-
49	Free-roaming	36	Male	Tick	1024	64	<i>R. rickettsii</i>
50	Free-roaming	8	Sterilized male	-	NR	128	-

## Dogs

---

5	Sheltered	96	Female	-	512	512	-
6	Sheltered	60	Female	-	NR	128	-
7	Sheltered	48	Female	-	64	64	-
8	Sheltered	24	Male	-	NR	128	-
10	Sheltered	108	Male	-	1024	1024	-
13	Sheltered	36	Female	-	NR	128	-

---

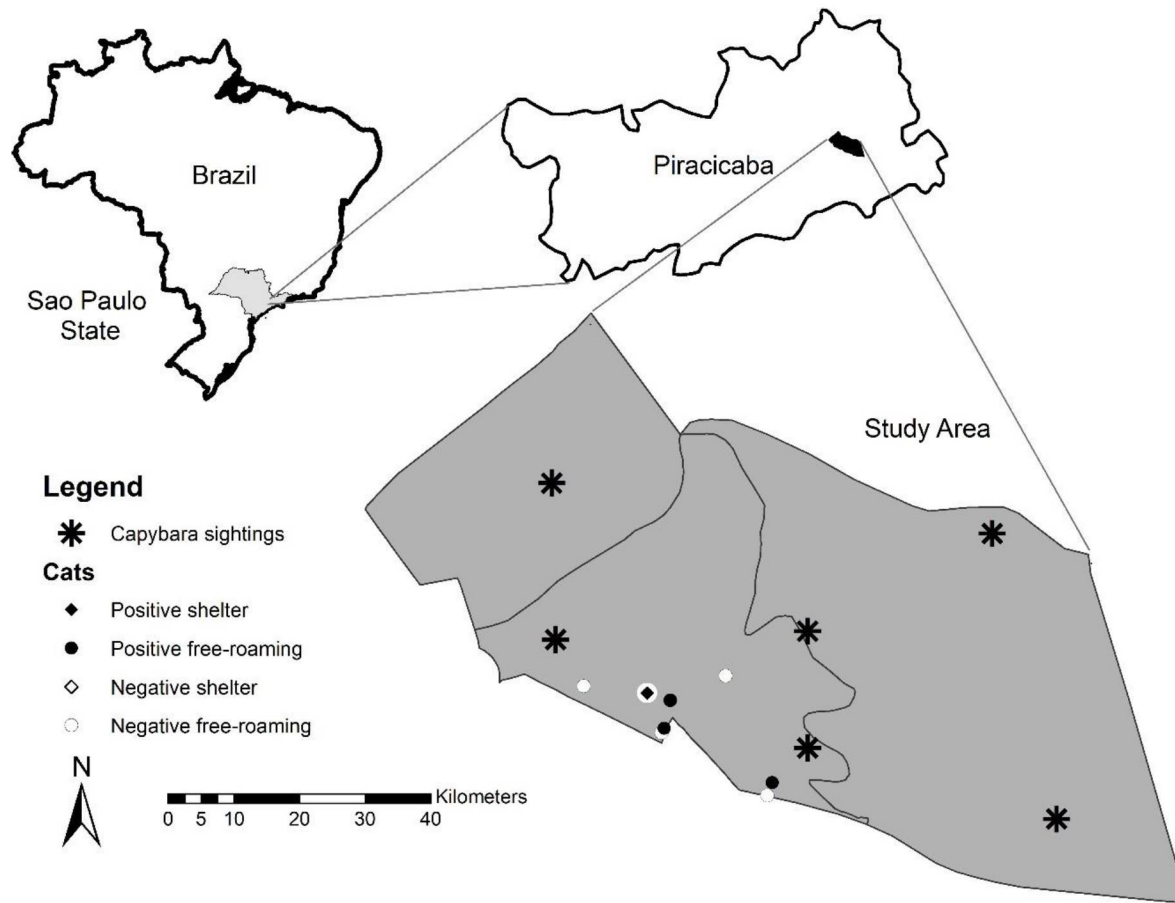
\*PAIHR: probable antigen involved in homologous reaction.

Table 3. Risk factors association among living status, age, sex and sterilization with *Rickettsia* seropositivity frequency of animals and groups (shelter and free- roaming), sampled at the University of São Paulo at Piracicaba city, “Luiz de Queiroz” School of Agriculture (ESALQ-USP) from July to October 2017.

Cats	<i>Rickettsia</i> (%) Positive	frequency Total	Odds Ratio	p
<b>Living status</b>				
Free-roaming	5 (31.2)	16 (100.0)	0.2 (0.07-0.84)	0.03
Shelter	23 (65.7)	35 (100.0)		
<b>Age</b>				
Up to 12 months	15 (75.0)	20 (100.0)	4.3 (1.22-15.54)	0.04
Over 12 months	11 (40.7)	27 (100.0)		
<b>Sex</b>				
Male	14 (56.0)	25 (100.0)	1.1 (0.36-3.29)	1.00
Female	14 (53.8)	26 (100.0)		
<b>Sterilization</b>				
Intact	10 (50.0)	20 (100.0)	0.72 (0.23-2.24)	0.77
Neutered	18 (58.1)	31 (100.0)		
<b>Groups</b>				
<i>Shelter</i>				
Up to 12 months	14 (77.8)	18 (100.0)	3.11 (0.72-13.44)	0.16
Over 12 months	9 (52.9)	17 (100.0)		

<i>Free-roaming</i>				
Up to 12 months	1 (50.0)	2 (100.0)	4.00 (0.16-95.76)	0.45
Over 12 months	2 (20.0)	10 (100.0)		
<hr/>				
Sex				
<i>Shelter</i>				
Male	10 (66.7)	15 (100.0)	1.08 (0.26-4.42)	1.00
Female	13 (65.0)	20 (100.0)		
<i>Free-roaming</i>				
Male	4 (40.0)	10 (100.0)	3.33 (0.28-40.29)	0.58
Female	1 (16.7)	6 (100.0)		
<hr/>				
Sterilization				
<i>Shelter</i>				
Intact	6 (75.0)	8 (100.0)	1.76 (0.30-10.47)	0.68
Neutered	17 (63.0)	27 (100.0)		
<i>Free-roaming</i>				
Intact	4 (33.3)	12 (100.0)	1.50 (0.12-19.44)	1.00
Neutered	1 (25.0)	4 (100.0)		
<hr/>				

Figure 11 (Figure 1. The University of São Paulo at Piracicaba city, “Luiz de Queiroz” School of Agriculture (ESALQ-USP), with spatial location of capybaras sightings and location of sheltered and free-roaming cats, sampled from July to October 2017.)





UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OFÍCIO Nº 072/2017

**Para: Alexander Welker Biondo**  
**Assunto: Protocolo 059/2017**

Prezado(a) pesquisador(a),

Após avaliação do projeto sob sua responsabilidade, de protocolo número 059/2017, intitulado **“Prevalência da Infecção por *Rickettsia* em javalis (*Sus scrofa*), cães de caça e seres humanos, nos Campos Gerais, Paraná”**, pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias – UFPR, consideramos por meio deste solicitar:

1. Anexar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido dos caçadores para a realização das coletas.
2. Corrigir o prazo do experimento (Item 1 do formulário).
  - 2.1. Indicar as datas de início e término no formato dia/mês/ano.
  - 2.2. A data de início deve ser posterior à 04/08/2017.
3. Determinar, com base na legislação vigente, a idade dos animais abatidos (em anos, meses ou dias) na tabela de tipo e característica (Item 9.2).
4. Preencher o Termo de Responsabilidade (Item 14) com dados do Responsável exposto no Item 3.

Agradecemos a compreensão e aguardamos seu retorno.

Curitiba, 4 de agosto de 2017.

Atenciosamente,

*Chayane da Rocha*  
Chayane da Rocha  
**Coordenadora CEUA SCA**

CIENTE:

Nome e assinatura do proponente

DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Agrárias - UFPR



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 078/2017, referente ao projeto "JAVALIS COMO SENTINELAS EM SAÚDE ÚNICA", sob a responsabilidade de **Alexander Welker Biondo** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de Outubro, de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DO SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ - BRASIL, com grau 1 de invasividade, em reunião de 04/08/2017.

Vigência do projeto	Outubro/2017 até Agosto/2018
Especie/Linhagem	<i>Sus scrofa</i> (javali, espécie silvestre não-brasileira)
Numero de animais	50
Peso/Idade	80 kg / 1 a 5 anos
Sexo	Não especificado
Origem	Fazenda em Campos Gerais, Paraná

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 078/2017, regarding the project "WILD BOAR AS SENTINELS IN ONE HEALTH" under **Alexander Welker Biondo** supervision – which includes the production, maintenance and/or utilization of animals from Chordata phylum, Vertebrata subphylum (except Humans), for scientific or teaching purposes – is in accordance with the precepts of Law nº 11.794, of 8 October, 2008, of Decree nº 6.899, of 15 July, 2009, and with the edited rules from Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), and it was approved by the ANIMAL USE ETHICS COMMITTEE OF THE AGRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 08/04/2017.

Duration of the project	October/2017 until August/2018
Specie/Line	<i>Sus scrofa</i> (wild boar, non-Brazilian wild species)
Number of animals	50
Wheight/Age	80 kg / 1 to 5 years
Sex	Not specified
Origin	Farm in Campos Gerais, Paraná

Curitiba, 4 de agosto de 2017.

*Chayne da Rocha*  
Chayne da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA

Plataforma Brasil

plataformabrasil.saude.gov.br/visao/pesquisador/gerirPesquisa/ge

Saúde  
Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

Público Pesquisador Alterar Meus Dados

Alexander Welker Blomdo - Pesquisador | V3.2  
Sua sessão expira em: 39min 53

### DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

#### DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de *Rickettsia* spp em javalis (*Sus scrofa*), cães de caça e controladores de javalis, na região dos Campos Gerais, Paraná.  
Pesquisador Responsável: Alexander Welker Blomdo  
Área Temática:  
Versão: 3  
CAAE: 97639017.7.0000.0102  
Submetido em: 21/11/2018  
Instituição Proponente: Departamento de Medicina Veterinária  
Situação da Versão do Projeto: Aprovado  
Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável  
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Comprovante de Recepção PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_884915

#### DOCUMENTOS DO PROJETO DE PESQUISA

Tipo de Documento	Situação	Arquivo	Postagem	Ações
Versão Atual Aprovada (PO) - Versão 3				
Pendência de Parecer (PO) - Versão 3				
Currículo dos Assistentes				
Documentos do Projeto				
Comprovante de Recepção - Submissão				
Declaração de Pesquisadores - Submissão				
Folha de Rosto - Submissão 9				
Informações Básicas do Projeto - Submissão				
Outros - Submissão 9				
Projeto Detalhado / Brochura Investigação				

Parece que você não usou o Firefox durante um bom tempo. Gostaria de fazer uma limpeza para deixá-lo como se fosse recém-instalado? A propósito, bem-vindo de volta!

Restaurar o Firefox...

17:19  
19/05/2019



**AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO DO PARANÁ**

Número: 30.17

Data de Emissão: 22.09.2017

**Dados do Pesquisador e da Pesquisa**

Nome: Louise Nicolle Bach Kmetiuk

RG: 8.109.951-0

CPF: 081.373.549-13

Título do Projeto: Controle populacional e sanidade de javalis (*Sus scrofa*) presentes no Parque Estadual de Vila Velha.

Palavras-chave: javalis; controle populacional; PE de Vila Velha; Unidades de Conservação.

**Cronograma de Coletas:**

Unidade de Conservação:

Parque Estadual de Vila Velha - SET/17 – SET/18

**Equipe de Trabalho:**

Alexander Welker Biondo	RG: 1.727.346-1
Amanda Haisi	RG: 075.668-2
Fernanda Pistori Machado	RG: 9.933.983-7
Ismail da Rocha Neto	RG: 8.078.819-3
Leandro Cavalcante Lipinski	RG: 7.749.503-7

**Observações:**

1. Não é permitida a coleta de espécies ameaçadas ou em risco de extinção;
2. As gerências da(s) UC(s) devem ser comunicadas com antecedência sobre os trabalhos em campo a serem realizados na Unidade;
3. Esta autorização tem validade até 22.09.2018 podendo ser renovada no final do período.
4. Esta autorização não dá o direito do uso das imagens oriundas desse trabalho.
5. O pesquisador titular fica inteiramente responsável por qualquer integrante da sua equipe de trabalho, sendo ele brasileiro ou estrangeiro.

Guilherme de Camargo Vasconcellos  
Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas – DIBAP  
Curitiba, 22 de setembro de 2017.



113  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

CONTROLE POPULACIONAL E SANIDADE DE JAVALIS (*SUS SCROFA*)  
PRESENTES NO PARQUE ESTADUAL DE VILA VELHA  
DOUTORANDA: M.V LOUISE NICOLLE BACH KMETIUK  
ORIENTADOR: PROF. DR. ALEXANDER WELKER BIONDO CURITIBA, PR,  
BRASIL

O Parque Estadual de Vila Velha caracteriza-se como uma unidade de conservação de proteção integral, tendo por finalidade a preservação da diversidade de uma amostra do ecossistema natural. O javali (*Sus scrofa*) inserido na categoria I de classificação de espécie exótica invasora no Brasil, adaptou-se amplamente aos ecossistemas nacionais, a exemplo do bioma Mata Atlântica presente no Parque Estadual de Vila Velha, alterando processos bióticos das espécies nativas e causando prejuízos no âmbito social e econômico. Os javalis podem manter ou amplificar vetores, agentes bacterianos, virais e parasitários, prejudiciais à saúde de animais domésticos, silvestres e do homem como bactérias do gênero *Rickettsia*, agentes etiológicos da Febre Maculosa Brasileira. Dessa forma, o presente projeto pretende, baseado no que propõe o Plano de Manejo do Parque Estadual de Vila Velha, analisar o impacto de sua invasão biológica, instaurar um plano de manejo para controle dos javalis nas dependências desta Unidade de Conservação, bem como avaliar seu caráter sanitário e o seu papel no ciclo epidemiológico de agentes zoonóticos, como as bactérias do gênero *Rickettsia* spp.

Palavras-chave: feral pigs, wild boars, *Rickettsia*, Brazilian Spotted Fever.

## 1. Introdução

A complexidade de doenças relevantes para a Saúde Única pode ser associada à ampla gama de hospedeiros que seus agentes etiológicos são capazes de acometer, relacionando-se a isso a emergência e reemergência dessas doenças (TAYLOR; LATHAM; WOOLHOUSE, 2001; WOOLHOUSE; GOWTAGE-SEQUERIA, 2005). A análise de aspectos epidemiológicos de doenças transmitidas por vetores revela que os seus cursos estão ligados a multiplicidade de fatores que interagem no meio-ambiente e entre seres humanos e animais, como os cães e javalis e vetores (MCNEILL, 2010). Os javalis podem manter ou amplificar vetores, agentes bacterianos, virais e parasitários, prejudiciais à saúde de animais domésticos, silvestres e do homem (BYWATER et. al, 2010), como bactérias do gênero *Rickettsia* spp., agentes etiológicos da Febre Maculosa Brasileira. Seus principais vetores, os carrapatos, são considerados hospedeiros acidentais reflexo de mudanças ecológicas (OGRZEWALSKA et. al, 2012), sendo importantes na sua manutenção como reservatórios e/ou amplificadores em áreas rural e periurbanas (PAROLA et. al, 2013). Considerados uma das espécies mais invasoras do mundo, com populações distribuídas em todos os continentes exceto a Antártica, os suídeos asselvajados (*Sus scrofa* - Artiodactyla, Suidae) (LOWE et al. 2000) possuem como um dos representantes no Brasil os javalis. São classificados, em território brasileiro, como fauna exótica invasora devido a sua introdução em biomas nacionais, alterando processos bióticos e ocasionando prejuízos no âmbito social e econômico (FRANKENBERG, 2005). São enquadrados na categoria I de espécies exóticas invasoras, sendo seu transporte proibido, bem como sua criação, soltura, propagação, comércio, doação ou aquisição intencional em qualquer circunstância (Portaria IAP, no 59). Considera-se que ocorreu no Brasil a invasão biológica desta espécie, estando presentes em 472 municípios, com 133 na Região Sul (PEDROSA, 2015). Acredita-se que seu estabelecimento no Paraná ocorreu no município de Palmeira, na década de sessenta (DEBERDT; SCHERER, 2007). Seu impacto ambiental, social e econômico é ainda pouco estudado, entre eles o efeito de populações de suídeos selvagens na epidemiologia de doenças infecciosas de transmissão para humanos e animais (RAMOS et. al, 2014). De acordo com a Instrução Normativa nº 03/2013, de 31 de janeiro de 2013, o controle do javali de vida livre pode ser realizado através da caça, sendo comum o uso de cães para rastreamento (IBAMA, 2013). Um exemplo de bioma que os javalis adentraram e causaram impacto é a Mata Atlântica, a qual é composta por um conjunto de formações florestais e ecossistemas associados, como os campos de altitude, característicos da região dos Campos Gerais (Paraná), que devido ação antropomórfica encontra-se bastante fragmentado. Estimase que este bioma abrigue cerca de 270 espécies de mamíferos, 849 espécies de aves, 370 espécies de anfíbios, 200 espécies de répteis, 350 espécies de peixes e

20.000 espécies vegetais (BRASIL, 2016). Além da presença de espécies invasoras como os javalis, o desmatamento também acarreta em alterações na biodiversidade que estão relacionadas a epidemiologia de agentes patogênicos de importância para a Saúde Única (MCNEILL, 2010), como do gênero *Rickettsia* spp. O gênero *Rickettsia* (família Rickettsiaceae e ordem Rickettsiales) compreende bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias, pleomórficas cocobacilares, causadoras de doenças zoonóticas em todos os continentes. O gênero é dividido em três grupos: grupo do Tifo (composto por *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*), o grupo da Febre Maculosa (composto por mais de 20 espécies transmitidas por carrapatos) (RAOULT; ROUX, 1997) e grupo ancestral (composto pelas *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis*) (YU; WALKER, 2006). Dentre elas, a *Rickettsia rickettsii* é considerada a espécie de maior patogenicidade (CHAPMAN, 2006) e principal agente etiológico da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (EUA) e Febre Maculosa Brasileira (Brasil). Até 2009 era o único agente conhecido soropidemiológicos nessa em cães são de grande importância para vigilância da FMB e reconhecimento da circulação do agente (OGRZEWALSKA et. al, 2012). Tanto *A. sculptum* quanto *A. aureolatum* podem veicular riquetsias para seres humanos no Brasil. Áreas nativas que sofreram a ação antrópica são ambientes considerados ótimos para o *A. sculptum*, sendo comum a ocorrência de parasitismo humano nesses locais (PINTER; LABRUNA, 2006). Cães que adentram áreas degradadas de Mata Atlântica podem carrear *A. aureolatum* para os lares, aumentando o risco de parasitismo e possível infecção com *Rickettsia rickettsii* (OGRZEWALSKA et. Al, 2012).

Segundo o Plano de Manejo do PEVV (2004), o subprograma de monitoramento prevê avaliar o comportamento ambiental da Unidade de Conservação frente as modificações impostas pelo meio através de agentes externos (pressão antrópica interna) e agentes internos (invasão de espécies exóticas, visitação). A região dos Campos Gerais é formada por extensas áreas de Mata Atlântica, que abriga além da fauna nativa, animais exóticos como os javalis. Devido ao impacto ecológico que esses animais são capazes de realizar, seu controle é permitido por controladores cadastrados no IBAMA. Javalis podem manter ou amplificar vetores e agentes bacterianos, como do gênero *Rickettsia* spp, causadores da Febre Maculosa Brasileira, a doença veiculada por carrapatos de maior importância no país. Visto que o papel dos javalis no ciclo epidemiológico da Febre Maculosa Brasileira permanece desconhecido, e que esses animais interagem com a fauna nativa e animais reservatórios como as capivaras, o presente trabalho pretende avaliar os aspectos citados sob o âmbito da Saúde Única, podendo tornar-se modelo para demais unidades de conservação que possuam população de javalis.

## 2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo, baseado no que propõe o Plano de Manejo do Parque Estadual de Vila Velha (podendo se estender para os demais parques da Região dos Campos Gerais), analisar o impacto de sua invasão biológica, instaurar um plano de manejo para controle dos javalis nas dependências desta Unidade de Conservação, bem como avaliar seu caráter sanitário e o seu papel no ciclo epidemiológico de agentes zoonóticos, como as bactérias do gênero *Rickettsia*.

### 2.1. Objetivos Específicos

1-Avaliar e instaurar medidas de controle e erradicação dos javalis no Parque Estadual de Vila Velha;

2-Analisar o impacto da invasão biológica dos javalis através de possível monitoramento por câmeras de segurança e pela percepção dos funcionários do Parque Estadual de Vila Velha;

3-Detectar anticorpos anti-*Rickettsia* spp. através de soros de javalis através de Imunofluorescência Indireta (RIFI);

4-Coletar e realizar a análise taxonômica dos carrapatos presentes em javalis provenientes do Parque Estadual de Vila Velha. 5-Avaliar a carga parasitária de carrapatos em javalis (*Sus scrofa*) provenientes do Parque Estadual de Vila Velha.

### 3. Evidências de interesse

Considera-se que espécie exótica invasora é aquela que, quando introduzida por meio de ações antrópicas, difunde-se em região diferente do local de origem, ameaçando a biodiversidade nativa. O processo de invasão biológica em ambientes constitui-se como uma ameaça ao meio ambiente, acarretando em prejuízos à economia, à biodiversidade de ecossistemas naturais, além dos riscos à Saúde Única (LEÃO et al., 2011). A introdução de espécies está entre os três principais fatores

que alteram a biodiversidade, juntamente com as mudanças no uso da terra e a emissão de gases de efeito estufa (CHAPIN, 2000). Presentes em todos os continentes (exceto a Antártida), os javalis parecem pré-adaptados a uma variedade de condições ambientais (BARROSGARCIA, 2012). De hábito onívoro oportunista e alta plasticidade da dieta, podem se alimentar de raízes de plantas, sementes, pequenos anfíbios, répteis, carcaças de animais, adaptando-se a uma ampla variedade de ecossistemas (DEBERDT, 2007). Podem modificar o nicho ecológico de uma infinidade de espécies vegetais e animais, através da variação de disponibilidade e fluxo de nutrientes e de recursos físicos (água, calor, luz, entre outros) (CROOKS, 2002). Um exemplo é a mudança de hábito alimentar de espécies como cateto (*Pecari tajacu*) e queixada (*Tayassu pecari*), os quais competem em nível desigual com os javalis pelos recursos da mata, havendo registros dessas espécies nativas em plantações de cereais na região dos Campos Gerais no Paraná. O Parque Estadual de Vila Velha caracteriza-se como uma Unidade de Conservação de

proteção integral. A presença de espécies exóticas, como o javali, pode difundir conceito equivocado a respeito das espécies que constituem o ecossistema natural, criando conceitos ecológicos inadequados e possível resistência para sua erradicação (CARPANEZZI, 2007). O Parque Estadual de Vila Velha está inserido na Região dos Campos Gerais, e sua expressiva presença de javalis asselvajados se deve a sua rápida expansão e ao fácil acesso as culturas agrícolas presentes no entorno do parque a exemplo de cereais, que se tornaram fontes abundantes de alimento. Dessa forma, os javalis causam prejuízos econômicos a agricultura, destruindo plantações de milho, cevada, trigo, arroz, sorgo, batatas, centeio e aveia (SCHLEY; ROPER, 2003). Com até duas ninhadas por ano e uma média de 4 a 6 leitões, a ausência de predadores naturais e sua alta capacidade adaptativa possibilitam seu aumento populacional (BYWATER, 2010), o qual pode chegar a 150% ao ano (MASSEI, 2004). Em cenário asselvajado, fêmeas e leitões são encontrados em grupos, e os macho/s se mostram ainda mais agressivos em época de acasalamento (GRAVES, 1984). Portanto, baseado no que propõe o Plano de Manejo do Parque Estadual de Vila Velha, a extensiva presença de javalis nos arredores desta unidade de conservação, e a circulação do gênero *Rickettsia* na região dos Campos Gerais e de espécies de carrapatos relevantes no ciclo epidemiológico da doença, torna-se necessário inquérito sorológico e o controle populacional de javalis (ANEXO 1-LAUDO CÃES).

### 5. Metodologia

#### 5.1 Local de estudo

O PEVV está localizado no segundo planalto paranaense, denominado Campos Gerais, no município de Ponta Grossa tendo sua entrada principal pela BR 376, totalizando uma área de 3.122,11 ha, entre as coordenadas 25° 12'34" e 25° 15'35" de latitude S, 49° 58'04" e 50° 03'37" " com uma altitude máxima de 1.068m na área denominada Fortaleza (IAP, 2004). Os Campos Gerais do Paraná compreendem a região fitogeográfica localizada no sul do Brasil, no centro do estado a oeste da Escarpa Devoniana, denominada de Segundo Planalto. O clima é classificado como Temperado Úmido, com temperatura média de 17.5 °C e pluviosidade média anual de 1495 mm<sup>3</sup>, e o bioma encontrado é a Mata Atlântica. É também conhecida por área de influencia do município de Ponta Grossa, que possui um IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) considerado alto, de 0,763 (IBGE, 2010). Nas áreas adjacentes ao parque há municípios que correspondem a Região dos Campos Gerais, com alto contingente populacional em zona rural, e áreas de mata associadas a plantações de grãos, com elevada densidade de javalis e ocorrência de seu controle populacional através da caça e rastreio com uso de cães, havendo contato próximo entre cães de caça, javalis e seres humanos.

#### 5.2 Método de controle e monitoramento dos javalis

A captura de animais será realizada por meio da implantação de curral em área de 5.000m<sup>2</sup>, sendo que os animais serão atraídos por meio de ceva. Considerou-se como a medida de escolha visto que diminui o contato direto com o animal, preservando a integridade física do responsável pelo controle do javali, visto que não haverá perseguição do animal. Após captura, os animais

serão abatidos pelo uso de arma de fogo, com posterior coleta de sangue, tecidos e ectoparasitas do animal abatido, nas dependências da Fazenda Cambiju, que se localiza contígua ao PEVV (Rodovia do Café, 522-Ponta Grossa, PR).

### 5.3 Amostras de soro de javalis

Amostras de sangue de javalis serão obtidas posteriormente a captura dos javalis para controle, dentro do PEVV. Serão coletados 8 ml de sangue, por punção cardíaca post-mortem, e armazenados em tubos de vácuo estéril contendo gel separador de soro. As amostras serão centrifugadas a 1500 rpm durante 5 minutos, e o soro aliquotado e armazenado a -80 °C, até a realização de ensaio de Imunofluorescência Indireta (RIFI) (MORAIS-FILHO et. al, 2009), no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Preventiva (VPS)- Universidade de São Paulo (USP). Serão testados para antígenos de cinco espécies de riquetsias do grupo da Febre Maculosa isoladas no Brasil, sendo elas *R. parkeri* cepa At24 (SILVEIRA et. al, 2007), *R. amblyommi* cepa Ac37 (LABRUNA et. al, 2004 a1), *R. rhipicephali* cepa HJ5 (LABRUNA et. al, 2005a), *R. rickettsii* cepa Taiacu (LABRUNA et al., 2004; HORTA et al., 2007), *R. belli* cepa Mogi (PINTER, LABRUNA et. al, 2006). Cada espécie de riquetsia será cultivada em células Vero, e colhidas quando 100% das células estiverem infectadas. As células colhidas serão centrifugadas a 12.000 rpm por dez minutos. O sedimentado será lavado em solução de tampão fosfato-salino 0,1 M, ph de 7,4, centrifugado novamente e ressuspendido em PBS acrescido com 1% de Soro Fetal Bovino e Azida de Sódio a 0,1%. Cada poço da lamina receberá 10 microlitros de células infectadas para cada espécie de *Rickettsia*, sendo posteriormente secas e fixadas em acetona por 10 minutos, e mantidas a -80°C até a utilização (HORTA et. al, 2007). No momento da utilização, as laminas serão lavadas por minutos em cubas contendo PBS, e posteriormente secas a 37°C. Os soros dos cães serão descongelados a temperatura ambiente e homogeneizados em vórtex. Para cada poço da placa serão adicionados 189 microlitros de PBS e 3 microlitros de soro. Nas laminas correspondentes aos antígenos testados, serão pipetados 15 microlitros da solução realizada anteriormente. As laminas serão incubadas a 37°C em câmara úmida, e posteriormente lavadas com solução de lavagem por 10 minutos, em duas vezes. Posteriormente serão incubadas com conjugado de imunoglobulina anti- suíno produzido em coelho (IgG, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO), por 30 minutos a 37°C e dupla lavagem em solução de lavagem com azul de Evans por dez minutos. As laminas serão montadas com lamínulas e solução tamponada de glicerina. A leitura será realizada utilizando-se microscópio de imunofluorescência (Olympus BX60, Japão), em um aumento de 400x. Serão consideradas reagentes amostras com títulos  $\geq 64$ . O soro que mostrar um título de espécie de *Rickettsia* pelo menos quatro vezes superior ao observado para qualquer outra espécie de *Rickettsia* será considerado homólogo à primeira espécie de *Rickettsia* ou a um genótipo muito próximo. Para cada lamina será utilizado um soro sabidamente positivo (controle positivo) e um soro anteriormente testado negativo (controle negativo),

na diluição de 1:64. A titulação final será determinada para as amostras consideradas reativas, após duas ou três repetições (LABRUNA et. al, 2007a; PINTER et. al, 2008). conjugado imunoglobulina anti-suíno de coelho G (IgG, Sigma Diagnostics, St. Louis, MO).

5.4 Coleta dos carrapatos de javalis Após o abate, os javalis serão inspecionados pelo mesmo observador durante o período de dez minutos, e os carrapatos observados serão coletados e armazenados em frascos contendo álcool absoluto.

5.5 Coleta dos carrapatos do meio ambiente Serão coletados carrapatos de pontos determinados das áreas comuns a javalis, cães de caça e caçadores, através dos métodos de arraste de flanela (TERASSINI et. al, 2010), armadilha de CO<sub>2</sub> (SZABÓ et. al, 2009) e busca visual.

5.6 Identificação Taxonômica dos carrapatos Os estágios de ninfa e adulto dos carrapatos coletados serão identificados, através de sua morfologia e a nível de espécie, segundo descrito por Barros-Battesti et. al (2006) e Martins et. al (2010).

## 8. Referencias

BARROS-BATTESTI, D. M. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo, Vox/ICTTD3/, Butantan, 2006. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente Mata Atlântica. Disponível em:

<http://www.mma.gov.br/biomas/mata-atlantica>. Acesso em 03 maio 2016. BYWATER, K.A, et. al. Litter size and latitude in a large mammal: The wild boar *Sus scrofa*. *Mammal Review*. 40: 212– 220, 2010.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. *American Journal of Tropical Medicina and Hygiene*. 19(6): 1010-1014, 1970.

CARPANEZZI, O. T. B. Espécies Vegetais Exóticas No Parque Estadual De Vila Velha : Subsídios Para Controle E Erradicação. 56 f. Monografia (Especialização em análise ambiental) - Setor de Ciências da Terra, Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2007.

CHAPIN, F. S., et al. Consequences of changing biodiversity. *Nature*. v. 405, p. 234- 242, 2000. CHAPMAN, A. S., et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis— United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. *MMWR Recomm Rep*. 55:1– 27, 2006.

CROOKS, J. A. Characterizing ecosystem-level consequences of biological invasions: the role of ecosystem engineers. *Oikos*. v. 97: 153–166, 2002.

DEBERDT, A. J.; SCHERER, S. B. O javali asselvajado: ocorrência e manejo da espécie no Brasil. 2 ed. Goiás: Artigos Técnico-científicos, 2007.

FRANKENBERG, V. S. T. Levantamento e validação da Portaria 138/02 e Instrução Normativa 25/04, que regulamentaram o controle do javali (*Sus scrofa*) no Rio Grande do Sul no período compreendido entre 2003 e 2005.

Produto PNUD, Projeto BRA/01/037, Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis – IBAMA, 2005.



- GRAVES, H.B. Behavior and Ecology of wild and feral swine (*Sus scrofa*). *Journal of Animal Science* 58:482-492, 1984.
- HORTA, M. C. et. al. *Rickettsia* infection in five áreas of the state of São Paulo, Brazil. *Memórias Oswaldo Cruz*. 102(7):793-801, 2007.
- IBAMA. Instrução Normativa número 3 de 31 de janeiro de 2013 do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). Brasília: Ministério do Meio Ambiente, 2013. IBGE, 2010. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/>
- KRAWCZAK, et. al. Ecology of a tick-borne spotted fever in Southern Brazil. *Experimental and Applied Acarology*. 69(5), 2016.
- LABRUNA, M. B. et. al. *Rickettsia belli* and *Rickettsia amblyommi* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondonia, Western Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 41:1073-1081, 2004. LABRUNA, M.B., et. al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, western Amazon, Brazil. *Vector-Borne Zoonotic Dis*; 7:249–255, 2007.
- LABRUNA, M.B. et al. Rocky Mountain Spotted Fever in Dogs, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 15(3): 458-460, 2009.
- LABRUNA, M.B. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann N Y Acad Sci*. 1166:156– 166, 2009.
- LABRUNA, M. B. et. al. Genetic identification of rickettsial isolates from fatal cases of Brazilian spotted fever and comparison with *Rickettsia rickettsii* isolates from the American continents. *J Clin Microbiol* 52:3788–379, 2014.
- LABRUNA, M. B., et. al. Prevalence of *Rickettsia* Infection in Dogs from the Urban and Rural Areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. *Vector Born and Zoonotic Disease*. 7: 249- 256, 2007a.
- LABRUNA, M. B., et al. Infection by *Rickettsia bellii* and *Candidatus "Rickettsia amblyommii"* in *Amblyomma neumanni* ticks from Argentina. *Microb. Ecol*. 54:126–133, 2007b.
- LEÃO, T. C. C, ALMEIDA, W. R.; DECHOUM, M.; ZILLER, S. R. 2011. Espécies Exóticas Invasoras no Nordeste do Brasil: Contextualização, Manejo e Políticas Públicas. Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste e Instituto Hórus de Desenvolvimento e Conservação Ambiental. Recife, PE. 99 p. Ebook.
- Disponível em <http://cepan.org.br/uploads/file/arquivos/6b89ddc79ee714e00e787138edee8b79.pdf>
- MASSEI, G., GENOV, P.V. The environmental impact of Wild Boar. *Galemys*. 16:135- 145, 2004. MARTINS, T.F; ONOFRIO, V.C.; BARROS-BATTESTI, D.M.LABRUNA, M.B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescriptions, and identification key. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 1(2): 75-99, 2010. MARTINS, T.F. 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*. 9:186, 2016.
- LE MOS, E.R.S. et. al. Spotted fever in Brazil: an epidemiological study and description of clinical cases in an endemic area in the state of Sao Paulo. *Am. J. Trop. Med.* 65: 329–334, 2001.
- LOWE, S., BROWNE, M. BOUDJELAS, S., DE POORTER, M. 100 of the world's worst invasive alien species: a selection from the global invasive species database. Invasive Species Specialist Group, Auckland, 2000.
- MCNEILL, W.H. *Plagues and Peoples*. Anchor Books, New York, 2010.
- MORAES-FILHO, J. et. al. New epidemiological data on Brazilian spotted fever in an endemic area of the state of Sao Paulo, Brazil. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 9: 73–78, 2009.
- OGRZEWALSKA, M. et. al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. *Parasitology*. 139 (10): 1283-1300, 2012.
- PEDROSA, F. et al. Current distribution of invasive feral pigs in Brazil: economic impacts and ecological uncertainty. *Natureza&Conservação*, 2015.
- PINTER, A.; LABRUNA, M.B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia belli* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1078:523- 529, 2006.
- PINTER et. al. Serosurvey of *Rickettsia* spp. in dogs and humans from na endemic área for Brazilian spotted fever in the State of São Paulo, Brazil. *Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro*. 24(2):247-252, 2008.
- RAOULT, D.; V. ROUX. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clin. Microbiol. Rev.* 10:694–719, 1997.
- RAMOS, V. N. et. al. Feral pigs as hosts for *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) populations in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Exp Appl Acarol.* 64:393–406, 2014.
- 123
- SANGIONI, L. A. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases*. 11: 265-269, 2005.
- SHEPARD C.C, TOPPING N.H. Rocky Mountain spotted fever. A study of complement fixation in the serum of certain dogs. *J Infect Dis.* 78: 63–68, 1946.
- SCHLEY, L.; ROPER, T.J. Diet of Wild Boar (*Sus scrofa*) in Western Europe, with particular reference to consumption of agricultural crops. *Mammal Review* 33(1):43-56, 2003.
- SINAN, Sistemas de Informação de Agravos de Notificação. Disponível em: <http://sinan.saude.gov.br>.
- SILVEIRA, I.; PACHECO, R.C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 13(7):1111-1113, 2007.
- SPOLIDORIO, M.G, et. al. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 16(3):521–3, 2010.
- SZABÓ, M. P. J. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animals trails within Atlantic rainforest in South-eastern Brazil. *Annals of*

Tropical and Medicina and Parasitology. 103 (1): 57-72, 2009. TAYLOR, L.H., LATHAM, S.M., WOOLHOUSE, M.E. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* v. 356: 983–9, 2001. TERASSINI, F. A. Comparison of two methods for collecting free-living ticks in the Amazonian forest. *Ticks and Tick Borne Diseases.* 1 (4): 194-196, 2010. WOOLHOUSE M., GOWTAGE- SEQUERIA S. Host range and emerging and reemerging pathogens. *Emerg Infect Dis.* 11(12): 1842-7, 2005. YU, X.J.; WALKER, D. H. *The Order Rickettsiales.* 3rd. ed. New York: Springer, 2006.