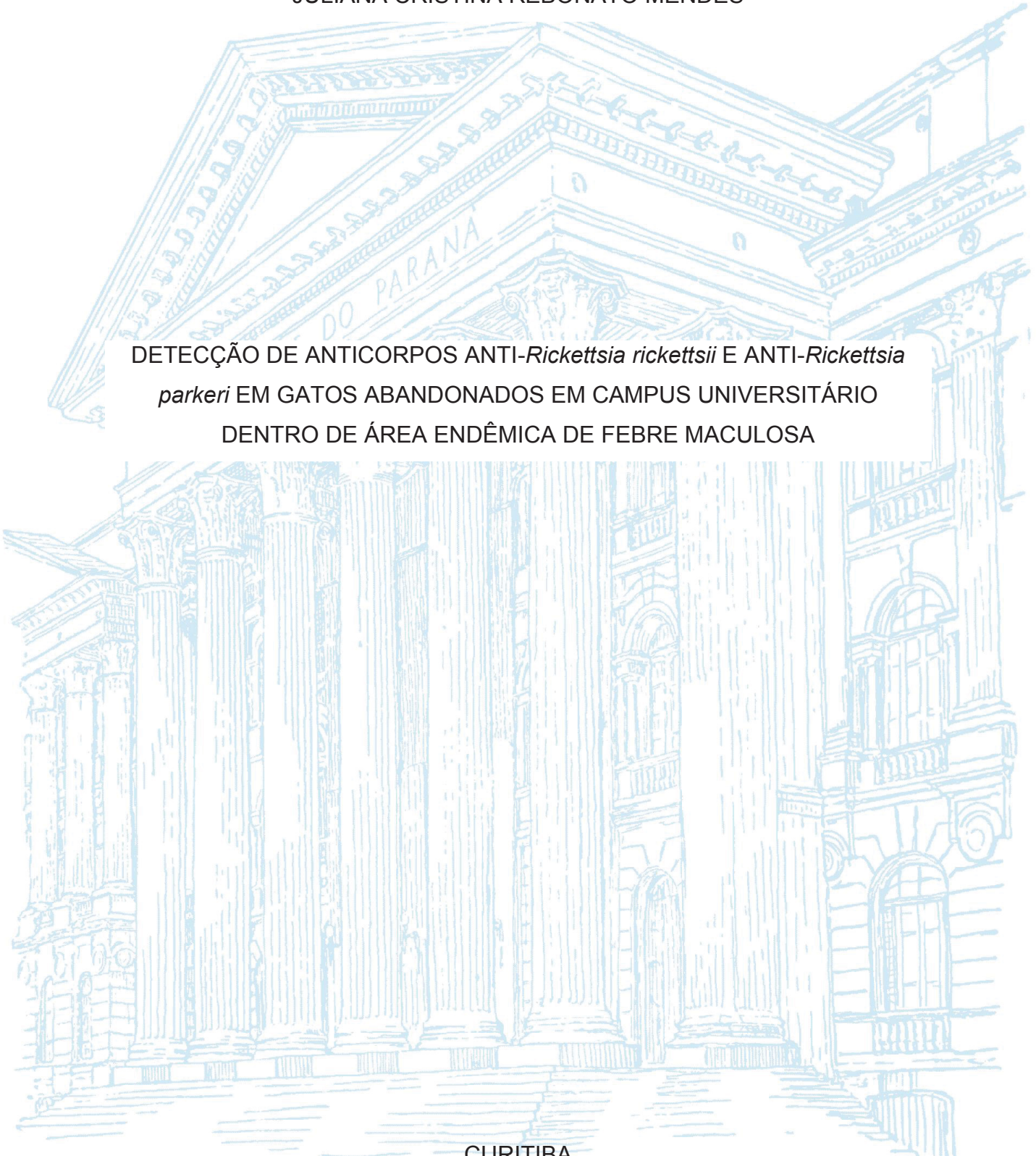


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JULIANA CRISTINA REBONATO MENDES



DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia rickettsii* E ANTI-*Rickettsia parkeri* EM GATOS ABANDONADOS EM CAMPUS UNIVERSITÁRIO
DENTRO DE ÁREA ENDÊMICA DE FEBRE MACULOSA

CURITIBA

2019

JULIANA CRISTINA REBONATO MENDES

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia rickettsii* E ANTI-*Rickettsia parkeri* EM GATOS ABANDONADOS EM CAMPUS UNIVERSITÁRIO
DENTRO DE ÁREA ENDÊMICA DE FEBRE MACULOSA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Departamento de Biologia Celular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Alexander Welker Biondo
Coorientadora: Profa. Dra. Vivien Midori Morikawa

CURITIBA

2019

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Dulce Maria Bieniara – CRB/9-931)

Mendes, Juliana Cristina Rebonato

Detecção de anticorpos *anti-Rickettsia rickettsii* e *anti-Rickettsia parkeri* em gatos abandonados em Campus universitário dentro de área endêmica de Febre Maculosa. / Juliana Cristina Rebonato Mendes. – Curitiba, 2019.

97 p.: il.

Orientador: Alexander Welker Biondo

Coorientadora: Vivien Midori Morikawa

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

1. Rickettsiose do grupo da febre maculosa 2. Capivara 3. Carrapatos
4. Gatos I. Título II. Biondo, Alexander Welker III. Morikawa, Vivien Midori
IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular.

CDD (20. ed.) 574.234



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 dissertação de Mestrado de **JULIANA CRISTINA REBONATO MENDES** intitulada: **Deteção de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e anti-*Rickettsia parkeri* em gatos abandonados em Campus universitário dentro de área endêmica de Febre Maculosa**, 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 mestre 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, 27 de Fevereiro de 2019.

ALEXANDER WELKER BIONDO
Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

JOÃO HENRIQUE PEROTTA
Avaliador Externo (UFBA)

IVAN ROQUE DE BARROS FILHO
Avaliador Externo (UFPR)

Para minha mãe, sempre!

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Alexander Welker Biondo, primeiramente por ter me concedido a oportunidade de ingressar no mestrado. Pelos ensinamentos, preocupação e conselhos durante estes dois anos.

À minha coorientadora, Profa. Dra. Vivien Midori Morikawa, por seu apoio, ajuda e disponibilidade durante a execução deste trabalho.

Agradeço aos amigos Carina e Carlos que me incentivaram desde a época da graduação em realizar o mestrado, Louise por me ajudar e aconselhar durante toda essa trajetória, Patrícia e seu marido Oranys, Tugstênio, Joelma e Kátia pela parceria e ajuda. Sem vocês não seria possível!

Aos professores, funcionários e amigos do Programa de Biologia Celular e Molecular.

À Prefeitura do Campus da ESALQ/USP, na pessoa do prefeito Fernando Seixas pela oportunidade e disponibilização da realização do estudo dentro do campus.

À Dra. Aurea Maria de Oliveira Canavessi, e as colegas Amanda e Maysa pelo apoio e ajuda durante as coletas das amostras.

Ao pessoal do laboratório de Bromatologia, em especial a Jéssica, que ajudaram com a conservação das amostras.

Ao extinto grupo GCAA, nas pessoas de suas coordenadoras voluntárias Lívia e Graziela, que ajudaram com a captura e coleta de amostras dos animais.

Ao CCZ de Piracicaba e seus funcionários que gentilmente por cederam local para realização das coletas das amostras.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, por gentilmente ceder seu laboratório para processamento das amostras.

À profa. Camila e ao Igor que auxiliaram no desenvolvimento do estudo.

À minha família, em especial ao meu pai que sempre nos momentos difíceis me proporcionaram ajuda e consolo.

Aos animais que participaram desse projeto, pois mesmo contra a vontade cederam materiais biológicos para este estudo.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro.

E a todos que, de algum modo, contribuíram para a execução desse trabalho!

RESUMO

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias causadoras de doenças zoonóticas como a Febre Maculosa Brasileira (FMB). A manutenção deste gênero no meio ambiente depende, em sua maioria, de carrapatos Ixodidae do gênero *Amblyomma* que atuam como vetores reservatórios e da presença de amplificadores de rickettsias. As capivaras estão entre os principais hospedeiros silvestres dos carrapatos transmissores da Febre Maculosa. Mudanças no ambiente por fatores antropogênicos levam a diferentes interações entre a fauna silvestre e doméstica, bem como influenciam na emergência ou reemergência de doenças de caráter zoonótico. O Campus universitário da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) localizada em uma área periurbana da cidade de Piracicaba, estado de São Paulo, apresenta sua fauna silvestre composta também por capivaras e possui ambiente físico e biológico propício para o desenvolvimento de carrapatos, além de enfrentar problemas com uma superpopulação de gatos abandonados e mais 70 animais em um abrigo. O objetivo desse estudo foi avaliar o papel da população de gatos que habita o campus ESALQ-USP, área endêmica para FMB, no ciclo epidemiológico da doença. Foram testadas amostras de soro de 51 gatos por meio da Reação de Imunofluorescência (RIFI) para pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e anti-*Rickettsia parkeri*. Destes, 35 amostras foram provenientes dos gatos do abrigo e 16 dos gatos de vida livre. No geral, 23/35 (65,7%) dos gatos do abrigo e 5/16 (31,2%) dos gatos de vida livre foram sororreagentes a pelo menos uma das duas espécies de rickettsias testadas, demonstrando que os gatos de vida livre apresentaram 20% do risco calculado para os gatos do abrigo para a infecção, a qual está associada com a idade dos animais. Gatos com menos de 12 meses de idade apresentaram 4,3 vezes mais chances de serem positivos que animais mais velhos. Em apenas um gato de vida livre foi possível determinar *R. rickettsii* como o provável agente que causou a infecção. Carrapatos estavam presentes em 1/5 (20%) dos gatos de vida livre soropositivos, porém não houve associação entre presença de carrapatos e soropositividade. Neste estudo concluiu-se que os gatos podem atuar como hospedeiros sentinelas para *R. rickettsii*, pois apresentam anticorpos contra *Rickettsia* sp, porém não se apresentam como eficientes hospedeiros amplificadores secundários para FMB e apresentam baixo parasitismo por carrapatos ixodídeos. Devido a possibilidade destes transportarem formas imaturas de carrapatos infectados por *Rickettsia* sp para ambientes com alta atividade antrópica, sugere-se um aumento do risco de infecção rickettsial em humanos.

Palavras chave: Rickettsiose. Capivaras. Carrapatos. Gatos ferais. RIFI.

ABSTRACT

Bacterium from genus *Rickettsia* cause zoonotic diseases as the Brazilian Spotted Fever (BSF). The maintenance of these organisms in the environment depends on the ability of Ixodidae ticks from the genus *Amblyomma* act as reservoir vectors, besides the presence of rickettsial amplifiers. Capybaras are the main wildlife reservoir of these arthropods. The University Campus of Luiz de Queiroz College of Agriculture (ESALQ-USP), located in a peri-urban area of Piracicaba city, Brazilian state of São Paulo, has a wild fauna composed mainly by capybaras and provides physical and biological environment for the development of ticks. Moreover, it is dealing with an overpopulation of abandoned cats plus 70 rescued cats in a shelter inside it. This study aimed to evaluate the role of a cats' population that inhabits ESALQ-USP campus, BSF endemic-area, in the epidemiological cycle of the disease. A total of 51 cats sera were tested, 35 from the shelter cats and 16 from the free-living cats, through the Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) to verify the frequency of antibodies anti-*R. rickettsii* and anti-*R. parkeri*. Overall, 23/35 (65,7%) of the cats from the shelter and 5/16 (31.2%) of the free-living cats, were seroreagent to at least one of the two *Rickettsia* species tested demonstrating that free-living cats had 20% of the calculated risk for the captive cats to rickettsial infection, which is associated with age. Cats under 12 months old have 4,3 times more chances to be positive than older animals. In only one free-living cat was possible to determine *R. rickettsia* as the probable agent that caused the infection. Ticks were present in 1/5 (20%) of the seroreagent animals with no association between the presence of ticks in the animals and rickettsiae positive titers. This study showed that cats presented antibodies against *Rickettsia* sp acting as sentinels hosts for *R. rickettsii*. On the other hand, they are not efficient secondary amplifiers hosts for FMB presenting low parasitism by ixodideos ticks. However, the risk of human rickettsial infection should not be eliminated because of the possibility of these animals transport immature forms of ticks infected by *Rickettsia* sp into environments with high anthropogenic activity.

Keywords: Rickettsiose. Capybaras. Ticks. Feral cats. IFA.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ARMADILHA DE ARAME GALVANIZADO DO TIPO “LIVE-TRAP”	29
FIGURA 2 - EXEMPLO DE LOCAL COM AGLOMERAÇÃO DE ANIMAIS DENTRO DO CAMPUS ESALQ-USP	30
FIGURA 3 - TRANSPORTE DOS ANIMAIS.....	30
FIGURA 4 - COLETADOR DE PLÁSTICO PARA REMOÇÃO DE CARRAPATOS	31
FIGURA 5 - COLHEITA DE SANGUE VIA PUNÇÃO DA VEIA JUGULAR.....	32
FIGURA 6 - CARTÃO LEITOR PARA MICRO-HEMATÓCRITO.....	33
FIGURA 7 - QUEBRA DO TUBO CAPILAR.....	34
Figura 8 - PREENCHIMENTO DO REFRAÔMETRO POR CAPILARIDADE	34
FIGURA 9 - CARRAPATOS ENCONTRADOS EM ANIMAIS DE VIDA LIVRE	40
FIGURA 10 - LESÕES EM ANIMAIS DE VIDA LIVRE.....	43
FIGURA 11 - DISPOSIÇÃO DOS GATOS E CAPIVARAS CAMPUS ESALQ-USP	47

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - RELAÇÃO DE ESPÉCIES DE <i>Rickettsias</i> PERTENCENTES AO GFM	18
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia</i> sp E OS GRUPOS DE ANIMAIS (ABRIGO E VIDA LIVRE).....	37
TABELA 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia rickettsii</i> E OS GRUPOS DE ANIMAIS (ABRIGO E VIDA LIVRE).....	37
TABELA 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia parkeri</i> E OS GRUPOS DE ANIMAIS (ABRIGO E VIDA LIVRE).....	38
TABELA 4 - TÍTULOS APRESENTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLOURESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA ANTÍGENOS BRUTOS DE 2 ESPÉCIES DE <i>Rickettsia</i> EM AMOSTRAS DE SORO DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE.	38
TABELA 5 - CARGA PARASITÁRIA (PULGAS E CARRAPATOS) APRESENTADA PELOS GATOS DE VIDA LIVRE RELACIONADA À FREQUÊNCIA DE ANTÍGENOS PARA <i>Rickettsia</i> sp.....	39
TABELA 6 - RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE CARRAPATOS E FREQUÊNCIA DE ANTÍGENOS PARA <i>Rickettsia</i> sp NOS GATOS DE VIDA LIVRE.....	40
TABELA 7 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FATORES DE RISCO (IDADE, SEXO E ESTERILIZAÇÃO) COM A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia</i> sp DE TODOS OS ANIMAIS.....	41
TABELA 8 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FATORES DE RISCO (IDADE, SEXO E ESTERILIZAÇÃO) COM A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia</i> sp DOS GRUPOS (ABRIGO E VIDA LIVRE).....	42
TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS SINAIS CLÍNICOS/LESÕES OBSERVADOS NOS ANIMAIS (ABRIGO E VIDA LIVRE) E A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia</i> sp.....	43
TABELA 10 - RELAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia</i> sp COM AS MÉDIAS DE HEMATÓCRITO (%) E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS (G/DL) ENTRE OS GRUPOS (TODOS OS ANIMAIS, ABRIGO E VIDA LIVRE).	44
TABELA 11 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS VALORES DE HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS APRESENTADOS POR TODOS OS	

ANIMAIS E A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia</i> sp.	45
TABELA 12 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS VALORES DE HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS APRESENTADOS PELOS GRUPOS (ABRIGO E VIDA LIVRE) E A FREQUÊNCIA DE <i>Rickettsia</i> sp.....	46

LISTA DE SIGLAS

CCZ	- Centro de Controle de Zoonoses
CEUA	- Comitê de Ética de Utilização de Animais
CEUA/ESALQ	- Comissão de Ética no Uso de Animais de Agricultura “Luiz de Queiroz”
EDTA	- Ácido etileno diamino tetra cético
ELISA	- Ensaio Imunossorvente ligado à enzima
ESALQ-USP	- Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
FELV	- Vírus da leucemia felina
FHV-1	- <i>Herpesvírus tipo I</i>
FIV	- Vírus da imunodeficiência felina
FM	- Febre Maculosa
FMB	- Febre Maculosa Brasileira
GFM	- Grupo da Febre Maculosa
OmpA	- <i>Outer Membrane Protein</i> de 190kDa
OmpB	- <i>Outer Membrane Protein B</i> de 135 kDa
PBS	- Solução fosfato tamponada
PCR	- Reação em Cadeia da Polimerase
RIFI	- Reação de Imunofluorescência Indireta
TNR	- Método de captura, esterilização e retorno
UFPR	- Universidade Federal do Paraná
USP	- Universidade de São Paulo
VPS	- Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Preventiva

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	PATOGENIA	17
2.2	VETORES RESERVATÓRIOS E HOSPEDEIROS AMPLIFICADORES	19
2.3	ANIMAIS SENTINELAS PARA FMB	21
2.5	EPIDEMIOLOGIA	23
2.6	SUPERPOPULAÇÕES DE GATOS DE VIDA LIVRE	25
3	OBJETIVOS	27
3.1	OBJETIVO GERAL	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	28
4.1	LOCAL DO ESTUDO	28
4.2	DESENHO EXPERIMENTAL	29
4.3	DETERMINAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR (HEMATÓCRITO)	32
4.4	DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS	34
4.5	IDENTIFICAÇÃO DOS ECTOPARASITAS	35
4.6	PRODUÇÃO DAS LÂMINAS DE ANTÍGENOS	35
4.7	SOROLOGIA RICKETTSIAL	36
4.8	LOCAIS DE CAPTURA E RESGATE DOS GATOS	36
5	RESULTADOS	37
5.1	SOROLOGIA RICKETTSIAL	37
5.3	AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DOS ANIMAIS	39
5.4	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	40
5.5	HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS	43
5.6	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS GATOS E CAPIVARAS CAMPUS ESALQ-USP	47
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE 1 - VALORES DOS TÍTULOS RIFI PARA ANTÍGENOS DE <i>Rickettsia</i> sp, E PRESENÇA DE ECTOPARASITAS NOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE	62

APÊNDICE 2 - RELAÇÃO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (IDADE E SEXO) DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE.....	64
APÊNDICE 3 - RELAÇÃO DE SINAIS CLÍNICOS E LESÕES PRESENTES NOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE.	66
APÊNDICE 4 - VALORES DE HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE.	68
APÊNDICE 5 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA EM GRAUS DECIMAIS DOS LOCAIS ONDE OS GATOS DE VIDA LIVRE FORAM CAPTURADOS E OS GATOS DO ABRIGO FORAM RESGATADOS...	70
APÊNDICE 6 - MANUSCRITO EM INGLÊS.....	71
ANEXO 1 - CEUA ESALQ/USP.....	94
ANEXO 2 - CEUA UFPR.....	96

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 et al., 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 ambiente e entre seres humanos, animais e vetores (MCNEILL, 2010). O gênero *Rickettsia* compreende bactérias gram-negativas intracelulares obrigatórias, pleomórficas cocobacilares, causadoras de doenças zoonóticas em todos os continentes, dentre elas a Febre Maculosa Brasileira (FMB) (WALKER et al., 2006). Há nesse gênero um número crescente de espécies que variam desde características antigênicas e microbiológicas até distribuição, ecologia, patogenicidade e associação com hospedeiros artrópodes, tais como: piolhos, pulgas, carrapatos e ácaros (EREMEEVA et al., 2006). Incluem-se nesse gênero 27 espécies validadas, divididas em quatro grupos: (1) grupo da Febre Maculosa (GFM), (2) grupo do Tifo, (3) Grupo Ancestral (composto por *Rickettsia belii*) e (4) grupo de Transição (GILLESPIE et al. 2008; PAROLA et al., 2013; MERHEJ et al., 2014).

As rickettsias do GFM estão geralmente associadas aos carrapatos ixodídeos. A exceção ocorre com *R. felis*, transmitida por pulgas e *R. akari*, transmitida por ácaros (HACKSTADT, 1996; BENINATI et al., 2005).

A manutenção de *Rickettsias* causadoras da Febre Maculosa (FM) no meio ambiente depende, em sua maioria, da capacidade dos carrapatos Ixodidae do gênero *Amblyomma* operarem como vetores reservatórios e também da presença de amplificadores de rickettsias (PAROLA et. al, 2013).

Nas Américas Central e do Sul, a FM é transmitida aos seres humanos principalmente pelo carrapato *Amblyomma sculptum*. As capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), herbívoros de hábito semi-aquáticos, são os principais hospedeiros amplificadores silvestres destes carrapatos. Distribuem-se pelas Américas Central e do Sul desde o Panamá até o Uruguai e norte da Argentina, exceto no Chile (ALHO et al., 1987; LABRUNA et al., 2001; LABRUNA et al., 2002; WALKER et al., 2006; LABRUNA, 2009; FELIX, et al., 2011).

Os locais de preferência para o desenvolvimento dos carrapatos compreendem áreas que apresentam gramados e pastos com baixa incidência de raios solares, com vegetação alta e próximos a locais com água, tais como lagos e rios (LEMOS et al, 1997).

Dessa forma, não somente ambientes rurais, bem como ambientes urbanos tais como lagoas, margens de rios e parques públicos podem proporcionar a manutenção de populações de capivaras e conseqüentemente sua interação com vetores, que caso estejam infectados, tornam estes locais de risco para transmissão de FM aos seres humanos (SOUZA et al., 2004).

Mudanças no ambiente, principalmente as decorrentes de fatores antropogênicos levam a diferentes interações entre a fauna silvestre e doméstica, bem como influenciar na emergência ou reemergência de doenças de caráter zoonótico (RHYAN; SPRAKER, 2010).

O estado de São Paulo apresenta modificação de seus biomas por atividades antrópicas, que resulta em mosaico formado por remanescentes de floresta nativa além de áreas ocupadas pela agropecuária devido a fragmentação (GHELER-COSTA et al., 2002).

A ocorrência de capivaras, além de outras variáveis ambientais, tais como: áreas urbanas/peri-urbanas, ambientes com pastagens altas mal manejadas e presença do vetor são apontadas como fatores associados à confirmação de casos de FMB na bacia do rio Piracicaba localizada na região sudeste do estado de São Paulo (SOUZA et al., 2015).

No ambiente urbano, a exemplo dos campi universitários, gatos são constantemente abandonados, podendo manifestar comportamento feral (DOMBROSKY; WOLVERTON, 2014). Esses animais, bem como cães ferais, podem ser caracterizados pela mobilidade irrestrita e ausência de guarda responsável, apesar de aparente necessidade de auxílio humano para sustento (WHO/WSPA, 1990). Essa fauna doméstica que por abandono, escape e oferta de alimento podem habitar regiões onde há mosaicos de ecossistemas, e realizar a caça de animais silvestres e sinantrópicos (BOITANI; CIUCCI, 1995).

O Campus universitário “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) localizado no município de Piracicaba, estado de São Paulo, apresenta alta densidade demográfica de capivaras, as quais são consideradas amplificadores de *Rickettsia rickettsii* para *Amblyomma* spp (GHELER-COSTA et al., 2002; PEREZ

et al., 2008; SOUZA et al., 2009).

Atualmente há uma extensa população de gatos errantes, muitos destes com comportamento feral habitando áreas dentro do campus ESALQ-USP. Havia também um abrigo com 70 gatos mantido pela própria instituição destinado ao recolhimento e posterior doação de tais animais. Considerando a presença das capivaras, que são os principais hospedeiros amplificadores para bactérias do gênero *Rickettsia* no local de estudo e a circulação do agente etiológico caracterizando-o como área endêmica para FMB, o presente estudo pretende avaliar o papel da população de gatos no ciclo epidemiológico da doença.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PATOGENIA

As rickettsias são transmitidas aos vertebrados por meio de secreções salivares e mantidas em carrapatos por transmissão transovariana, transtadial e/ou aquisição horizontal após ingestão de sangue infectado (BENINATI et al., 2005).

Os seres humanos são contaminados pela picada do carrapato infectado que deve permanecer se alimentando por um período mínimo de 4 a 6 horas para que ocorra a ativação da *R. rickettsii* de um estado avirulento (inativo) para um estado altamente patogênico (DANTAS-TORRES, 2007).

O GFM inclui aproximadamente 18 espécies diferentes (MERHEJ et al., 2014). Destas, 10 são reconhecidas como patogênicas, 6 não estão relacionadas a rickettsiose em seres humanos e 2 são classificadas como potenciais patógenos aos seres humanos (quadro 1). Das espécies patogênicas aos seres humanos, destacam-se *R. rickettsii* como a espécie de maior patogenicidade e *R. parkeri* devido a possibilidade desta espécie estar relacionada a casos de FMB em áreas endêmicas do estado de São Paulo (PAROLA et al., 2005; HORTA et al., 2007).

QUADRO 1 - RELAÇÃO DE ESPÉCIES DE *Rickettsias* PERTENCENTES AO GFM

Espécies Patogênicas	Espécies não ligadas a rickettsiose em seres humanos	Potenciais patógenos aos seres humanos
<i>R. rickettsii</i>	<i>R. slovaca</i>	<i>R. montanensis</i>
<i>R. conorii</i>	<i>R. massiliae</i>	<i>Candidatus Rickettsia amblyommii</i>
<i>R. africae</i>	<i>R. rhipicephali</i>	
<i>R. australis</i>	<i>R. helvetica</i>	
<i>R. akari</i>	<i>R. peacockii</i>	
<i>R. japonica</i>	<i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Ixodes scapularis</i>	
<i>R. felis</i>		
<i>R. parkeri</i>		
<i>R. heilongjiangensis</i>		
<i>R. philipii</i>		

Fonte: (RAOULT; ROUX, 1997; MERHEJ et al., 2014).

Por serem parasitas intracelulares obrigatórios, as rickettsias podem ser encontradas tanto no interior do núcleo, quanto livres no citosol. Apresentam o genoma constituído por um cromossomo circular único altamente conservado e o seu processo de multiplicação se dá por divisão binária (SILVA et al., 2009). Dessa forma, essas bactérias infectam predominantemente as células endoteliais vasculares, porém não produzem toxinas significantes (McADAM; SHARPE, 2005).

Nos seres humanos, a doença inicia-se com febre e cefaleia estando associada a sintomas inespecíficos que incluem mal-estar, mialgias, náuseas, vômitos, anorexia e diarreia. A natureza progressiva da infecção evidencia-se nitidamente com erupções na pele (RAOULT, 2005; WALKER et al., 2006).

Entretanto, a ausência dessas erupções interfere no diagnóstico diferencial, pois a FM causada por *R. rickettsii* pode apresentar sintomatologia compatível com outras infecções como leptospirose, meningococemia, infecção por enterovírus, entre outras doenças infecciosas (MELLES et al., 1999).

A FM causada por *R. parkeri* é caracterizada por não apresentar um curso grave em seres humanos. Diferencia-se clinicamente da FM causada por *R. rickettsii* por apresentar no sítio de fixação do carrapato, uma lesão papular típica (“*tache noir*”), além de linfadenopatia (PADDOCK et al., 2004).

As capivaras parecem ser refratárias à FM (SOUZA et al., 2009). Dentre os animais domésticos Ueno (2014) observou em seu estudo que os equinos infectados por *R. rickettsii* apesar de efetuarem soroconversão, não apresentam

alterações clínicas.

Por outro lado, os cães assim como os seres humanos são susceptíveis a *R. rickettsii*, apresentando quadros febris agudos inespecíficos além de trombocitopenia e anemia (PIRANDA et al., 2008). Outros sinais clínicos nestes animais incluem desidratação anorexia, letargia, depressão, petéquias, equimoses cutâneas, tosse e aumento dos sons broncovesiculares. As alterações bioquímicas incluem hipoproteinemia, hipoalbuminemia, hipocalcemia e aumento das enzimas hepáticas (GREENE; BREITSCHWERDT, 2006).

Dessa forma, sabe-se apenas que os gatos podem apresentar anticorpos séricos reagentes a *R. rickettsii* e podem ser potenciais hospedeiros para *R. felis*. Porém sua patogenicidade nesta espécie é pouco compreendida, pois gatos infectados experimentalmente por *R. felis* permaneceram assintomáticos, mas apresentaram soroconversão entre 2 e 4 meses (GREENE et al., 2015; STOKES, 2016).

2.2 VETORES RESERVATÓRIOS E HOSPEDEIROS AMPLIFICADORES

Na natureza, diversos carrapatos da família Ixodidae dos gêneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* e *Amblyomma* atuam como vetores reservatórios para *R. rickettsii* de acordo com a área geográfica (BURGDORFER, 1988; LABRUNA, 2009).

Na América do Sul, *A. sculptum* é o principal carrapato vetor para *R. rickettsii*, porém, *A. aureolatum* também é reconhecido como vetor para essa bactéria na região metropolitana da cidade de São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006).

A espécie *A. dubitatum* é apontada como um potencial vetor para *R. parkeri* em regiões endêmicas de FMB no Estado de São Paulo, porém, infecções experimentais desta bactéria em *A. sculptum* também foram realizadas com sucesso (HORTA et al., 2007).

No estado de São Paulo, o ciclo de vida anual de *A. sculptum* ocorre com maior atividade das larvas nos meses de abril a julho, as ninfas são encontradas com um maior pico entre junho e outubro e as formas adultas apresentam maior ocorrência de outubro a março (LABRUNA et al., 2002).

A manutenção enzoótica de *R. rickettsii* em carrapatos na natureza apenas por transmissões transováricas e transestadiais não é eficiente devido a patogenicidade e a redução da fertilidade que esta bactéria também apresenta aos mesmos após sucessivas transmissões transovarianas. As rickettsias não patogênicas também podem limitar as taxas de infecção da *R. rickettsii* nos carrapatos por meio de um mecanismo de competição (*rickettsial "interference"*) (SILVA et al., 2009).

Assim, faz-se necessária a participação de hospedeiros amplificadores vertebrados. Esses, após serem infectados desenvolvem rickettsemia por determinado período, permitindo a infecção de novos carrapatos não infectados e iniciam novas linhagens de carrapatos infectados dentro de uma população de carrapatos (NIEBYLSKI et al., 1999; DUMLER; WALKER, 2005; SILVA et al., 2009).

Como as infecções agudas por *R. rickettsii* nos hospedeiros vertebrados persistem por apenas alguns dias ou semanas sem a persistência do agente, estes não podem ser considerados como reservatórios para rickettsias na natureza (BURGDORFER, 1988).

Dessa forma, para determinar se uma espécie de vertebrado pode ser considerada como um eficiente hospedeiro amplificador para *R. rickettsii*, esta deve: (1) ser abundante na área endêmica, (2) ser susceptível à infecção, (3) apresentar alta taxa de renovação populacional, (4) manter a bactéria circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar vetores e (5) ser bom hospedeiro do carrapato vetor (LABRUNA, 2009).

Dentre os hospedeiros primários da fase adulta de *A. sculptum* encontram-se os eqüinos, as antas e capivaras (LABRUNA, 2009). Porém, seus estádios imaturos (larva e ninfa) apresentam baixa especificidade de hospedeiros, se alimentando em diversas espécies, incluindo os cães e os seres humanos entre outras (SANGIONI et al., 2005).

Na região Sudeste do Brasil, Labruna (2009) cita que os hospedeiros primários mais abundantes para *A. sculptum* são os cavalos e as capivaras, os quais albergam todas as fases parasitárias deste carrapato.

Em uma área que apresenta uma população de carrapatos estabelecida, pelo menos uma das três espécies de hospedeiros primários (equinos, antas e capivaras) deve estar presente. Assim, quando esta população de artrópodes

aumenta, maior é a possibilidade de parasitar outras espécies, chamadas de hospedeiros secundários (LABRUNA et al., 2001).

Devido aos carrapatos ixodídeos não serem capazes de se locomoverem a grandes distâncias, principalmente as formas imaturas que se limitam a deslocamentos de poucos centímetros a partir do local de onde emergiram, este se torna outro fator que reforça a participação de hospedeiros vertebrados para a disseminação e adaptação destas espécies (PEREZ et al., 2008).

Dentre os animais domésticos, os cães são conhecidos como importantes hospedeiros secundários amplificadores da doença, pois são susceptíveis a infecções por *R. rickettsii* e aumentam o risco da infecção em seres humanos por residirem no mesmo ambiente e pelo contato com carrapatos infectados (PIRANDA et al., 2008). Apesar dos equinos serem hospedeiros primários para carrapatos *A. sculptum*, estes não se comportam como hospedeiros amplificadores para *R. rickettsii*, uma vez que não desenvolvem rickettsemia detectável e não são capazes de infectar novos carrapatos (UENO, 2014).

Por outro lado, as capivaras mesmo sendo refratárias à FM por *R. rickettsii*, são consideradas como hospedeiros amplificadores para este patógeno pois sofrem infecção rickettsial e são capazes de infectar carrapatos (LABRUNA, 2009; SOUZA et al., 2009).

2.3 ANIMAIS SENTINELAS PARA FMB

O sistema sentinela para detecção de doenças é baseado no monitoramento de uma população alvo que apresente sinais específicos que são utilizados como alerta precoce (BRASIL, 2009).

Devido as variações em relação às espécies acometidas, bem como o clima e ambientes favoráveis à cada doença, não é possível determinar características padrões para estes animais. Assim, estes devem ser capazes de desenvolver uma resposta adequada e detectável para determinado patógeno (MCCLUSKEY, 2003).

De acordo com Souza (2011) os animais sentinelas para FMB devem ser bons hospedeiros para os vetores do agente, possuir mobilidade na área de estudo e serem sensíveis a infecção rickettsial. Dentre os animais que apresentam características esperadas como animais sentinelas para FMB,

destacam-se os cães que possuem maior chance e resposta para a infecção por *R. rickettsii* (SCORPIO et al., 2008). Os equinos também são bons sentinelas para a detecção da circulação de rickettsias em determinada região, bem como as capivaras (HORTA et al., 2007; LABRUNA, 2009).

Dessa forma, a obtenção do soro de animais domésticos como cães e equinos para estudos soropidemiológicos para FMB em áreas rurais apresenta vantagem devido a maior facilidade para contenção destes animais para colheita de sangue em relação aos animais silvestres, também considerados sentinelas como as capivaras (SOUZA, 2011; UENO, 2014).

Horta e colaboradores (2007) sugerem que os gatos podem ser utilizados como animais sentinelas para *R. rickettsii* e *R. parkeri* em 4 áreas endêmicas e 1 área não-endêmica de FMB do Estado de São Paulo devido a maior soropositividade apresentada para essas duas espécies de rickettsias do que qualquer outro hospedeiro doméstico (cavalos e cães).

2.4 DIAGNÓSTICO

Na prática clínica, bem como para a realização de inquérito sorológico em hospedeiros sentinelas de uma determinada região, as infecções rickettsiais são confirmadas por métodos de estimativa dos níveis séricos de anticorpos anti-rickettsias no soro. Para as diferentes espécies de hospedeiros mamíferos, a especificidade da resposta imune contra as rickettsias difere, pois hospedeiros bem adaptados (a exemplo dos camundongos) desenvolvem títulos de anticorpos altamente específicos contra cada espécie rickettsial (McADAM; SHARPE, 2005; SAITO et al., 2008; GREENE et al., 2015).

Em seres humanos, assim como nos cães, o diagnóstico é baseado na confirmação laboratorial por métodos diretos e/ou indiretos, aliada principalmente aos sinais clínicos, aos antecedentes epidemiológicos da região e ao histórico de exposição aos carrapatos (GASSER et al., 2001; LEMOS; MELLO, 2010). No geral, a confirmação da infecção ativa por *R. rickettsii* é realizada com o aumento no título de IgM ou o aumento de quatro vezes no título de IgG (GREENE et al., 2015). Porém, quando um título único for maior que 1:1.024, este também pode ser indicativo de infecção rickettsial (GASSER et al., 2001).

Foram desenvolvidos vários testes sorológicos para detecção de anticorpos contra rickettsias do GFM, como a fixação do complemento, a imunofluorescência microscópica, microaglutinação, o ensaio imunossorvente ligado a enzima (ELISA) dentre outros (GREENE et al., 2015). Porém, as técnicas de imunofluorescência indireta comparativas, são consideradas como referência para identificação de rickettsias. As proteínas de superfície de massa molecular elevada, OmpA (*outer membrane protein* de 190kDa) e OmpB (*outer membrane protein B* de 135 kDa), fornecem a base para a sorotipagem rickettsial (RAOULT; ROUX, 1997; SILVA et al., 2009).

A espécie *R. rickettsii* possui essas duas proteínas principais imunodominantes OmpA e OmpB expostas em sua superfície. As demais espécies de rickettsias presentes no GFM apresentam apenas o antígeno OmpA, pois tratam-se de epítopes conformacionais específicos para cada espécie (BOUYER et al., 2001; WALKER et al., 2006).

Embora o método sorológico de diagnóstico para FM seja a Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), com 84,6 a 100% de sensibilidade e 99,8 a 100% de especificidade, esse não é capaz de identificar qual a espécie de *Rickettsia* está envolvida na infecção devido a reação sorológica cruzada que as rickettsias do GFM apresentam (PHILIP et al. 1978, BROUQUI et al. 2004).

Dessa forma, para submeter uma amostra de soro a uma bateria de testes sorológicos com variados antígenos de *Rickettsia* spp e indicar qual espécie rickettsial estimulou a resposta imune, um título final de anticorpos contra determinada espécie de *Rickettsia* deve ser pelo menos quatro vezes maior que o observado para qualquer outra espécie testada, considerando-se este soro homólogo à esta espécie ou de um genótipo estreitamente relacionado (LABRUNA et al., 2007; PINTER et al., 2008).

2.5 EPIDEMIOLOGIA

A FMB foi descrita pela primeira vez no Brasil nos anos 1920, tendo um aumento de casos relatados até os anos de 1940. No final dos anos de 1980 até o início do século XXI houve claramente a reemergência desta doença no país (LABRUNA, 2009).

Oliveira et al. (2016) citam que entre os anos de 2007 e 2015 houve um

aumento do número de casos suspeitos de FMB, porém o número de casos confirmados apresentou baixa variação.

De acordo com Lemos e Mello (2010), as centenas de casos confirmados e suspeitos de FM no Brasil distribuem-se nos estados da região Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo) onde altas taxas de casos fatais foram registradas.

Embora a dispersão do vetor reservatório, *Amblyomma sculptum* seja amplamente descrita no território nacional, as regiões Sul e Sudeste apresentaram as maiores taxas de incidência, onde a maioria dos casos reportados foram nos estados de São Paulo e Santa Catarina (LEMOS; MELLO, 2010; OLIVEIRA et al., 2016).

No Estado de São Paulo, no período de 2007 a 2017, foram registrados 636 casos confirmados autóctones de FMB. Somente no município de Piracicaba, nesse período foram registrados 54 casos (8,49%) (CVE, 2017).

A reemergência da FMB no estado de São Paulo durante as últimas décadas se deu, devido a grandes modificações ambientais que contribuíram para o estabelecimento das capivaras, pois trata-se de uma espécie prolífera e principalmente susceptível a infecção por *R. rickettsii*, apresentando rickettsemia capaz de infectar carrapatos ixodídeos (LABRUNA, 2009).

Da mesma forma, o aumento da população de capivaras dentro das dependências do Campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) foi provavelmente ocasionado por atividades antrópicas ao longo dos anos. Atualmente, observa-se que nos locais de permanência e trânsito desses animais há maiores populações de carrapatos, principalmente da espécie *Amblyomma sculptum*. Dessa forma, o Campus “Luiz de Queiroz” enfrenta um problema relevante de Saúde Única para a comunidade por estar situado em área de transmissão para FMB (PLANO DE AÇÃO, 2016).

Em 2002 uma criança morreu acometida por FMB após ser picada por carrapato dentro do campus ESALQ-USP. Em 2015 o Ministério Público iniciou uma investigação no campus para determinar os riscos para a exposição da população à FMB (USP ESALQ, 2015). Em 2003 foi realizado um levantamento que apontou o número de cães e gatos domésticos presentes no campus contabilizando 42 e 81 indivíduos, respectivamente (CAMPOS, 2004). Atualmente, após observações não sistematizadas o número de gatos aparenta

ter triplicado.

Horta e colaboradores (2007) ao realizaram testes sorológicos em seres humanos, gatos e outras espécies animais oriundos de áreas endêmicas e não-endêmicas de FM no estado de São Paulo, incluindo a cidade de Piracicaba, verificaram que apenas *R. rickettsii* e *R. parkeri* foram reconhecidos como agentes causais de rickettsiose nestas áreas.

Em um estudo para avaliar espécies da mastofauna e avifauna quanto à infestação por carrapatos no Campus universitário “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) verificou-se que a maioria dos gatos capturados estavam parasitados por ninfas de *Amblyomma* spp (PEREZ et al., 2008).

2.6 SUPERPOPULAÇÕES DE GATOS DE VIDA LIVRE

A relação entre os seres humanos e os animais ainda gera polêmica em termos de Saúde Única, pois apesar deste convívio gerar benefícios, os animais podem se apresentar como uma importante fonte de infecção e transmissão de doenças de caráter zoonótico (WONG et al., 1999; MORRISON, 2001; DELTA SOCIETY, 2004).

A domesticação dos gatos (*Felis catus*) é datada em aproximadamente 8.000 anos (VIGNE et al., 2004). Atualmente, o número de gatos adotados é equivalente ao número de abandono destes animais. Isso se deve a fatores como falta de orientação e/ou compreensão quanto aos comportamentos inerentes à espécie e a guarda irresponsável (SILVANO et al., 2010).

Farnworth et al. (2011) citam que de acordo com o local e o comportamento manifestados pelos gatos, estes podem ser agrupados em 3 categorias: (1) gatos domésticos, (2) gatos errantes e (3) gatos ferais.

Os gatos errantes são encontrados perambulando em locais urbanos ou rurais, e mesmo não sendo de propriedade dos seres humanos, dependem de recursos fornecidos pelos mesmos. Diferentemente destes, os gatos ferais vivem e se reproduzem em estado selvagem não tendo suas necessidades intencionalmente satisfeitas pelos seres humanos (FARNWORTH et al., 2011).

Tennent e Downs (2008) afirmam que gatos de vida livre que habitam ambientes urbanos tendem a formar seus centros de atividades ao redor de locais onde os alimentos são disponibilizados.

O contínuo abandono de gatos em ambiente urbano aliado à alta fecundidade destes animais e ao amplo acesso a recursos vitais como comida, água e abrigo possibilitam que populações de gatos de vida livre (errantes e/ou ferais) atinjam densidades de 1.000 a 2.500 gatos/km² (GUNTHER; TERKEL, 2002).

Dessa forma, acredita-se que populações de gatos ferais se desenvolvam em campi universitários a partir do abandono ou por animais oriundos da vizinhança ou dos próprios estudantes que se perdem no local. Assim, essa população passa a ser constituída por gatos que nascem selvagens de animais domésticos não esterilizados (HUGHES; SLATER, 2010).

A alta densidade de gatos de vida livre em ambientes urbanos, além de prejudicar o próprio bem-estar destes animais pela falta de dieta adequada e cuidados médico-veterinários, também causam incômodo público devido ao seu comportamento reprodutivo que inclui vocalização alta e produção filhotes (BRONSON, 1981; MACDONALD, 1983; GUNTHER; TERKEL, 2002).

A presença de populações de gatos ferais em ambientes naturais causam um grande impacto na fauna nativa do local devido a predação de aves, insetos e pequenos animais como répteis e mamíferos, transformando-os em ameaça ao ecossistema no qual foram introduzidos (DICKMAN, 1996; FERREIRA et al., 2014).

Dessa forma, o controle da superpopulação de gatos de vida livre, em ambientes urbanos, rurais e naturais torna-se uma necessidade como medida para a resolução de tais problemas (GUNTHER et al., 2011). Atualmente, o controle da população de gatos ferais por meio do método de captura, esterilização e retorno (TNR), é o mais aceito em relação à eutanásia (SLATER, 2004).

Wallace e Levy (2006) citam que os programas de TNR devem maximizar o número de animais esterilizados quando a expectativa é a redução da população.

Porém, populações de gatos que vivem em áreas urbanas contíguas, variam muito em relação àquelas que habitam áreas isoladas. Assim, espera-se que uma população de gatos urbana apresente uma maior taxa de reposição (*turnover*) devido às maiores taxas de imigração e emigração, além da maior densidade populacional (MIRMOVITCH, 1995; NATOLI, et al., 2006). Garcia et

al. (2018) observaram que essas taxas diminuem após uma intervenção para controle de natalidade.

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2009), fauna sinantrópica é composta por populações de espécies animais silvestres ou exóticas que utilizam recursos de áreas antrópicas de forma transitória ou permanente. Esta fauna é classificada como nociva quando interage de forma negativa com a população humana, seja por causar transtornos econômicos ou ambientais significativos ou por representar riscos à saúde pública.

Dessa forma, o descontrolado crescimento da população de gatos de vida livre em ambientes urbanos acarreta em preocupações principalmente para órgãos governamentais responsáveis pela Saúde Pública devido a uma reduzida fração desta população estar vacinado e/ou sob a tutela de um responsável (ROCHLITZ, 2005).

Esses animais podem atuar como potenciais transmissores de zoonoses, tais como toxoplasmose e a raiva entre outras, além de transmitir patógenos felinos como os causadores das retrovirose FIV (vírus da imunodeficiência felina) e FELV (vírus da leucemia felina) entre outros, quando presentes em ambientes natural, urbano ou rural (DICKMAN, 1996; TAN, 1997; GENARO, 2010).

Assim, determinar o impacto causado no ambiente pela presença de gatos ferais é de extrema relevância, uma vez que é de reconhecimento mundial que estes animais constituem uma questão importante e controversa tanto para a Saúde Única quanto para o meio ambiente (WALLACE; LEVY, 2006).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel da população de gatos que habita o campus da Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP), área endêmica para FMB, no ciclo epidemiológico da doença.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Detectar anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* e anti-*Rickettsia parkeri* nos gatos residentes na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP) através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).
- Identificação taxonômica dos carrapatos presentes nos gatos residentes na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ-USP).
- Levantar os dados epidemiológicos dos gatos do abrigo e de vida.
- Verificar possíveis alterações em exames de sangue (hematócrito e proteínas plasmáticas totais) em amostras de sangue total colhidas dos gatos do abrigo e de vida livre.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO ESTUDO

O estudo foi realizado na Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ- USP) - 22°42'37.8"S 7°37'58.6"W, localizada em uma área periurbana da cidade de Piracicaba, estado de São Paulo, com extensão de 3.825,4 hectares. Apesar de o campus estar localizado no limite da área urbana de Piracicaba, este possui remanescentes florestais e diversas ocupações antrópicas, formando um mosaico de diferentes usos do solo, divididos em: instalações e áreas de paisagismo (16,92%), cultura anual (13,54%), floresta nativa remanescente (13,51%), áreas ociosas (13,32%), pastagem intensiva (12,96%) e florestas em restauração (10,7%) (PLANO DIRETOR, 2013-2015).

O Campus está inserido dentro do bioma Mata Atlântica de acordo com as áreas biogeográficas de Silva e Casteleti (2003). A área disponível para os animais silvestres dentro do campus ESALQ-USP é de aproximadamente 297 ha. As Áreas de Preservação Permanente ou de Reserva Legal são margeadas por uma cerca com a finalidade de restringir a área de acesso das capivaras e carrapatos ixodídeos das áreas destinadas à exploração agrícola, zootécnica, florestal e locais de visitação humana (PLANO DE AÇÃO, 2016).

Os grupos de capivaras eram avistados principalmente na Fazenda

Areão, lagoa de captação junto ao rio Piracicaba, suinocultura, açude do aeroporto, lago da Entomologia e às margens do ribeirão Piracicamirim (ALMEIDA et al., 2005). Atualmente, estima-se que a população de capivaras no campus atinja cerca de 300 animais. Estes se encontram distribuídos em 12 grupos, 10 localizados à margem esquerda do rio Piracicaba e dois na Fazenda Areão (área de 130 ha anexa ao campus ESALQ-USP) e são compostos por um número de indivíduos que varia de 8 a 50 animais de diferentes idades (PLANO DE AÇÃO, 2016).

4.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais de Agricultura “Luiz de Queiroz” (CEUA/ESALQ) (ANEXO 1) e pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Paraná (UFPR) sob parecer número 103/2017 (ANEXO 2).

As armadilhas de arame galvanizado do tipo “*live-trap*” (figura 1) para captura dos gatos de vida livre que apresentaram comportamento feral foram colocadas 2 vezes por semana nos mês de julho, primeira semana de agosto e segunda semana de outubro de 2017. Foram incluídos no estudo os animais que entraram nas armadilhas durante esse período.

Estas foram dispostas nos locais onde havia aglomeração de animais (figura 2) e que fossem logisticamente viáveis devido a dificuldade, tanto para a captura quanto para o transporte (figura 3) e vigilância das armadilhas.

FIGURA 1 - ARMADILHA DE ARAME GALVANIZADO DO TIPO “*LIVE-TRAP*”



Fonte: A autora.

FIGURA 2 - EXEMPLO DE LOCAL COM AGLOMERAÇÃO DE ANIMAIS DENTRO DO CAMPUS ESALQ-USP



Animais dispostos em locais com alta atividade antrópica.
FONTE: A autora.

FIGURA 3 - TRANSPORTE DOS ANIMAIS



Limitação física para disposição das armadilhas dentro dos automóveis para transporte dos gatos de vida livre capturados dentro do campus.
FONTE: A autora.

A coleta de amostras de sangue dos gatos do abrigo ocorreu na última semana do mês de julho de 2017. Dos 70 animais presentes no abrigo foram coletadas amostras de 35 gatos, os quais permitiram a contenção física.

Desta forma, foram coletadas amostras de soro de 51 gatos, 35 gatos do abrigo e 16 gatos de vida livre.

A colheita de sangue e ectoparasitas dos gatos ferais foram realizadas no momento do pós-operatório à esterilização destes animais, realizada no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Piracicaba/SP. Por outro lado, os gatos de vida livre que apresentaram comportamento dócil, bem como os gatos

mantidos no abrigo foram contidos fisicamente para coleta das amostras de sangue e ectoparasitas.

Também foram levantados os dados epidemiológicos dos animais mantidos no abrigo, tais como: idade, sexo, esterilização, se nascido em cativeiro e local onde o animal foi resgatado, manifestação de sinais clínicos e presença de lesões para correlação entre o fator de risco e a infecção.

Os carrapatos presentes nos animais foram coletados utilizando coletadores de plástico (O'tom/Tick Twister®) (figura 4), e acondicionados em tubos contendo álcool anidro.

FIGURA 4 - COLETADOR DE PLÁSTICO PARA REMOÇÃO DE CARRAPATOS



Coletador é posicionado de modo a permitir sua rotação sem causar danos ao aparelho bucal do artrópode.

FONTE: A autora.

Foram colhidos aproximadamente 5 mL de sangue/animal, via punção da veia jugular (figura 5). Destes, 3 mL foram acondicionados em tubos de vácuo estéril contendo ativador de coágulo para obtenção do soro e 2 mL de sangue total foram acondicionados em tubos contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra cético).

FIGURA 5 - COLHEITA DE SANGUE VIA PUNÇÃO DA VEIA JUGULAR



Procedimento realizado em animal de vida livre no Centro de Controle de Zoonoses (CCZ) da cidade de Piracicaba/SP.

FONTE: A autora.

Com o sangue total foram determinados volume globular (hematócrito) e concentração de proteínas plasmáticas totais. O soro obtido após centrifugação das amostras a 1500 rpm durante 5 minutos foi aliquoteado e armazenado a -80°C.

A sorologia rickettsial foi realizada por meio da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Preventiva (VPS) - Universidade de São Paulo (USP).

Os dados epidemiológicos dos animais (vida livre e do abrigo), tais como idade, sexo, esterilização, presença de ectoparasitas, presença de lesões e/ou sinais clínicos, bem como os valores do hematócrito e proteínas plasmáticas totais foram correlacionados com os resultados do teste de RIFI. Também foram levantadas as coordenadas geográficas dos locais onde os animais foram capturados ou resgatados. A análise estatística foi realizada através do software EpiInfo, versão 3.5.2 (Centro de Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, EUA).

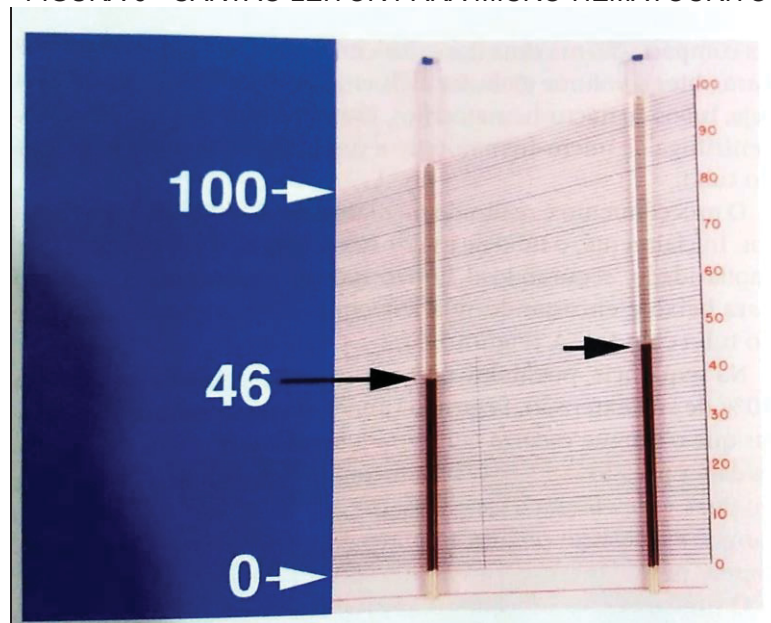
4.3 DETERMINAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR (HEMATÓCRITO)

Conforme descrito por Weiser (2017), o procedimento para a determinação do volume globular foi realizado por meio do preenchimento de 70

a 90% da extensão do tubo capilar para micro-hematócrito com heparina (75x1,5mm) por capilaridade (segurando-se o tubo na posição horizontal ou levemente inclinado para baixo e encostando a extremidade superior no sangue do tubo com EDTA). Para selar uma das extremidades do tubo, este foi segurado na horizontal de modo a evitar que o sangue escorresse para fora e a extremidade oposta foi queimada. O tubo foi colocado na centrífuga de micro-hematócrito a 1.200rpm (aproximadamente 1580G) por 5 minutos. Assim formam-se 3 camadas distintas no tubo após a sua remoção da centrífuga: (1) a coluna de plasma no topo, (2) os eritrócitos compactados na base e (3) uma pequena banda branca ao meio, a capa flogística constituída predominantemente por leucócitos.

O volume globular foi mensurado através do cartão leitor para micro-hematócrito (figura 6), posicionando-se a base da coluna de eritrócitos na linha 0 e o topo da coluna de plasma na linha 100. A leitura é realizada na escala correspondente à posição do topo da coluna de eritrócitos, obtendo-se o valor do volume globular (WEISER, 2017).

FIGURA 6 - CARTÃO LEITOR PARA MICRO-HEMATÓCRITO



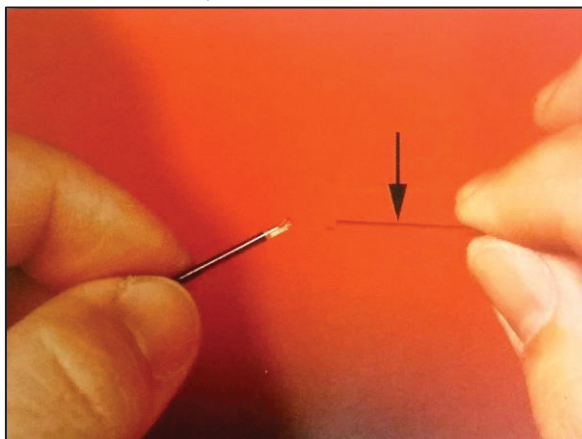
Setas brancas: escala do cartão leitor a partir da base 0 e do topo 100.
Setas pretas: leitura da escala em relação à posição da coluna de eritrócitos.
FONTE: Weiser (2017).

Para o hematócrito foram utilizados os valores de referência para os felinos, entre 24 e 45% descritos por Lopes et al. (2007).

4.4 DETERMINAÇÃO DE PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS

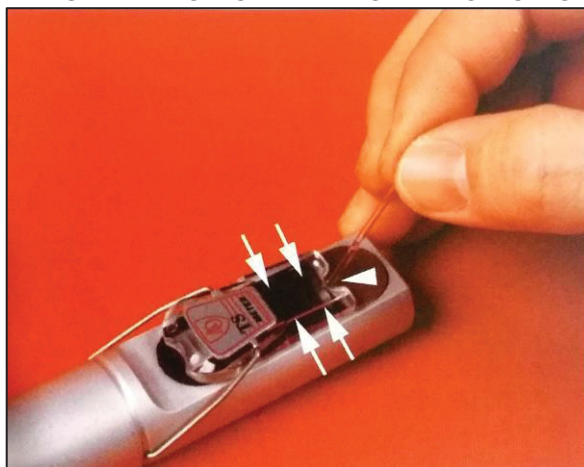
Após realização do hematócrito, a concentração de proteínas plasmáticas foi mensurada quebrando-se o tubo capilar, como demonstrado na figura 7, no nível da capa flogística. O refratômetro foi preenchido através do estabelecimento de capilaridade encostando-se a extremidade do tubo com plasma no entalhe da tampa do prisma. O fluxo estabeleceu uma fina camada de plasma sob a tampa plástica do refratômetro (figura 8). O aparelho foi empunhado de maneira que uma fonte de luz ambiente passasse através do prisma embebido com o plasma permitindo a leitura do grau de refração da luz em uma escala visível por meio da ocular (WEISER, 2017).

FIGURA 7 - QUEBRA DO TUBO CAPILAR



O tubo é quebrado acima da capa flogística para acessar a coluna de plasma.
Seta preta: parte do tubo contendo a coluna de plasma.
FONTE: Weiser (2017).

Figura 8 - PREENCHIMENTO DO REFRAÔMETRO POR CAPILARIDADE



Ponta seta: entalhe da tampa do prisma.
Setas: área de deposição da fina camada de plasma.
FONTE: Weiser (2017).

Os valores considerados dentro dos limites normais para proteínas plasmáticas totais nos felinos variam de 6,0 a 8,0 g/dL (LOPES et al., 2007).

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS ECTOPARASITAS

Os carrapatos foram identificados taxonomicamente de acordo com a morfologia da espécie e classificados de acordo com seu estágio de desenvolvimento em larvas, ninfas e adultos segundo Barros-Battesti et al. (2006) e Martins et al. (2010).

4.6 PRODUÇÃO DAS LÂMINAS DE ANTÍGENOS

Foram produzidas lâminas de antígenos específicos de *R. rickettsii* e *R. parkeri* no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária e Saúde Preventiva (VPS) - Universidade de São Paulo (USP).

De acordo com a metodologia descrita por Horta (2006), no fluxo laminar, as lâminas foram previamente incubadas em acetona por 10 minutos e após secagem, estas foram limpas com álcool etílico absoluto. Após nova secagem foi colocada solução de poli-L-lisina com ajuda de uma haste flexível em cada poço da lâmina. Depois, as lâminas foram deixadas para secar novamente à temperatura ambiente, preparando-as para receber o antígeno.

O antígeno foi sintetizado a partir de *Rickettsia* spp infectada em cultivo celular no momento em que a infecção verificada pela coloração de Gimenez (1964) atingiu entre 90 e 100%. Com auxílio de um raspador plástico descartável “*cell scraper*” (Corning Incorporated), realizou-se a raspagem das células com o meio, o conteúdo obtido foi colocado em tubo tipo falcon (50 mL) e submetido à centrifugação (3.000 g / 5 min, 4°C). Dessa forma, o meio foi descartado e o precipitado ressuscitado em 8 mL de PBS (solução fosfato tamponada, pH 7,2) contendo 10% de soro de bezerro bovino + 0.01% de azida sódica para desativar as rickettsias. Depois de uma nova centrifugação (3.000 g / 5 min, 4°C) o sobrenadante foi descartado e foi realizada uma nova ressuspensão com o sobrenadante e 8 mL de PBS. Colocou-se 10µL dessa suspensão com um micropipetador multicanal em cada poço da lâmina visando atingir aproximadamente 10.000 células/poço. Após secagem total dentro do fluxo, as lâminas foram

submersas em acetona por 10 min para fixação do material. Estas depois de secadas foram armazenadas a -70°C .

4.7 SOROLOGIA RICKETTSIAL

Para a realização do ensaio de RIFI, o soro coletado dos animais foi diluído em PBS (0,1 M, pH 7,2) a uma diluição inicial de 1:64; 20 μL da diluição foram adicionados em cada poço da lâmina contendo os antígenos de *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Essas lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 min e posteriormente lavadas com solução tampão de fosfato salino (PBS) (0,1 M, pH 7,2) e mantidas em uma cuba com uma mesma solução durante 15 min em PBS, por duas vezes. Após secagem essas foram incubados a 37°C por 30 min com conjugado específico ao isotiocianato de fluoresceína na diluição 1:1000. As lâminas foram lavadas novamente como escrito anteriormente e coradas em solução de PBS (0,1 M, pH 7,2) contendo 0,2% de azul de Evans. Após completamente secas, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínula e finalmente lidas em microscópio de luz ultravioleta em objetiva de 40x (MORAES-FILHO et al., 2009).

As amostras com títulos maiores ou iguais a 64 foram consideradas reagentes. Em cada lâmina foi utilizado soro previamente testado não reativo, para controle negativo e o já sabidamente positivo para controle positivo (PINTER et al., 2006).

4.8 LOCAIS DE CAPTURA E RESGATE DOS GATOS

A localização geográfica dos locais onde os gatos de vida livre foram capturados e dos gatos do abrigo que possuíam registro de onde foram resgatados foram determinadas em graus decimais através do software My GPS Coordinates versão 2.04 para confecção do mapa de distribuição geoespacial dos mesmos em relação aos locais de avistamento de capivaras através do software ArcGIS versão 10.0.

5 RESULTADOS

5.1 SOROLOGIA RICKETTSIAL

Foram testadas 51 amostras de soro dos animais, 35 dos gatos do abrigo e 16 dos gatos de vida livre (APÊNDICE 1). Destes, 23/35 (65,7%) gatos do abrigo e 5/16 (31,2%) gatos de vida livre foram sororreagentes a pelo menos uma das duas espécies de *Rickettsia* testadas. Houve associação significativa entre a presença de *Rickettsia* e o ambiente de permanência dos animais (no abrigo ou em vida livre) ($p=0,03$). O risco de infecção rickettsial para os gatos de vida livre foi de 20% do risco calculado dos gatos do abrigo (IC 95% OR 0,2 0,07-0,84) (Tabela 1).

TABELA 1 - ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia* sp E OS GRUPOS DE ANIMAIS (ABRIGO E VIDA LIVRE).

	Frequência <i>Rickettsia</i> sp			OR	P
	Positivo	Negativo	Total		
Vida livre	5 (31,25%)	11 (68,75%)	16 (100,00%)	0,2 (0,07-0,84)	0,03
Abriço	23 (65,71%)	12 (34,29%)	35 (100,00%)		

FONTE: A autora

Dentre os gatos do abrigo, 16/35 (45,7%) reagiram a *R. rickettsii* e 17/35 (48,6%) reagiram a *R. parkeri*. Dentre os gatos de vida livre, 3/16 (18,8%) reagiram a *R. rickettsii* e 5/16 (31,2%) reagiram a *R. parkeri*. Entre os gatos do abrigo, os títulos obtidos através da RIFI variaram de 64 a 512 para *R. rickettsii* e 64 a 1024 para *R. parkeri*. Entre os gatos de vida livre, 64 a 1024 para *R. rickettsii* e 64 a 256 para *R. parkeri*. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos e a frequência de *R. rickettsii* (IC 95% OR 0,2 0,07-1,13 $p=0,12$) (Tabela 2) e *R. parkeri* (IC 95% OR 0,5 0,14-1,68 $p=0,36$) (Tabela 3).

TABELA 2 - ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia rickettsii* E OS GRUPOS DE ANIMAIS (ABRIGO E VIDA LIVRE).

	Frequência <i>Rickettsia rickettsii</i>			OR	P
	Positivo	Negativo	Total		
Vida livre	3 (18,75%)	13 (81,25%)	16 (100,00%)	0,2 (0,07-1,13)	0,12
Abriço	16 (45,71%)	19 (54,29%)	35 (100,00%)		

FONTE: A autora.

TABELA 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia parkeri* E OS GRUPOS DE ANIMAIS (ABRIGO E VIDA LIVRE).

	Frequência <i>Rickettsia parkeri</i>		Total	OR	P
	Positivo	Negativo			
Vida livre	5 (31,25%)	11 (68,75%)	16 (100,00%)	0,5 (0,14-1,68)	0,36
Abrigo	17 (48,57%)	18 (51,43%)	35 (100,00%)		

FONTE: A autora

Entretanto, o possível antígeno envolvido em reação homóloga (PAIHR) para *R. rickettsii* foi encontrado em 2/51 (3,9%) gatos, segundo interpretações padronizadas por Labruna et al. (2007) (Tabela 4).

TABELA 4. TÍTULOS APRESENTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLORESCÊNCIA INDIRETA (RIFI) PARA ANTÍGENOS BRUTOS DE 2 ESPÉCIES DE *Rickettsia* EM AMOSTRAS DE SORO DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE.

Soro felino	Títulos pela RIFI		PAIHR
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	
<i>Abrigo</i>			
GE12	64	NR	-
GE14	128	512	-
GE15	256	NR	-
GE17	128	128	-
GE19	128	NR	-
GE21	64	64	-
GE22	NR	64	-
GE23	256	128	-
GE25	NR	128	-
GE26	64	NR	-
GE27	512	64	<i>Rickettsia rickettsii</i>
GE28	NR	64	-
GE29	128	NR	-
GE31	NR	64	-
GE33	256	512	-
GE34	NR	256	-
GE35	NR	512	-
GE36	128	NR	-
GE37	256	512	-

TABELA 4. TÍTULOS APRESENTADOS PELA REAÇÃO DE IMUNOFLUORESCÊNCIAS INDIRETA (RIFI) PARA ANTÍGENOS BRUTOS DE 2 ESPÉCIES DE *Rickettsia* EM AMOSTRAS DE SORO DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE (CONTINUAÇÃO).

Soro felino	Títulos pela RIFI		PAIHR
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	
GE38	512	1024	-
GE39	128	64	-
GE41	NR	64	-
GE42	256	128	-
<i>Vida livre</i>			
GE06	128	256	-
GE07	64	64	-
GE08	NR	64	-
GE49	1024	64	<i>Rickettsia rickettsii</i>
GE50	NR	128	-

PAIHR (Antígeno possivelmente envolvido em reação homóloga). A amostra de soro com título para uma espécie de *Rickettsia* ao menos 4 vezes maior que o título obtido para a outra espécie foi considerado homólogo à primeira espécie) (Labruna et al. 2007).

NR: Soro não-reagente a um título ≥ 64 , Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

FONTE: A autora

5.3 AVALIAÇÃO DA CARGA PARASITÁRIA DOS ANIMAIS

Nenhum dos gatos presentes no abrigo apresentaram ectoparasitas devido a aplicação anterior a coleta de antiparasitário tópico (Advocate®) e limpeza periódica do local. Dentre os gatos de vida livre que apresentaram ectoparasitas (pulgas e carrapatos), 2/7 (28,6%) foram sororreagentes, porém, 3/9 (33,3%) não apresentaram ectoparasitas e foram sororreagentes (APÊNDICE 1). Dessa forma, não houve associação entre a presença de ectoparasitas e títulos positivos para *Rickettsia* sp (IC 95% OR 0,8 0,09-6,8 $p=1,00$) (Tabela 5).

TABELA 5 - CARGA PARASITÁRIA (PULGAS E CARRAPATOS) APRESENTADA PELOS GATOS DE VIDA LIVRE RELACIONADA À FREQUÊNCIA DE ANTÍGENOS PARA *Rickettsia* sp.

Carga parasitária	Frequência <i>Rickettsia</i> sp		Total	OR	P
	Positivo	Negativo			
Parasitados	2 (28,6%)	5 (71,4%)	7 (100,0%)	0,8 (0,09-6,8)	1,00
Não parasitados	3 (33,3%)	6 (66,7%)	9 (100,0%)		

FONTE: A autora

Foram encontrados carrapatos em 1/5 (20,0%) animal sororreagente e 2/11 (18,2%) animais não-sororreagentes. Da mesma forma, não houve associação entre a presença de carrapatos nos animais e os títulos positivos para *Rickettsia* sp (IC 95% OR 1,1 0,08-16,31 p=1,00) (Tabela 6).

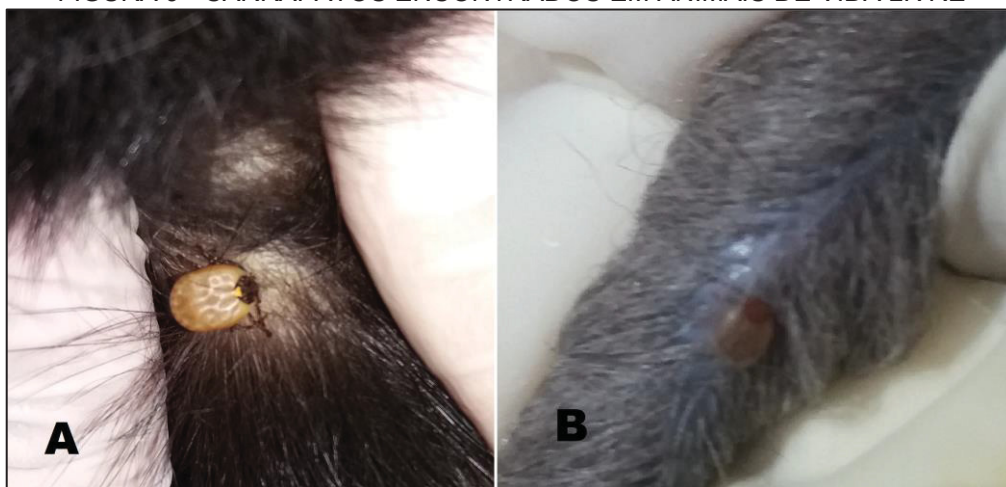
TABELA 6 - RELAÇÃO ENTRE A PRESENÇA DE CARRAPATOS E FREQUÊNCIA DE ANTÍGENOS PARA *Rickettsia* sp NOS GATOS DE VIDA LIVRE.

Presença de carrapatos	Frequência <i>Rickettsia</i> sp		Total	OR	P
	Positivo	Negativo			
Parasitados	1 (20,0%)	4 (80,0%)	5 (100,0%)	1,1 (0,07-16,30)	1,00
Não parasitados	2 (18,2%)	9 (81,8%)	11 (100,0%)		

FONTE: A autora

Os carrapatos encontrados nos animais (figura 9) consistiram em larvas de *Amblyomma* sp, ninfas de *Amblyomma sculptum* e adultos de *Rhipicephalus sanguineus*.

FIGURA 9 - CARRAPATOS ENCONTRADOS EM ANIMAIS DE VIDA LIVRE



A: forma adulta carrapato *Rhipicephalus sanguineus*

B: forma imatura de carrapato gênero *Amblyomma*

FONTE: A autora

5.4 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS

A relação entre os dados epidemiológicos como idade, sexo e esterilização de todos os animais (APÊNDICE 2) com a frequência de *Rickettsia* sp está demonstrada na tabela 7. Da mesma forma, os dados epidemiológicos dos grupos (abrigo e vida livre) e os fatores de risco estão demonstrados na tabela 8. Os dados demonstraram uma associação significativa entre a presença

de *Rickettsia* sp e a idade (Tabela 7) ($p=0,04$). Todavia, não houve associação entre títulos positivos e sexo, nem entre os animais não esterilizados quanto para os animais esterilizados ($p>0,05$) (Tabela 7).

A proporção de animais com menos de 12 meses de idade e a soropositividade foi significativamente maior que a proporção de animais acima de 12 meses de idade. Assim, animais com menos de 12 meses de idade tiveram 4,3 (IC 95% 1,22-15,54) vezes mais chance de serem positivos que os animais com mais de 12 meses de idade. No entanto, essa associação é independente do ambiente (cativo ou livre), pois quando separados em grupos (abrigo ou vida livre) a idade não foi significativa (tabela 8) ($p>0,05$).

Curiosamente, um animal nascido em cativeiro foi soropositivo para *Rickettsia* (APÊNDICE 5), sugerindo a circulação de carrapatos dentro do abrigo, embora os voluntários do abrigo reportassem a presença apenas de pulgas parasitando os animais.

TABELA 7 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FATORES DE RISCO (IDADE, SEXO E ESTERILIZAÇÃO) COM A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia* sp DE TODOS OS ANIMAIS.

Todos os animais	Frequência <i>Rickettsia</i> sp			OR	P
	Positivo	Negativo	Total		
Idade					
Menores de 12 meses	15 (75,0%)	5 (25,0%)	20 (100,0%)	4,3 (1,2-15,54)	0,04
Acima de 12 meses	11 (40,7%)	16 (59,2%)	27 (100,0%)		
Sexo					
Machos	5 (45,4%)	6 (54,6%)	11 (100,0%)	0,7 (0,11-3,91)	1,00
Fêmeas	5 (55,6%)	4 (44,4%)	9 (100,0%)		
Esterilizados					
Machos	9 (64,3%)	5 (35,7%)	14 (100,0%)	1,6 (0,37-6,82)	0,78
Fêmeas	9 (52,9%)	8 (47,1%)	17 (100,0%)		

FONTE: A autora

TABELA 8 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS FATORES DE RISCO (IDADE, SEXO E ESTERILIZAÇÃO) COM A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia* sp DOS GRUPOS (ABRIGO E VIDA LIVRE).

	Frequência <i>Rickettsia</i> sp			OR	P
	Positivo	Negativo	Total		
Idade					
Abrigo					
Menores 12 meses	14 (77,8%)	4 (22,2%)	18 (100,0%)	3,11 (0,72-13,44)	0,16
Acima de 12 meses	9 (52,9%)	8 (47,1%)	17 (100,0%)		
Vida livre					
Menores 12 meses	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (100,0%)	4,00 (0,16-95,76)	0,45
Acima de 12 meses	2 (20,0%)	8 (80,0%)	10 (100,0%)		
Sexo					
Abrigo					
Machos	2 (66,7%)	1 (33,3%)	3 (100,0%)	0,50 (0,01-12,89)	1,00
Fêmeas	4 (80,0%)	1 (20,0%)	5 (100,0%)		
Vida livre					
Machos	3 (37,5%)	5 (62,5%)	8 (100,0%)	1,80 (0,12-26,19)	1,00
Fêmeas	1 (25,0%)	3 (75,0%)	4 (100,0%)		
Esterilizados					
Abrigo					
Machos	8 (66,7%)	4 (33,3%)	12 (100,0%)	1,33 (0,27-6,49)	1,00
Fêmeas	9 (60,0%)	6 (40,0%)	15 (100,0%)		
Vida livre					
Machos	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (100,0%)	Indefinido	1,00
Fêmeas	0 (0,0%)	2 (100,0%)	2 (100,0%)		

FONTE: A autora

Os sinais clínicos observados nos animais consistiram em roncos, espirros, secreção ocular, dificuldade respiratória, anorexia e desidratação (APÊNDICE 3). Devido ao manejo inadequado da quarentena do abrigo, no qual os voluntários acabavam por restringir os animais que apresentassem esses sinais clínicos, utilizando o espaço praticamente como enfermaria, estes foram sugestivos de rinotraqueíte viral felina. As lesões observadas foram coxim plantar com frouxidão subcutânea, dermatite, lesão em córnea, lesão no focinho e necrose na ponta da cauda (Figura 10) (APÊNDICE 3).

FIGURA 10 - LESÕES EM ANIMAIS DE VIDA LIVRE



A: Animal de vida livre apresentando alopecia devido dermatite.

B: Animal de vida livre apresentando lesão em ponta de cauda.

FONTE: A autora

A frequência dos sinais clínicos e lesões observados nos animais do abrigo foi de 3/6 (50,0%) para ambos sororreagentes e não-sororreagentes. Nos animais de vida livre, a frequência dos sinais clínicos e lesões foram de 1/7 (14,3%) animais sororreagentes e 6/7 (85,7%) animais não-sororreagentes. Contudo, não houve associação entre a manifestação de sinais clínicos e presença de lesões com os títulos positivos para *Rickettsia* (IC 95% OR 0,17 0,01-2,37 $p=0,27$) (Tabela 9).

TABELA 9 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS SINAIS CLÍNICOS/LESÕES OBSERVADOS NOS ANIMAIS (ABRIGO E VIDA LIVRE) E A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia* sp.

Sinais clínico/lesões	Frequência <i>Rickettsia</i> sp		Total	OR	P
	Positivo	Negativo			
Abrigo	3 (50,0%)	3 (50,0%)	6 (100,0%)	0,17 (0,012-2,37)	0,27
Vida livre	1 (14,3%)	6 (85,7%)	7 (100,0%)		

FONTE: A autora

5.5 HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS

Os valores médios de hematócrito se encontraram dentro dos valores de referência para todos os grupos (todos os animais, abrigo e vida livre) positivos e negativos. Porém, apenas nos animais positivos do grupo de vida livre os valores médios de proteínas plasmáticas totais encontraram-se dentro dos valores de referência. Os demais apresentaram um pequeno aumento nestes

valores. De qualquer forma, a frequência rickettsial (positivo e negativo), hematócrito e valor de proteínas plasmáticas totais não tiveram associação significativa entre os grupos (todos os animais, abrigo e vida livre) (valores de p 0,51; 0,10 e 0,10 respectivamente para hematócrito e valores de p 0,846; 0,420 e 0,187 respectivamente para proteínas plasmáticas totais) (tabela 10).

TABELA 10 - RELAÇÃO ENTRE A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia* sp COM AS MÉDIAS DE HEMATÓCRITO (%) E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS (G/DL) ENTRE OS GRUPOS (TODOS OS ANIMAIS, ABRIGO E VIDA LIVRE).

	Frequência <i>Rickettsia</i> sp		P
	Positivo	Negativo	
	Média Ht ±DP	Média Ht ±DP	
Todos os animais	34,62±6,04	33,31±6,81	0,51
Abrigo	34,52±6,28	38,44±3,84	0,10
Vida livre	35,33±5,03	28,70±5,46	0,10
	Média PP ±DP	Média PP ±DP	
Todos os animais	8,1±1,14	8,1±0,69	0,846
Abrigo	8,1±1,19	7,8±0,61	0,420
Vida livre	7,9±0,70	8,5±0,59	0,187

Ht: Hematócrito - referência: 24 a 45% (LOPES et al., 2007).

PP: Proteínas plasmáticas totais - referência: 6,0 a 8,0 g/dL (LOPES et al., 2007).

FONTE: A autora

Dentre todos os animais, 1/3 (33,3%) dos sororreagentes apresentou baixos valores para o hematócrito e 1/1 (100%) dos sororreagentes apresentou um valor alto para o hematócrito. Da mesma forma, 7/18 (38,9%) dos animais sororreagentes apresentaram valores altos para proteínas plasmáticas totais. Também não houve associações entre as alterações nos valores do hematócrito ou de proteínas plasmáticas totais e títulos positivos para *Rickettsia* sp (valores de p 0,49 e 0,06 respectivamente) (Tabela 11).

TABELA 11 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS VALORES DE HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS APRESENTADOS POR TODOS OS ANIMAIS E A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia* sp.

Todos os animais	Frequência <i>Rickettsia</i> sp		Total	OR	P
	Positivo	Negativo			
Hematócrito (%)					
Abaixo valor referência	1 (33,3%)	2 (66,7%)	3 (100,0%)	-	0,49
Valores normais	22 (56,4%)	17 (43,6%)	39 (100,0%)		
Acima valor de referência	1 (100,0%)	0	1 (100,0%)		
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)					
Valores normais	17 (68,0%)	8 (32,0%)	25 (100,0%)	0,3 (0,084-1,063)	0,06
Acima valo de referência	7 (38,9%)	11 (61,1%)	18 (100,0%)		

FONTE: A autora

Quando os animais são separados nos grupos (abrigo e vida livre), 1/1 (100%) gato sororreagente do abrigo apresentou valor baixo para o hematócrito, bem como 1/1 (100%) gato sororreagente apresentou valor alto para o hematócrito. Dentre os gatos de vida livre, 3/11 (27,2%) gatos sororreagentes apresentaram baixos valores de hematócrito. Não houve correlação entre estas alterações e títulos positivos para *Rickettsia* (valores de p 0,63 e 0,40 respectivamente) (Tabela 12).

Dentre os gatos sororreagentes, 6/9 (66,7%) gatos do abrigo e 1/9 (11,1%) gatos de vida livre apresentaram altos níveis de proteínas plasmáticas totais. Da mesma forma, não houve correlação entre altos níveis de proteínas plasmáticas totais e títulos positivos para *Rickettsia* (valores de p 0,79 e 0,12 respectivamente) (Tabela 12).

TABELA 12 - ASSOCIAÇÃO ENTRE OS VALORES DE HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS APRESENTADOS PELOS GRUPOS (ABRIGO E VIDA LIVRE) E A FREQUÊNCIA DE *Rickettsia* sp.

	Frequência <i>Rickettsia</i> sp			OR	P
	Positive	Negative	Total		
Hematócrito (%)					
Abrigo					
Abaixo valor referência	1 (100,0%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)	-	0,632
Valores normais	19 (67,9%)	9 (32,1%)	28 (100,0%)		
Acima valor de referência	1 (100,0%)	0 (0,0%)	1 (100,0%)		
Vida livre					
Abaixo valor referência	0 (0,0%)	2 (100,0%)	2 (100,0%)	Indefinido	0,4
Valores normais	3 (27,3%)	8 (72,7%)	11 (100,0%)		
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)					
Abrigo					
Valores normais	15 (71,4%)	6 (28,6%)	21 (100,0%)	1,25 (0,23-6,69)	0,794
Acima valor de referência	6 (66,7%)	3 (33,3%)	9 (100,0%)		
Vida livre					
Valores normais	2 (50,0%)	2 (50,0%)	4 (100,0%)	8,00 (0,46-139,30)	0,125
Acima valor de referência	1 (11,1%)	8 (88,9%)	9 (100,0%)		

FONTE: A autora

Os animais que apresentaram níveis normais de hematócrito e níveis acima dos valores de referência para proteínas plasmáticas totais, foram sugestivos de hemólise devido a pressão negativa da seringa durante a colheita de sangue associada a dificuldade de contenção dos animais.

Apesar de 2 gatos de vida livre não-sororreagentes demonstrarem valores do hematócrito um pouco diminuídos (20 e 21% respectivamente – APÊNDICE 4) e níveis um pouco aumentados para proteínas plasmáticas totais (8.6 g/dL para ambos animais – APÊNDICE 4), estas alterações ocorreram provavelmente devido aos animais estarem parasitados (pulgas e carrapatos) e apresentarem lesões e sinais clínicos como dermatite, anorexia, desidratação, anemia e roncos (APÊNDICE 3).

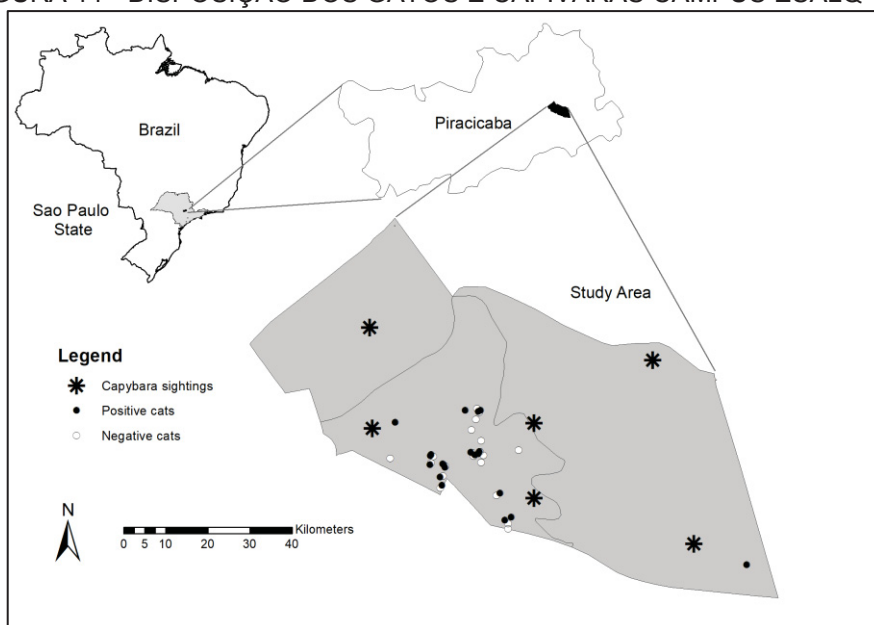
Apenas 2 gatos sororreagentes do abrigo apresentaram alterações relevantes nos testes sanguíneos. Um animal demonstrou altos níveis de proteínas plasmáticas totais (acima de 12 g/dL – APÊNDICE 4) e baixos níveis para hematócrito (21% - APÊNDICE 4) sugestivo de doença inflamatória, enquanto que o outro animal apresentou um alto valor para o hematócrito (50%) sugerindo hemoconcentração por desidratação. Contudo, estes não

apresentaram sinais clínicos para FMB, além de demonstrarem baixos títulos para *R. rickettsii* (1:128 e 1:64 respectivamente – APÊNDICE 1).

5.6 LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS GATOS E CAPIVARAS CAMPUS ESALQ-USP

Os locais dentro do campus onde 16/16 (100%) dos gatos de vida livre foram capturados e 24/35 (68,6%) dos gatos do abrigo foram resgatados (APÊNDICE 5) em relação aos locais dos avistamentos de capivaras estão demonstrados na figura 11. Esses locais incluem a Fazenda Areão, Lagoa de captação próxima ao rio Piracicaba, suinocultura, Lagoa do Aeroporto, Lago da Entomologia e na margem do rio Piracicamirim (ALMEIDA et al., 2005).

FIGURA 11 - DISPOSIÇÃO DOS GATOS E CAPIVARAS CAMPUS ESALQ-USP



Locais de avistamento de capivaras relacionados aos locais de captura dos gatos de vida livre e resgate de gatos do abrigo.

FONTE: A autora

6 DISCUSSÃO

O presente estudo testou amostras sorológicas de gatos abandonados no campus ESALQ-USP contra 2 espécies de rickettsias do GFM, *R. rickettsii* e *R. parkeri*, as quais, segundo estudos anteriores, produziram maiores títulos de anticorpos em relação à outras espécies de rickettsias testadas em diversas

espécies animais, em áreas endêmicas e não-endêmicas do Estado de São Paulo (HORTA et al., 2007).

A frequência de anticorpos anti-*Rickettsia* sp em 31,2% dos gatos de vida livre e 65,7% nos gatos do abrigo demonstraram que os gatos de vida livre apresentam 20% do risco de infecção rickettsial calculado para os gatos do abrigo (tabela 1). Por outro lado, quando essas frequências são separadas entre os grupos (abrigo e vida livre) e espécies rickettsiais (*R. rickettsii* e *R. parkeri*) não houve associação entre soropositividade e os grupos (tabela 2).

Horta (2006) verificou que gatos provenientes de regiões endêmicas e não-endêmicas do estado de São Paulo, incluindo a cidade de Piracicaba, 76% dos animais foram sororreagentes à ambas *R. rickettsii* e *R. parkeri*. Nos animais oriundos da cidade de Piracicaba, 100% dos animais foram sororreagentes a *R. rickettsii* e 85,7% foram sororreagentes a *R. parkeri*. O maior título obtido foi de 2048 para ambos os antígenos, porém na cidade de Piracicaba, os títulos variaram de 64 a 512, corroborando com os dados levantados neste estudo.

Em apenas 3,9% (tabela 4) dos soros testados foi possível determinar *R. rickettsii* como possível antígeno responsável pela infecção. Horta (2006) também verificou que os gatos foram sororreagentes à *R. felis* e *R. belii*, porém, devido à reação sorológica cruzada, não foi possível determinar qual *Rickettsia* foi responsável pela infecção.

Isso ocorre devido ao método sorológico utilizado (RIFI) não ser capaz de identificar qual espécie de *Rickettsia* está envolvida na infecção natural devido a reação sorológica cruzada que todas as rickettsias do GFM apresentam (PHILIP et al. 1978, BROUQUI et al. 2004).

Assim, os dados levantados neste estudo demonstram que gatos podem ser utilizados como animais sentinelas para infecções rickettsiais em estudos soropidemiológicos em áreas endêmicas para FMB, corroborando com os dados levantados por Horta et al. (2007). Piranda et al. (2008) afirmam que a presença de animais sororreagentes para anticorpos anti-*Rickettsia* sp em certa área indicam a circulação de rickettsias do GFM por um período de 6 a 12 meses.

O risco de infecção rickettsial em gatos parece estar associado principalmente à idade. Animais com menos de 12 meses de idade apresentam 4,3 (tabela 7) vezes mais chances de serem positivos que animais acima de 1 ano de idade. Talvez o risco de infecção rickettsial nos gatos do abrigo quando

comparado ao grupo de vida livre seja devido a maior circulação de animais jovens no do abrigo, uma vez que os critérios para a aceitação dos animais no abrigo incluíam fêmeas prenhes, animais traumatizados e animais jovens abaixo de 1 ano de idade. Além do mais, o fato destes animais estarem em cativeiro não diminui o fator de risco devido a ocorrência de um animal sororreagente nascido em cativeiro (APÊNDICE 5).

A frequência de 20% dos gatos de vida livre sororreagentes parasitados por carrapatos foi menor que as frequências encontradas em outros estudos, diferente da carga parasitária encontrada nos animais, composta por larvas de *Amblyomma* sp. e ninfas de *A. sculptum*. Horta (2006) demonstrou que 42,8% dos gatos sororreagentes para *Rickettsia* sp provenientes da cidade de Piracicaba estavam parasitados por ninfas de *Amblyomma* sp, porém não foi detectada a presença de *Rickettsia* sp por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em carrapatos coletados nos mesmos.

Da mesma forma, Shaw et al. (2001) citam que não é incomum encontrar gatos com grandes infestações por carrapatos em áreas geográficas endêmicas para infecções transmitidas por estes artrópodes. Como observado por Perez et al. (2008) em seu estudo sobre a infestação de *Amblyomma* spp. em hospedeiros da mastofauna presentes no Campus ESALQ-USP, 6/7 (85,7%) dos gatos estavam parasitados por ninfas de *Amblyomma* spp.

Assim, a baixa frequência de gatos parasitados por carrapatos encontrada neste estudo pode estar também relacionada a idade dos animais e o comportamento de autolimpeza inerente a espécie. A maioria dos animais abaixo de 12 meses de idade estavam entre os animais do abrigo, os quais possuíam um maior controle para ectoparasitos por meio de administração de antiparasitário tópico e limpeza frequente do ambiente. Dos animais de vida livre, foram encontrados somente 4/16 (25%) gatos (APÊNDICE 2) abaixo de 12 meses de idade, destes apenas 1 sororreagente. Assim, os dados obtidos neste estudo sugerem que gatos jovens com menos de um ano de idade possuem hábito de autolimpeza menos eficiente que gatos adultos que os torna suscetíveis a parasitismo por carrapatos em regiões onde há grande circulação dos mesmos.

Apesar dos gatos apresentarem o hábito de autolimpeza para remoção de pelos soltos e parasitos da pele descrito por Ley e Seksel (2016) caracterizando-

se como um fator limitante para a fixação de carrapatos nos mesmos, Marshall (1981) observou uma relação direta entre a habilidade de autolimpeza e intensidade de ectoparasitismo em gatos. De acordo com o autor, a idade do hospedeiro influenciou na infestação por pulgas (*Ctenocephalides felis*), a qual foi maior em gatos jovens em relação aos mais velhos.

Não foram encontrados carrapatos da espécie *A. dubitatum* nos animais, os quais podem atuar como potenciais vetores para *R. parkeri* nesta região (HORTA et al., 2007).

Embora alguns animais tenham apresentado sinais clínicos tais como roncos, espirros, secreção ocular, dificuldade respiratória, anorexia e desidratação, descritos por Greene e Breitschwerdt (2006) como manifestações clínicas para FM em cães, não foram observadas petéquias e equimoses cutâneas nos gatos. Nenhuma lesão apresentada pelos animais foi correlacionada com FM. Esses achados sugerem que os gatos apenas apresentaram anticorpos séricos reagentes a *Rickettsia* sp, conforme citado por Stokes (2016). Monteiro (1931) não verificou nenhuma manifestação clínica ou reação febril após infecção experimental em gato por rickettsias.

Assim, devido ao manejo inadequado dos animais no abrigo, verificou-se que esses sinais clínicos são compatíveis com rinotraqueíte viral felina, uma infecção causada pelo agente *Herpesvírus tipo I* (FHV-1), caracterizada por ser extremamente contagiosa e que resulta em sinais clínicos respiratórios e oculares (Lappin et al., 2002).

Apesar de anemia e hipoproteinemia serem descritas como alterações clínicas presentes em infecções por *R. rickettsiia* em cães (GREENE; BREITSCHWERDT, 2006; PIRANDA et al., 2008), neste estudo verificou-se que apenas um gato sororreagente do abrigo demonstrou valor de hematócrito abaixo da referência (de 24 a 45%), porém apresentou um valor acima dos valores de referência para proteínas plasmáticas totais (6,0 a 8,0 g/dL). Estas alterações estão provavelmente relacionadas com doença inflamatória, pois a diminuição da produção de eritrócitos pode ser ocasionada por doença inflamatória crônica, bem como a hiperproteinemia pode ocorrer em processos inflamatórios (LOPES et al., 2007; SCOTT; STOCKHAM, 2011).

Nenhum animal demonstrou valores de proteínas plasmáticas totais abaixo do valor de referência.

A superpopulação de gatos de vida livre aparenta estar concentrada em áreas edificadas dentro do campus, próxima aos locais de maior concentração de pessoas (figura 1). A maioria dos animais apresenta comportamento feral, porém ainda são alimentados por funcionários, acadêmicos e pessoas da comunidade, assumindo praticamente hábitos sinantrópicos.

Como demonstrado na figura 11, o local onde os gatos de vida livre foram capturados e os do abrigo foram resgatados correspondem a locais com alta atividade antrópica. Os locais de avistamento de capivaras margeiam estes locais, sugerindo uma interação muito próxima entre a população de gatos, capivaras e carrapatos.

Essa interação pode ocorrer por fatores inerentes ao comportamento normal dos gatos, pois como demonstrado por Edwards et al. (2001), gatos ferais periodicamente trocam suas áreas de ocupação com uma distância média de 1,2 km entre os centros de suas sucessivas áreas de ocupação. Dessa forma, verifica-se que os gatos de vida livre presentes no campus ESALQ-USP podem circular em áreas ocupadas por capivaras.

Por outro lado, as cercas que circundam as Áreas de Preservação Permanente e de Reserva Legal presentes no Campus e que restringem a área de acesso das capivaras estão frequentemente sujeitas à adventos que podem provocar seu rompimento e assim permitir a evasão de tais animais para demais áreas onde circulam os gatos (PLANO DE AÇÃO, 2016).

Como nenhum animal demonstrou títulos superiores a 1.024 para nenhuma das espécies de rickettsias testadas, o qual confirma infecção rickettsial (GASSER et al., 2001), sinais clínicos e alterações em hematócrito e proteínas plasmáticas totais compatíveis com FM em outra espécie (cães) e baixa frequência de parasitismo por carrapatos do gênero *Amblyomma*, este estudo sugere se que os gatos não atuam como eficientes hospedeiros amplificadores secundários para FMB segundo classificação prévia descrita por Labruna (2009).

Todavia, deve-se considerar a superpopulação destes animais presente no local e a maior taxa de “turnover” populacional (MIRMOVITCH, 1995; NATOLI, et al., 2006) que os mesmos apresentam, fazendo com que gatos jovens sejam constantemente introduzidos na população.

Como gatos jovens apresentam 4,3 vezes mais chances de infecção

rickettsial, e possível suscetibilidade ao parasitismo por carrapatos ixodídeos, mais estudos para determinar se esses animais são capazes de manter rickettsemia em níveis plasmáticos suficientes para infectar vetores são necessários. Burgdorfer et al. (1988) citam que a detecção de rickettsia em amostras de sangue de vertebrados em geral é um evento raro, pois quando infectados, estes apresentam rickettsemia por apenas alguns dias ou semanas.

Apesar deste estudo demonstrar uma baixa frequência de gatos parasitados por carrapatos ixodídeos, devido a possibilidade da circulação dos mesmos em locais de habitat natural das capivaras, sugere-se um aumento da possibilidade de infecção rickettsial em humanos quando estes transportam carrapatos infectados para ambientes com alta atividade antrópica.

7 CONCLUSÕES

O presente estudo concluiu que:

- Gatos podem atuar como hospedeiros sentinelas para *R. rickettsii*, pois apresentam anticorpos contra *Rickettsia* sp.
- Gatos jovens com menos de 12 meses de idade apresentam 4,3 vezes mais chance de serem positivos que animais mais velhos.
- Sugere-se que os gatos não atuam como eficientes hospedeiros amplificadores secundários para FMB.
- Sugere-se que gatos jovens com menos de um ano de idade possuem hábito de autolimpeza menos eficiente que gatos adultos, fator que os torna mais suscetível ao parasitismo por carrapatos em regiões com alta infestação dos mesmos.
- Sugere-se um aumento do risco de infecção rickettsial em humanos em locais onde há a presença de carrapatos ixodídeos e pelo menos um de seus hospedeiros primários devido a possibilidade de gatos de vida livre jovens serem capazes de transportar formas imaturas destes carrapatos infectados por *Rickettsia* sp para ambientes com alta atividade antrópica.

Mais estudos devem ser realizados para definir se os gatos são capazes de manter rickettsemia suficiente para infectar vetores.

REFERÊNCIAS

- ALHO, C. J. R.; CAMPOS, Z. M. S.; GONÇALVES, H. C. Ecologia de capivara (*Hydrochaeris hydrochaeris*, Rodentia) do Pantanal: I. Habitats, densidades e tamanho de grupo. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 47, n. 1/2, p. 87-97, fev./maio 1987.
- ALMEIDA, A. F.de; MATTOS, W.; PIRES, A. V.; PÉREZ, C. A. **Capivaras, carrapatos e Febre Maculosa: esclarecimentos à população de Piracicaba e região.** 2005. Disponível em: <<http://www.esalq.usp.br/instituicao/docs/esclarecimentos.pdf>>. Acesso em: 21/07/2018.
- ANVISA – AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. SVS/MS - Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária **RDC nº 72/2009**. Brasil, 29 de Dezembro de 2009.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies.** São Paulo, Vox/icctd-3/, Butantan, 223 p., 2006.
- BENINATI, T.; GENCHI, C.; TORINA, A.; CARACAPPA, S.; BANDI, C.; LO, N. *Rickettsiae* in ixodid ticks. **Sicily Emerging Infectious Disease**, v. 11, p. 509–511, 2005.
- BOITANI, L.; CIUCCI, P. Comparative Social Ecology of Feral Dogs and Wolves. **Ethology Ecology & Evolution**, 7: 49-72. 1995.
- BOUYER, D. H.; STENOS, J.; VALDES, P. C.; MORON, C. G.; POPOV, V. L.; ZAVALA-VELÁZQUEZ, J. E.; FOIL, L. D.; STOTHARD, D. R.; AZAD, A. F.; WALKER, D. H. *Rickettsia felis*: molecular characterization of a new member of the spotted fever group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 339-347. 2001.
- BRASIL. Ministério da saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7ed, série A. Normas e Manuais Técnicos, 2009.
- BRONSON, R. T. Age at death of necropsied intact and neutered cats. **American Journal of Veterinary Research**, v. 42, p.1606–1608. 1981.
- BROUQUI, P. F.; BACELAR, F.; BARATON, G. et al. Guidelines for the diagnosis of tick-borne bacterial diseases in Europe. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p. 1108-1132. 2004.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus. In: WALKER, D. H. **Biology of Rickettsial Diseases**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988. p. 33-50.

CAMPOS, C. B. **Impacto de cães (*Canis familiaris*) e gatos (*Felis catus*) errantes sobre a fauna silvestre em ambiente peri-urbano**. 2004. 55p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agrossistemas). Universidade de São Paulo. Piracicaba, SP, 2004.

CVE – CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. **Febre Maculosa – 2007 a 2017 - Distribuição dos casos confirmados segundo município provável de infecção**. Disponível em: <<http://www.saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/febre-maculosa/dados-estatisticos>>. Acesso em 20/09/2017.

DANTAS-TORRES, F. Rock mountain spotted fever. **Lancet Infectious Diseases**, v. 7, p. 724-732, 2007.

DELTA SOCIETY. **Health benefits of companion animal and therapy animals**. 2004. Disponível em: <<http://www.deltasociety.org>>. Acesso em: 17/10/2018.

DICKMAN, C. R. **Overview of the impacts of feral cats on Australian native fauna**. Canberra: Australian Nature Conservation Agency, 1996. p. 1-92.

DOMBROSKY, J; WOLVERTON, S. TNR and conservation on a university campus: a political ecological perspective. **Peer Journal**, 2014.

DUMLER, J. S.; WALKER, D. H. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and per sisting virulence. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 551– 553. 2005.

EDWARDS, G. P.; PREU, N. de; SHAKESHAFT, B. J.; CREALY, I. V.; PALTRIDGE, R. M. Home range and movements of male feral cats (*Felis catus*) in a semiarid woodland environment in central Australia. **Australian Journal of Ecology**, v. 26, p. 93–101. 2001.

EREMEEVA, M. E.; BOSSERMAN, E. A.; DEMMA, L. J.; ZAMBRANO, M. L.; BLAU, D.M.; DASCH, G. A. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. **Applied Environmental Microbiology**, v.72, p. 5569–5577. 2006.

FARNWORTH, M. J.; CAMPBELL, J.; ADAMS, N. J. What's in a name? Perceptions of stray feral cat welfare and control in Aotearoa, New Zeland. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 14, n. 1, p. 59-74. 2011.

FELIX, G. A.; PAZ, I. C.L. A.; NÄÄS, I. A.; GARCIA, R. G.; MOI, M.; CALDARA, F. R.; SANTI, F. M.; COSTA JUNIOR, R. G. *Hydrochoerus hydrochaeris*: ecologia e potencial da espécie para produção - Uma Revisão. **Revista Brasileira de Engenharia de Biossistemas Tupã**, v. 5 n. 1, p. 47-56, Jan/Abr. 2011.

FERREIRA, G. A.; NAKANO-OLIVEIRA, E.; GENARO, G. Domestic cat predation on Neotropical species in an insular Atlantic Forest remnant in Brazil. **Wildlife Biology**, v. 20, n. 3, p. 167-175. 2014.

GARCIA, R. C. M.; AMAKU, M.; BIONDO, A. W.; FERREIRA, F. Dog and cat population dynamics in an urban area: evaluation of birth control strategy. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 3, p. 511-518. 2018.

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

GENARO, G. Gato doméstico: future desafio para controle da raiva em áreas urbanas? **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 2, p. 186-189. 2010.

GHELER-COSTA, C.; VERDADE, L. M.; ALMEIDA, A. F. de. Mamíferos não-voadores do campus "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 19 (Supl. 2), p. 203 - 214. 2002.

GILLESPIE, J. J.; WILLIAMS, K.; SHUKLA, M.; SNYDER, E. E.; NORDBERG, E. K.; CERAUL, S. M.; DHARMANOLLA, C.; RAINEY, D.; SONEJA, J.; SHALLOM, J. M.; VISHNUBHAT, N. D.; WATTAM, R.; PURKAYASTHA, A.; CZAR, M.; CRASTA, O.; SETUBAL, J. C.; AZAD, A. F.; SOBRAL, B. S. *Rickettsia* phylogenomics: unwinding the intricacies of obligate intracellular life. **PLOS ONE**, v. 3, n. 4, e. 2018. 2008.

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

GREENE, C. E.; BREITSCHWERDT, E. B. Rocky Mountain spotted fever, murine typhus-like disease, rickettsialpox, typhus, and Q Fever. In: GREENE, C. E. **Infectious Diseases of the Dog and Cat**. 3rd. ed. St Louis: Saunders Elsevier, 2006. p. 232-245.

GREENE, C. E.; KIDD, L.; BREITSCHWERDT, E. B. Febre Maculosa das Montanhas Rochosas e do Mediterrâneo, doença similar ao Tifo transmitida pela pulga do gato, Varíola por *Riquetsia* e Tifo. In: GREENE, C. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. 4 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015. p. 272-283.

GUNTHER, I.; FINKLER, H.; TERKEL J. Demographic differences between urban feeding groups of neutered and sexually intact free-roaming cats following a trap-neuter-return procedure. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 238, n. 9, May 1. 2011.

GUNTHER, I.; TERKEL J. Regulation of free-roaming cat (*Felis silvestris catus*) populations: a survey of the literature and its application to Israel. **Animal Welfare**, v. 11, p. 171-188. 2002.

HACKSTADT, T. The biology of rickettsiae. **Infectious Agents and Disease**, v. 5, p. 127–143. 1996.

HORTA, M. C. **Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo**. 2006. 106 p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses). Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo. 2006.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. S. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 7, p. 793-801. 2007.

HUGHES, K. L.; SLATER, M. R. Implementation of a Feral Cat Management Program on a University Campus. **Journal of Applied Animal Welfare Science**, v. 5, n. 1, p. 15–28. 2010.

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

LABRUNA, M. B.; HORTA, M. C.; AGUIAR, D. M.; CAVALCANTE, G. T.; PINTER, A.; GENNARI, S. M.; CAMARGO, L. M. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro municipality, western Amazon, Brazil. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 7, p. 249-255. 2007.

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

LABRUNA, M. B.; KERBER, C. E.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; WAAL, D. T.; GENNARI, S. M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 97, p. 1-14. 2001.

LAPPIN, M. R.; ANDREWS, J.; SIMPSON, D.; JENSEN, W. A. Use of serologic tests to predict resistance to feline herpesvirus 1, feline calicivirus and feline parvovirus infection in cats. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 220, p. 38-42. 2002.

LEMOS, E. R. de; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A.; FREIRE, M.; AMORIM, M.; et al. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 3, p. 181–5. 1997.

LEMOS, E. R. S. de; MELLO, J. C. P. de. Riquetsioses. In: TAVARES, W.; MARINHO, L. A. C. **Rotinas de diagnóstico e tratamento das doenças infecciosas e parasitárias**. 2 ed. São Paulo: Atheneu, 2010. p 877 – 885.

LEY, J. M.; SEKSEL, K. Comportamento normal de gatos. In: LITTLE, S. E. **O gato: medicina interna**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 182-188.

LOPES, S. T. dos A.; BIONDO, A. W.; SANTOS, A. P. dos. **Manual de patologia clínica veterinária**. 3ed. Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais, 2007. 107 p.

MACDONALD DW. The ecology of carnivore social behaviour. **Nature**, v. 301, p. 379–384. 1983.

MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brasil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75-99. 2010.

McADAM, A. J.; SHARPE, A. H. Doenças infecciosas. In: KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Patologia-Bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p 357-432.

MCCLUSKEY B.J. Use of sentinel herds in monitoring and surveillance systems Salman M. In:____. **Animal disease surveillance and survey systems: methods applications**. Iowa, IA: Iowa State Press, 2003. p. 119–133.

MCNEILL, W.H. Plagues and Peoples. Anchor Books, New York, 2010.

MELLES, H. B.; COLOMBO, S.; LEMOS E. R. S. de. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células vero. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 32, n. 5, p. 469-473, set-out. 1999.

MERHEJ, V.; ANGELAKIS, E.; SOCOLOVSCHI, C.; RAOULT, D. Genotyping: evolution and epidemiological findings of *Rickettsia* species. **Infection Genetics and Evolution**, v. 25, p. 122–137. 2014.

MIRMOVITCH V. Spatial organization of urban feral cats (*Felis catus*) in Jerusalem. **Wildlife Research**, v. 22, p. 299–310. 1995.

MONTEIRO, J. L. Estudos sobre o typho exanthematico de São Paulo. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 6, p. 3-134, 1931.

MORAES-FILHO, J.; HORTA, M. C.; PACHECO, R. C.; MAEDA, M. M.; GALANO, A.; OLIVEIRA, M. L.; YAI, L. E. O.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de anticorpos anti- *Rickettsia rickettsii* em equinos do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo (CCZ/SP). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 46, n. 2, p. 85-91. 2009.

MORRISON, G. Zoonotic infections from pets. **Postgraduate Medical Journal**, v. 110, n. 1, p. 24-48. 2001.

NATOLI, E.; MARAGLIANO, L.; CARIOLA, G.; FAINI, A.; BONANNI,

R.; CAFAZZO, S.; FANTINI, C. Management of feral domestic cats in the urban environment of Rome (Italy). **Preventive Veterinary Medicine**, v. 77, p. 180–185. 2006.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, p. 773–778. 1999.

OLIVEIRA, S. V. de; GUIMARÃES, J. N.; RECKZIEGEL, G. C.; NEVES, B. M. da C.; ARAÚJOVILGES, K. M. de.; FONSECA, L. X.; PINNA, F. V.; PEREIRA, S. V. C.; CALDAS, E. P. de.; 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**, 22:22. 2016.

PADDOCK, C. D.; SUMMER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; GODDARD, J.; MCLELLAN, S. L.; TAMMINGA, C.L. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p. 805-11. 2004.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; RAOULT, D. Tickborne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, p. 719–756. 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, p. 657–702, 2013.

PEREZ, C. A.; ALMEIDA, A. F.de; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V. H. B. de; BALESTRIN, D. do C.; GUIMARÃES, M. S.; COSTA, J. C.; RAMOS, L. A.; ARRUDA-SANTOS, A. D.; MÁXIMO-ESPÍNDOLA, C. P.; BARROS-BATTESTI, D. M. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, n. 4, p. 210-217, 2008.

PHILIP, R. N.; CASPER, W.; BURGDORPER, W.; GERLOFF, R. K.; HUGHES, L. E.; BELL, E. J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. **Journal of Immunology**, v. 121, p. 1961-1968. 1978.

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

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523–529, 2006.

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

PLANO DE AÇÃO. Plano para a prevenção e o controle da febre maculosa no Campus “Luiz De Queiroz” – USP. Piracicaba, Dezembro de 2016.

PLANO DIRETOR SOCIOAMBIENTAL PARTICIPATIVO DO CAMPUS “LUIZ DE QUEIROS”. Piracicaba, 2013-2015.

RAOULT, D. Riquetsioses. In: GOLDMAN, L.; AUSIELLO, D. Cecil, **Tratado de medicina interna**. 22 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 2273-2285

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiological Reviews**, v.10, p. 694-719, 1997.

RHYAN, J. C.; SPRAKER, T. R. Emergence of diseases from wildlife reservoirs. **Veterinary Pathology**, v. 47, p. 34–39, 2010.

ROCHLITZ, I. A review of the housing requirements of domestic cats (*Felis silvestris catus*) kept in the home. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 93, n. 1, p. 97-109, 2005.

SAITO, T. B.; CUNHA-FILHO, N. A.; PACHECO, R. C.; FERREIRA, F.; PAPPEN, F. G.; FARIAS, N. A.; LARSSON, C. E.; LABRUNA, M. B. Canine infection by rickettsiae and ehrlichiae in southern Brazil. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 79, n. 1, p. 102-8, 2008.

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. 265-269, 2005.

SCORPIO, D. G.; WACHTMAN, L. M.; TUNIN, R. S.; BARAT, N. C.; GARYU, J. W.; DUMLER, J. S. Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. **American Association for Laboratory Animal Science**, v. 47, n. 5, p. 23-8, 2008.

SCOTT, M. A.; STOCKHAM, S. L. **Fundamentos de Patologia Clínica Veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 729p.

SHAW, S. E.; BIRTLES, R. J.; DAY, M. J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**. v.3, p. 193–209, 2001.

SILVA, L. J. da; ANGERAMI, R. N.; NASCIMENTO, E. M. M. do. Febre Maculosa Brasileira e outras riquetsioses no Brasil. In: VERONESI, R.; FOCACCIA, R. **Tratado de infectologia**. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2009. p. 789-805.

SILVA, J. M. C.; CASTELETI, C. H. M. Status of the biodiversity of the Atlantic forest of Brazil. In: Galindo-Leal, C.; Câmara, I.G. **State of the Hotspots: The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook**. Washington: Island Press, 2003. p. 43-59.

SILVANO, D.; BENDAS, A. J. R.; MIRANDA, M. G. N.; PINHÃO, R.; MENDES-DE-ALMEIDA, F.; LABARTHE, N. V.; PAIVA, J. P. Divulgação dos princípios da guarda responsável: uma vertente possível no trabalho de pesquisa a campo. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v. 09, p. 64-86, 2010.

SLATER, M. R. Understanding issues and solutions for unowned, free-roaming cat populations. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 225, p. 1350-1354, 2004.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S.; BORBA R, C.; 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, p. 116–121, 2009.

SOUZA, C. E. de; CALIC, S. B.; CAMARGO, M. C. G. O.; SAVANI, E. S. M.; SOUZA, S. S. L. de; LIMA, V. L. C.; RODRIGUES NETO, E. J.; YOSHINARI, N. H. O papel da capivaras *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da febre maculosa brasileira. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, 2004.

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

SOUZA, L. G. A. **Pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em cães e equinos na região de Uberlândia, Minas Gerais, Brasil**. 2011. 47p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais. 2011.

STOKES, J. Doenças fúngicas e causadas por riquetsias. In: LITTLE, S. E. **O gato: medicina interna**. Rio de Janeiro: Roca, 2016. p. 978-990

TAN, J. S. Human zoonotic infections transmitted by dogs and cats. **Archives of Internal Medicine**, v. 157, p.1933-1943, 1997.

TAYLOR, L.H., LATHAM, S.M., WOOLHOUSE, M.E. Risk factors for human disease emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences**, v. 356, p. 983–9, 2001.

TENNENT, J.; DOWNS, C. T. Abundance and home ranges of feral cats in an urban conservancy where there is supplemental feeding: a case study from South Africa. **African Zoology**, v. 43, n. 2, p. 218-229, 2008.

UENO, T. E. H. **Infecção experimental de equinos por *Rickettsia rickettsii* e avaliação da transmissão para carrapatos *Amblyomma cajennense***. 2014. 83 p. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2014.

USP ESALQ – Assessoria de Comunicação. **Ministério Público apura risco de febre maculosa na ESALQ**. (01/06/2015). Disponível em: <http://www.esalq.usp.br/acom/clipping/arquivos/01-06_ministerio_publico_JP.pdf>. Acesso em: 27/07/ 2018.

VIGNE, J. D.; GUILAINE, J.; DEBUE, K.; HAYE, L.; GÉRARD, P. Early taming of the cat in Cyprus. **Science**, 259, 2004.

WALLACE, J. L.; LEVY, J. K. Population characteristics of feral cats admitted to seven trap-neuter-return programs in the United States. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v.8, p. 279-284, 2006.

WALKER, D. H.; RAOULT, D.; DUMLER, J. S.; MARRIE, T. Riquetsioses. In: KASPER, D. L. et al. **Harrison, medicina interna**. 16 ed. Rio de Janeiro: McGraw- hill, 2006. p.1050-1059.

WEISER, G. Tecnologia laboratorial em Medicina Veterinária. In: THRALL, M. A.; WEISER, G.; ALLISON, R. W.; CAMPBELL, T. W. **Hematologia e bioquímica clínica veterinária**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2017. p. 2-27.

WHO/WSPA, World Health Organization/ World Society for the Protection of Animals. **Guidelines for dog population management**. Geneva, 1990.

WONG, S. K.; FEINSTEIN, L. H.; HEIDMANN, P.; Healthy pets, healthy people. **JAVMA**, v. 215, n. 3, p.335-8, 1999.

WOOLHOUSE, M. E.; GOWTAGE-SEQUERIA, S. Host range and emerging and reemerging pathogens. **Emerging Infectious Diseases**, v.11, n. 12, p.1842-7, 2005.

**APÊNDICE 1 - VALORES DOS TÍTULOS RIFI PARA ANTÍGENOS DE
Rickettsia sp, E PRESENÇA DE ECTOPARASITAS NOS GATOS DO
 ABRIGO E DE VIDA LIVRE.**

Identificação	Títulos RIFI para anígenos de <i>Rickettsia</i> sp		Presença de ectoparasitas
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	
<i>Abrigo</i>			
GE 01	-	-	-
GE 02	-	-	-
GE 03	-	-	-
GE 12	64	-	-
GE 13	-	-	-
GE 14	128	512	-
GE 15	256	-	-
GE 16	-	-	-
GE 17	128	128	-
GE 18	-	-	-
GE 19	128	-	-
GE 20	-	-	-
GE 21	64	64	-
GE 22	-	64	-
GE 23	256	128	-
GE 24	-	-	-
GE 25	-	128	-
GE 26	64	-	-
GE 27	512	64	-
GE 28	-	64	-
GE 29	128	-	-
GE 30	-	-	-
GE 31	-	64	-
GE 32	-	-	-
GE 33	256	512	-
GE 34	-	256	-
GE 35	-	512	-
GE 36	128	-	-
GE 37	256	512	-
GE 38	512	1024	-
GE 39	128	64	-
GE 40	-	-	-
GE 41	-	64	-
GE 42	256	128	-
GE 43	-	-	-
<i>Vida livre</i>			
GE 05	-	-	-
GE 06	128	256	-

APÊNDICE 1 - VALORES DOS TÍTULOS RIFI PARA ANTÍGENOS DE *Rickettsia* sp, E PRESENÇA DE ECTOPARASITAS NOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE (CONTINUAÇÃO).

Identificação	Títulos RIFI para anígenos de <i>Rickettsia</i> sp		Presença de ectoparasitas
	<i>Rickettsia rickettsii</i>	<i>Rickettsia parkeri</i>	
GE 07	64	64	-
GE 08	-	64	-
GE 09	-	-	-
GE 10	-	-	-
GE 11	-	-	Pulgas e carrapatos
GE 44	-	-	-
GE 45	-	-	-
GE 46	-	-	-
GE 47	-	-	Pulgas
GE 48	-	-	Pulgas
GE 49	1024	64	Carrapatos
GE 50	-	128	Pulgas
GE 51	-	-	Pulgas
GE 52	-	-	Pulgas e carrapatos

APÊNDICE 2 - RELAÇÃO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (IDADE E SEXO) DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE.

Identificação	Resultado	Idade (meses)	Sexo
<i>Abrigo</i>			
GE 01	Negativo	36	Fêmea castrada
GE 02	Negativo	36	Macho castrado
GE 03	Negativo	9	Fêmea castrada
GE 12	Positivo	7	Macho castrado
GE 13	Negativo	12	Fêmea castrada
GE 14	Positivo	7	Fêmea
GE 15	Positivo	12	Macho castrado
GE 16	Negativo	7	Fêmea
GE 17	Positivo	7	Fêmea castrada
GE 18	Negativo	36	Fêmea castrada
GE 19	Positivo	7	Fêmea
GE 20	Negativo	7	Macho castrado
GE 21	Positivo	9	Macho castrado
GE 22	Positivo	12	Macho castrado
GE 23	Positivo	7	Fêmea
GE 24	Negativo	12	Macho castrado
GE 25	Positivo	7	Macho castrado
GE 26	Positivo	7	Macho castrado
GE 27	Positivo	60	Macho castrado
GE 28	Positivo	60	Fêmea castrada
GE 29	Positivo	7	Fêmea castrada
GE 30	Negativo	24	Fêmea castrada
GE 31	Positivo	7	Fêmea
GE 32	Negativo	12	Fêmea castrada
GE 33	Positivo	7	Fêmea castrada
GE 34	Positivo	48	Fêmea castrada
GE 35	Positivo	48	Fêmea castrada
GE 36	Positivo	7	Macho castrado
GE 37	Positivo	48	Fêmea castrada
GE 38	Positivo	36	Fêmea castrada
GE 39	Positivo	24	Fêmea castrada
GE 40	Negativo	24	Macho castrado
GE 41	Positivo	3	Macho
GE 42	Positivo	3	Macho
GE 43	Negativo	2	Macho
<i>Vida livre</i>			
GE 05	Negativo	36	Macho
GE 06	Positivo	36	Macho
GE 07	Positivo	-	Fêmea
GE 08	Positivo	-	Macho

APÊNDICE 2 – RELAÇÃO DOS DADOS EPIDEMIOLÓGICOS (IDADE E SEXO) DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE (CONTINUAÇÃO).

Identificação	Resultado	Idade (meses)	Sexo
GE 09	Negativo	9	Fêmea
GE 10	Negativo	12	Fêmea
GE 11	Negativo	48	Macho
GE 44	Negativo	12	Macho
GE 45	Negativo	-	Fêmea
GE 46	Negativo	48	Fêmea castrada
GE 47	Negativo	48	Macho
GE 48	Negativo	36	Macho
GE 49	Positivo	36	Macho
GE 50	Positivo	8	Macho castrado
GE 51	Negativo	24	Fêmea castrada
GE 52	Negativo	-	Macho castrado

APÊNDICE 3 - RELAÇÃO DE SINAIS CLÍNICOS E LESÕES PRESENTES NOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE.

Identificação	Resultado	Sinais clínicos	Lesões
<i>Abrigo</i>			
GE 01	Negativo	Rinotraqueíte viral felina	-
GE 02	Negativo	Rinotraqueíte viral felina	-
GE 03	Negativo	Rinotraqueíte viral felina	-
GE 12	Positivo	-	-
GE 13	Negativo	-	-
GE 14	Positivo	-	-
GE 15	Positivo	-	-
GE 16	Negativo	-	-
GE 17	Positivo	-	-
GE 18	Negativo	-	-
GE 19	Positivo	-	-
GE 20	Negativo	-	-
GE 21	Positivo	-	-
GE 22	Positivo	-	-
GE 23	Positivo	-	-
GE 24	Negativo	-	-
GE 25	Positivo	-	-
GE 26	Positivo	-	-
GE 27	Positivo	Rinotraqueíte viral felina	-
GE 28	Positivo	-	-
GE 29	Positivo	-	-
GE 30	Negativo	-	-
GE 31	Positivo	-	-
GE 32	Negativo	-	-
GE 33	Positivo	-	-
GE 34	Positivo	-	-
GE 35	Positivo	Rinotraqueíte viral felina e anorexia	-
GE 36	Positivo	Secreção ocular	-
GE 37	Positivo	-	-
GE 38	Positivo	-	-
GE 39	Positivo	-	-
GE 40	Negativo	-	-
GE 41	Positivo	-	-
GE 42	Positivo	-	-
GE 43	Negativo	-	-
<i>Vida livre</i>			
GE 05	Negativo	-	Coxins plantares com frouxidão subcutânea
GE 06	Positivo	-	Coxins plantares com frouxidão subcutânea

**APÊNDICE 3 – RELAÇÃO DE SINAIS CLÍNICOS E LESÕES PRESENTES
NOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE (CONTINUAÇÃO).**

Identificação	Resultado	Sinais clínicos	Lesões
GE 07	Positivo	-	-
GE 08	Positivo	-	-
GE 09	Negativo	Rinotraqueíte viral felina	-
GE 10	Negativo	-	-
GE 11	Negativo	-	Dermatite
GE 44	Negativo	-	-
GE 45	Negativo	-	-
GE 46	Negativo	-	-
GE 47	Negativo	-	Dermatite, lesão córnea
GE 48	Negativo	-	Lesão em focinho
GE 49	Positivo	-	-
GE 50	Positivo	-	-
GE 51	Negativo	-	-
GE 52	Negativo	Anorexia, desidratação, anemia, roncos	Necrose em ponta da cauda

APÊNDICE 4 - VALORES DE HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS PLASMÁTICAS TOTAIS DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE.

Identificação	Resultado	Hematócrito (%)	Proteínas plasmáticas totais (g/dL)
<i>Abrigo</i>			
GE 01	Negativo	-	-
GE 02	Negativo	-	-
GE 03	Negativo	-	-
GE 12	Positivo	50	7,6
GE 13	Negativo	45	8,2
GE 14	Positivo	39	8,2
GE 15	Positivo	37	7,6
GE 16	Negativo	32	6,6
GE 17	Positivo	39	7,6
GE 18	Negativo	40	8,6
GE 19	Positivo	32	7,6
GE 20	Negativo	35	7,6
GE 21	Positivo	33	7,2
GE 22	Positivo	35	8,0
GE 23	Positivo	29	7,6
GE 24	Negativo	35	8,4
GE 25	Positivo	35	7,6
GE 26	Positivo	39	7,0
GE 27	Positivo	36	7,6
GE 28	Positivo	40	8,0
GE 29	Positivo	21	acima 12
GE 30	Negativo	40	7,8
GE 31	Positivo	31	7,6
GE 32	Negativo	40	7,8
GE 33	Positivo	35	9,6
GE 34	Positivo	-	-
GE 35	Positivo	27	9,4
GE 36	Positivo	26	7,8
GE 37	Positivo	31	9,8
GE 38	Positivo	37	8,6
GE 39	Positivo	42	7,4
GE 40	Negativo	40	7,8
GE 41	Positivo	31	6,8
GE 42	Positivo	-	-
GE 43	Negativo	39	7,2
<i>Vida livre</i>			
GE 05	Negativo	-	-
GE 06	Positivo	-	-
GE 07	Positivo	40	8,6
GE 08	Positivo	30	8,0

**APÊNDICE 4 – VALORES DE HEMATÓCRITO E PROTEÍNAS
PLASMÁTICAS TOTAIS DOS GATOS DO ABRIGO E DE VIDA LIVRE
(CONTINUAÇÃO).**

Identificação	Resultado	Hematócrito (%)	Proteínas plasmáticas totais (g/dL)
GE 09	Negativo	30	8,2
GE 10	Negativo	30	7,8
GE 11	Negativo	20	8,6
GE 44	Negativo	30	8,2
GE 45	Negativo	28	8,4
GE 46	Negativo	37	9
GE 47	Negativo	31	8,6
GE 48	Negativo	25	9,8
GE 49	Positivo	-	-
GE 50	Positivo	36	7,2
GE 51	Negativo	35	7,8
GE 52	Negativo	21	8,6

**APÊNDICE 5 - LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA EM GRAUS DECIMAIS DOS
LOCAIS ONDE OS GATOS DE VIDA LIVRE FORAM CAPTURADOS E OS
GATOS DO ABRIGO FORAM RESGATADOS.**

Identificação	Grupo	Resultado	Local resgate/captura	Latitude	Longitude
GE27	Abrigo	Positivo	Trat. resíduos químicos	-22,705597	-47,640070
GE28	Abrigo	Positivo	Caprinocultura	-22,718797	-47,607449
GE15	Abrigo	Positivo	Nascido cativo	-22,709342	-47,636742
GE14	Abrigo	Positivo	Dep. de Solos	-22,708317	-47,632069
GE12	Abrigo	Positivo	Dep. de Solos	-22,708317	-47,632069
GE19	Abrigo	Positivo	Dep. de Solos	-22,708317	-47,632069
GE36	Abrigo	Positivo	Dep. de Solos	-22,70832	-47,632069
GE42	Abrigo	Positivo	Serralheria	-22,708583	-47,636722
GE41	Abrigo	Positivo	Serralheria	-22,708583	-47,636722
GE21	Abrigo	Positivo	DVATCOM	-22,710667	-47,635917
GE39	Abrigo	Positivo	Prédio Engenharia	-22,712167	-47,630361
GE38	Abrigo	Positivo	Garagem	-22,714681	-47,629286
GE35	Abrigo	Positivo	Clínica do Leite	-22,704500	-47,633583
GE17	Abrigo	Positivo	Atrás atual RU	-22,704583	-47,632167
GE26	Abrigo	Positivo	Atrás atual RU	-22,704583	-47,632167
GE32	Abrigo	Negativo	Horticultura	-22,708195	-47,628622
GE18	Abrigo	Negativo	Nascido cativo	-22,709342	-47,636742
GE20	Abrigo	Negativo	Dep. Solos	-22,708317	-47,632069
GE43	Abrigo	Negativo	Serralheria	-22,708583	-47,636722
GE 03	Abrigo	Negativo	DVATCOM	-22,710667	-47,635917
GE 01	Abrigo	Negativo	Prédio Engenharia	-22,712167	-47,630361
GE40	Abrigo	Negativo	Garagem	-22,714681	-47,629286
GE16	Abrigo	Negativo	Atrás atual RU	-22,704583	-47,632167
GE30	Abrigo	Negativo	Bueiro antigo RU	-22,708681	-47,631883
GE 06	Vida livre	Positivo	Casa de hóspedes	-22,709775	-47,635366
GE 07	Vida livre	Positivo	Casa de hóspedes	-22,709775	-47,635366
GE 08	Vida livre	Positivo	Casa de hóspedes	-22,709775	-47,635366
GE 49	Vida livre	Positivo	Garagem	-22,714681	-47,629286
GE 50	Vida livre	Positivo	Polo da Licenciatura	-22,711442	-47,635731
GE 05	Vida livre	Negativo	Casa de hóspedes	-22,709775	-47,635366
GE 09	Vida livre	Negativo	Dep. Solos	-22,708317	-47,632069
GE 10	Vida livre	Negativo	Dep. Solos	-22,708317	-47,632070
GE 11	Vida livre	Negativo	Dep. Solos	-22,708317	-47,632071
GE 44	Vida livre	Negativo	Dep. Solos	-22,708317	-47,632072
GE 45	Vida livre	Negativo	Dep. Solos	-22,708317	-47,632073
GE 47	Vida livre	Negativo	Dep. Solos	-22,708317	-47,632074
GE 48	Vida livre	Negativo	Dep. Solos	-22,708317	-47,632075
GE 51	Vida livre	Negativo	ADEALQ/ADUSP	-22,711703	-47,635878
			Dep. Zootec. Não		
GE 52	Vida livre	Negativo	Ruminantes	-22,708925	-47,640522
GE 46	Vida livre	Negativo	Guarita Av. Pádua Dias	-22,715456	-47,629581

APÊNDICE 6 - MANUSCRITO EM INGLÊS

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^a, Louise Bach Kmetiuk^a, Camila Marinelli Martins^b, Igor Adolfo Dexheimer Paploski^c, Aurea Maria Oliveira Canavessi^d, Tatiana Jimenez^e, Maysa Pellizzaro^f, Thiago F. Martins^e, Vivien Midori Morikawa^g, Andrea P. dos Santos^h, Marcelo Bahia Labruna^e, Alexander Welker Biondo^{a*}

^a Department of Cellular and Molecular Biology, Federal University of Paraná, Curitiba, PR, 81531-900, Brazil. jcrebonato@hotmail.com; louisebachk@ufpr.br; abiondo@ufpr.br.

^b Department of Nursing and Public Health, State University of Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, 84030-900, Brazil. camimarinelli@gmail.com.

^c Department of Veterinary Population Medicine, University of Minnesota, St. Paul, MN, 55108, USA. igorufprmv@gmail.com.

^d Department of Animal Science, University of São Paulo, Piracicaba, São Paulo, 13418-900, Brazil. acanavessi@usp.br.

^e 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; thiagodogo@hotmail.com; labruna@usp.br.

^f 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.

^g Department of Collective Health, Federal University of Parana, Curitiba, PR, 80060-240, Brazil. vmmorikawa@gmail.com.

^hAssistant professor, Department of Comparative Pathobiology, Purdue University, West Lafayette, IN, 47907, USA. santos1@purdue.edu.

*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

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 ≥ 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.

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* [6] (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 km², 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 61th) habitants, with a high Human Development Index (HDI) of 0.785 (ranked 92th) 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 ≥ 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. Ethics

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).

2.5. 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).

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 shown 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).

Since *Rickettsia* spp usually infect and remain inside host endothelial cells, molecular detection has failed when investigating blood samples (La Scola; 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, despite serological titers up to 16,384 (Souza et al., 2007). 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 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.

6. Disclosure and conflicts of interest

The authors declare that they have no competing interests.

7. 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

6.Consent for publication

Not applicable.

7. Availability of data and material

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

8. Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

9. Funding:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public,

commercial, or not-for-profit sectors.

10. Authorship of the paper

Project designing: AB; sample collection: JC, AC, MP, LK and AB; data acquisition: JM, IP, VM, LK, AB, ML; sample processing: LK, TJ, TM and ML; statistical analysis: CM, IP, JM; manuscript preparation: JM, LK, CM, VM, AB. All authors have reviewed and approved the final version of the manuscript.

11. 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 Capes, respectively.

12. References

- Aragão, H.B., Fonseca, F., 1961. Notas de ixodologia: VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira: notas de ixodologia. Mem Inst Oswaldo Cruz. 59, 115–129.
- 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/icttd-3/, Butantan, São Paulo.
- Bayliss, D.B., Morris, A.K., Horta, M.C., Labruna, M.B., Radecki, S. V, Hawley, J.R., Brewer, M.M., Lappin, M.R., 2009. Prevalence of Rickettsia species antibodies and Rickettsia species DNA in the blood of cats with and without fever. J Feline Med Surg. 11, 266–270. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2008.06.007>
- Beati, L., Kelly, P.J., Mason, P.R., Raoult, D., 1994. Species-specific BALB/c mouse antibodies to rickettsiae studied by western blotting. FEMS Microbiol Lett. 119, 339–44.
- Beninati, T., Genchi, C., Torina, A., Caracappa, S., Bandi, C., Lo, N., 2005. Rickettsiae in Ixodid Ticks, Sicily. Emerg Infect Dis. 11, 509–511. <https://doi.org/10.3201/eid1103.040812>.

- Brasil (Ministry of Health), 2003. Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) Febre Maculosa - Casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação, período 2003. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanwin/cnv/febremaculosasp.def> (accessed 10 April 2019).
- Case, J.B., Chomel, B., Nicholson, W., Foley, J.E., 2006. Serological survey of vector-borne zoonotic pathogens in pet cats and cats from animal shelters and feral colonies. *J Feline Med Surg.* 8, 111–117. <https://doi.org/10.1016/j.jfms.2005.10.004>
- Edwards, G.P., Preu, N. de, Shakeshaft, B.J., Crealy, I. V, Paltridge, R.M., 2001. Home range and movements of male feral cats (*Felis catus*) in a semiarid woodland environment in central Australia. *Austral Ecol.* 26, 93–101. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2001.01091.pp.x>.
- Esalq-USP, 2016. Plano para a prevenção e o controle da Febre Maculosa no campus “Luiz de Queiroz” – USP. <http://www4.esalq.usp.br/sites/default/files/Plano-de-Acao-2016-2020.pdf> (Acessed 10 April 2019).
- Gheler-Costa, C., Verdade, L.M., Almeida, A.F. de, 2002. Mamíferos não-voadores do campus “Luiz de Queiroz”, Universidade De São Paulo, Piracicaba, Brasil. *Rev Bras Zool.* 19, 203–214.
- Hinkle, N.C., Koehler, P.G., Patterson, R.S., 1998. Host Grooming Efficiency for Regulation of Cat Flea (*Siphonaptera : Pulicidae*) Populations. *J Med Entomol.* 35, 266–269. <https://doi.org/10.1093/jmedent/35.3.266>.
- Horta, M.C., 2006. Estudo epidemiológico de *Rickettsia felis* em áreas endêmicas e não-endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo. Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia.
- Horta, M.C., Labruna, M.B., Pinter, A., Linardi, P.M., Schumaker, T.T.S., 2007. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 102, 793–801. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007000700003>.
- Instituto Brasileiro De Geografia E Estatística (IBGE), 2017. Piracicaba Panorama.

- <https://cidades.ibge.gov.br/brasil/sp/piracicaba/panorama> (accessed 16 March 2019).
- Kelly, P.J., Köster, L., Li, J., Zhang, J., Huang, K., Branford, G.C., Marchi, S., Vandenplas, M., Wang, C., 2017. Survey of vector-borne agents in feral cats and first report of *Babesia gibsoni* in cats on St Kitts, West Indies. *BMC Vet Res.* 13, 331. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1230-1>.
- Labruna, M.B., 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. *Ann NY Acad Sci.* 1166, 156–166. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>.
- 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., 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. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2017.02.007>.
- Labruna, M.B., Ogrzewalska, M., Soares, J.F., Martins, T.F., Soares, H.S., Moraes-Filho, J., Nieri-Bastos, F.A., Almeida, A.P., Pinter, A., 2011. Experimental Infection of *Amblyomma aureolatum* Ticks with *Rickettsia rickettsii*. *Emerg Infect Dis.* 17, 829–834. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101524>.
- Labruna, M.B., Whitworth, T., Horta, M.C., Bouyer, D.H., McBride, J.W., Pinter, A., Popov, V., Gennari, S.M., Walker, D.H., 2004. *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.* 42, 90–98. <https://doi.org/10.1128/jcm.42.1.90-98.2004>.
- La Scola, B., Raoult, D., 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *J Clin Microbiol.* 35(11): 2715–2727. pmid: 9350721.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D., Mas-Coma, S., 1998. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastrata* (Acari: Ixodidae). *Parasitol Res.* 84, 478–84.

<https://doi.org/10.1007/s004360050433>.

- Martins, T.F., Onofrio, V.C., Barros-Battesti, D.M., Labruna, M.B., 2010. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brasil: descriptions, redescriptions, and identification key. *Ticks Tick Borne Dis.* 1, 75–99. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2010.03.002>.
- Matthewman, L., Kelly, P., Hayter, D., Downie, S., Wray, K., Bryson, N., Rycroft, A., Raoult, D., 1997. Domestic Cats as Indicators of the Presence of Spotted Fever and Typhus Group Rickettsiae. *Eur J Epidemiol.* 13, 109–111.
- Novakova, M., Costa, F.B., Krause, F., Literak, I., Labruna, M.B., 2016. *Rickettsia vini* n. sp. (Rickettsiaceae) infecting the tick *Ixodes arboricola* (Acari: Ixodidae). *Parasit Vectors* 9, 469. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1742-8>.
- Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., Parola, P., Paddock, C.D., Raoult, D., 2005. Tick-Borne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. *Clin Microbiol Ver.* 18, 719–756. <https://doi.org/10.1128/CMR.18.4.719>
- Perez, C.A., Almeida, A.F. de, Almeida, A., Carvalho, V.H.B. de, Balestrin, D. do C., Guimarães, M.S., Costa, J.C., Ramos, L.A., Arruda-Santos, A.D., Máximo-Espíndola, C.P., Barros-Battesti, D.M., 2008. Carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) e suas relações com os hospedeiros em área endêmica para febre maculosa no estado de São Paulo. *Rev Bras Parasitol. Vet* 17, 210–217.
- Sangioni, L.A., Horta, M.C., Vianna, M.C.B., Gennari, S.M., Soares, R.M., Galvão, M.A.M., Schumaker, T.T.S., Ferreira, F., Vidotto, O., Labruna, M.B., 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemic city. *Emerg Infect Dis.* 11, 265–269. <https://doi.org/10.3201/eid1102.040656>.
- Segura, F., Pons, I., Miret, J., Pla, J., Ortuño, A., Nogueras, M.-M., 2014. The role of cats in the eco-epidemiology of spotted fever group diseases. *Parasit Vectors.* 7, 353. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-353>.
- Solano-Gallego, L., Hegarty, B., Espada, Y., Llull, J., Breitschwerdt, E., 2006. Serological and molecular evidence of exposure to arthropod-borne organisms in cats from

northeastern Spain. *Vet Microbiol.* 118, 274–277.

<https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.07.010>

Souza, C.E., Moraes-Filho, J., Ogrzewalska, M., Uchoa, F.C., Horta, M.C., Souza, S.S., Borba, M.C., Labruna, M.B., 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vet Parasitol.* 161(1-2), 116-121. doi: 10.1016/j.vetpar.2008.12.010

Stephenson, N., Blaney, A., Clifford, D., Gabriel, M., Wengert, G., Foley, P., Brown, R.N., Higley, M., Buckenberger-Mantovani, S., Foley, J., 2017. Diversity of rickettsiae in a rural community in northern California. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 526–531. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.02.014>

Zavala-Velazquez, J.E., Yu, X.J., Walker, D.H., 1996. Unrecognized spotted fever group rickettsiosis masquerading as dengue fever in Mexico. *Am J Trop Med Hyg.* 55, 157–9.

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.[10]
California and Wisconsin, USA	Owned, sheltered and feral cats.	29/170 (17.05) for <i>R. rickettsii</i> . 2/20 (10.0) owned, 14/114 (12.3) sheltered and 9/36 (25.0) feral cats.	Case et al.[9]
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. [6]
St Kitts, West Indies	Feral cats	22/52 (42.3) <i>R.rickettsii</i>	Kelly et al. [8]
Northern California, USA	Owned cats from rural communities	23/29 (79.3) <i>R. rickettsii</i>	Stephenson et al.[7]

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.

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

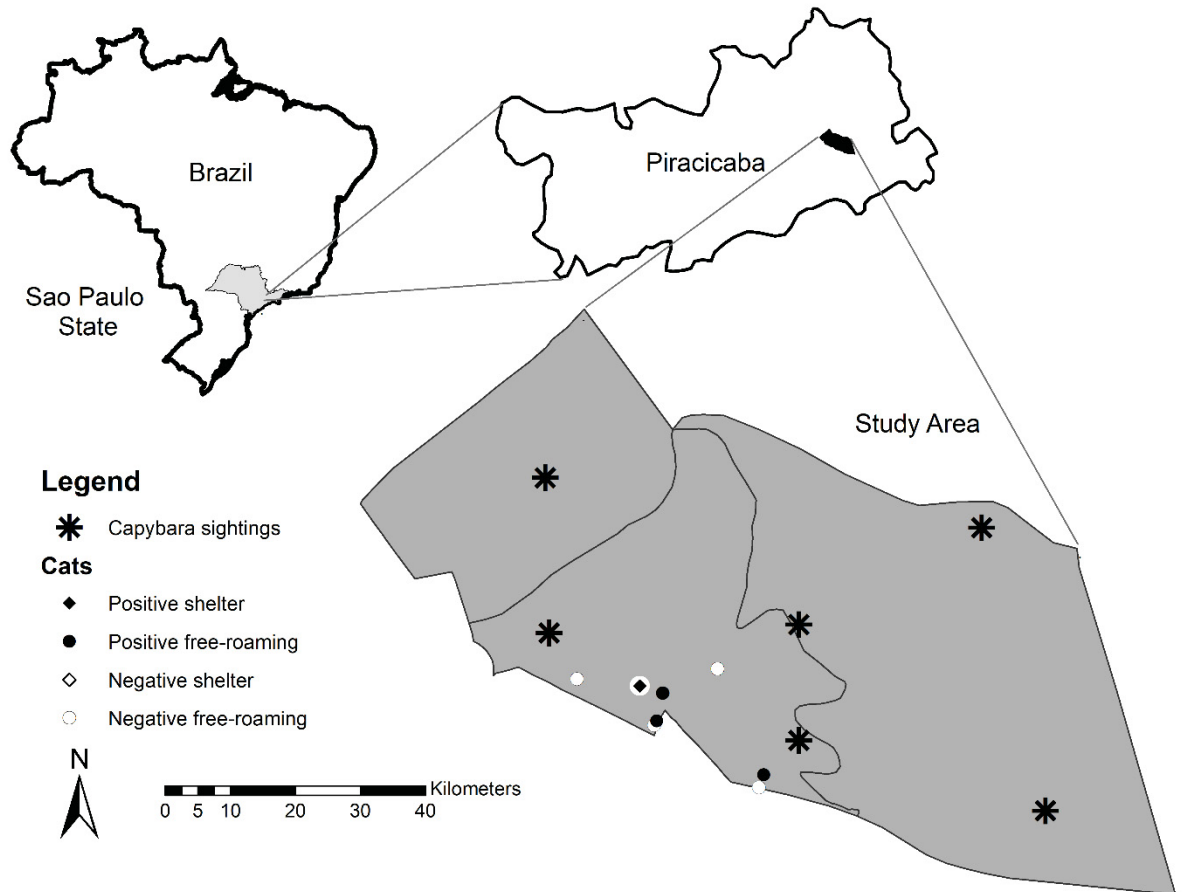
Table 3. Risk factors association among living status, age, sex and sterilization with *Rickettsia* seropositivity frequency of animals and groups (shelter and free-roaming), sampled at the University of São Paulo at Piracicaba city, "Luiz de Queiroz" School of Agriculture (ESALQ-USP) from July to October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

Cats	<i>Rickettsia</i> frequency (%)				p
	Positive	Total	Odds Ratio		
Living status					
Free-roaming	5 (31.2)	16 (100.0)	0.2 (0.07-0.84)	0.03	
Shelter	23 (65.7)	35 (100.0)			
Age					
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)			
Sex					
Male	14 (56.0)	25 (100.0)	1.1 (0.36-3.29)	1.00	
Female	14 (53.8)	26 (100.0)			
Sterilization					
Intact	10 (50.0)	20 (100.0)	0.72 (0.23-2.24)	0.77	

		<i>Rickettsia</i> frequency (%)			
Neutered	18 (58.1)	31 (100.0)			
Groups	Positive	Total	Odds Ratio	p	
Age					
<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)			
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)	
<i>Sterilization</i>			
<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)	

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.



ANEXO 1 - CEUA ESALQ/USP



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
Fone: (19) 3429-4400
www4.esalq.usp.br – ceua.esalq@usp.br

TERMO DE CONSENTIMENTO

Título do projeto: Detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* spp em gatos abandonados em Campus universitário dentro da área endêmica de Febre Maculosa Brasileira.

Nome do pesquisador principal: Alexander Welker Biondo.

Razão social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

Nome da Instituição: Universidade Federal do Paraná - Setor de Ciências

Agrárias 1) Objetivos do estudo:

- Avaliar a interação entre o principal hospedeiro amplificador e a população de gatos que habita campus da Universidade de São Paulo – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP-ESALQ) a fim de elucidar o seu papel no ciclo epidemiológico da doença na região.
- Detectar anticorpos anti-*Rickettsia* spp nos gatos residentes na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP-ESALQ) através de Imunofluorescência Indireta (RIFI); - Coletar e realizar a análise taxonômica dos carrapatos presentes em gatos residentes na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP-ESALQ).
- Avaliar a carga parasitária e identificar os carrapatos e pulgas em gatos residentes na Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP-ESALQ).



Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA
 Fone: (19) 3429-4400
 www4.esalq.usp.br – ceua.esalq@usp.br

2) Procedimentos a serem realizados com os animais:

- Extração de Materiais Biológicos

Material biológico:	Sangue
Quantidade de amostra:	5 ml de sangue
Frequência:	1 vez por mês
Método de coleta:	Punção veia jugular

3) Potenciais riscos para os animais: sem riscos

4) Benefícios:

Serão levantados os dados epidemiológicos dos animais mantidos no abrigo, tais como: nascimento em cativeiro, data de entrada no abrigo, local onde o animal foi encontrado, histórico de doença/sinal clínico anterior à entrada no abrigo entre outros, em fichas epidemiológicas para determinar se existe associação entre a doença e o fator de risco.

DECLARAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Escola de Agricultura “Luiz de Queiroz” (CEUA/ESALQ), em sua Reunião Ordinária realizada em 20 de fevereiro de 2018, aprovou o projeto acima citado e está de acordo com a sua realização neste Campus.

Piracicaba - SP, 09/03/2018.

Prof. Dr. Urbano dos Santos Ruiz
 Coordenador da CEUA/ESALQ

ANEXO 2 - CEUA UFPR



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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo número 103/2017, referente ao projeto “**Detecção de anticorpos anti-Rickettsia spp em gatos abandonados em Campus universitário dentro de área endêmica de Febre Maculosa Brasileira**”, 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 04/12/2017.

Vigência do projeto	Dezembro/2017 até Julho/2018
Espécie/Linhagem	<i>Felis catus</i> (gato)
Número de animais	148
Peso/Idade	3 kg / 3 meses a 5 anos
Sexo	Não verificado
Origem	Campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP-ESALQ) em Piracicaba, São Paulo

*A aprovação por esta Comissão de Ética no Uso de Animais não substitui a aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (USP-ESALQ), Piracicaba, São Paulo, como previsto no Artigo 6, Parágrafo II da Resolução Normativa CONCEA n. 1, de 9 de julho de 2010:

Compete ao CEUA:

II - examinar previamente os protocolos experimentais ou pedagógicos aplicáveis aos procedimentos de ensino e de projetos de pesquisa científica **a serem realizados na instituição à qual esteja vinculada**, para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;

CERTIFICATE

We certify that the protocol number 103/2017, regarding the project “**Anti-rickettsial antibodies detection in abandoned cats in University Campus located in a Brazilian Spotted Fever-endemic area**” 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 GRICULTURAL SCIENCES CAMPUS OF THE UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ (Federal University of the State of Paraná, Brazil), with degree 1 of invasiveness, in session of 12/04/2017.

Duration of the project	December/2017 until July/2018
Specie/Line	<i>Felis catus</i> (cat)
Number of animals	148
Wheight/Age	3 kg / 3 months to 5 years
Sex	Not verified
Origin	Campus of the "Luiz de Queiroz" School of Agriculture (USP-ESALQ) in Piracicaba, São Paulo

* The approval by this Ethics Committee in the Use of Animals does not replace the approval of the Animal Use Ethics Committee of the College of Agriculture “Luiz de Queiroz” (USP-ESALQ), Piracicaba, São Paulo, as provided in Article 6, Paragraph II of the CONCEA Normative Resolution n. 1, of July 9, 2010:

Article 6. The CEUA is responsible for:

II - to examine in advance the experimental or pedagogical protocols applicable to teaching procedures and scientific research projects to be carried out in the institution to which it is linked, in order to determine their compatibility with the applicable legislation;

Curitiba, 4 de dezembro de 2017.

Chayane da Rocha

Chayane da Rocha

Coordenadora CEUA-SCA