

DANILO GONÇALVES SARAIVA

Tempo mínimo de parasitismo de carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados, para que ocorra a transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira, para hospedeiros vertebrados

São Paulo
2012

DANILO GONÇALVES SARAIVA

Tempo mínimo de parasitismo de carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados, para que ocorra a transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira, para hospedeiros vertebrados

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo
2012

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2663
FMVZ

Saraiva, Danilo Gonçalves

Tempo mínimo de parasitismo de carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados, para que ocorra a transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira, para hospedeiros vertebrados / Danilo Gonçalves Saraiva. -- 2012.
79 f., il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Amblyomma aureolatum*. 2. Carrapato. 3. Febre Maculosa Brasileira.
4. *Rickettsia rickettsii*. I. Título.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO



FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Avaliação do tempo mínimo de parasitismo de carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados, para que ocorra a transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa, para hospedeiros vertebrados”, protocolado sob o nº 2415/2011, utilizando 42 (quarenta e dois) cobaios, sob a responsabilidade do(a) Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da “Comissão de Ética no uso de animais” da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 26/10/2011.

We certify that the Research “Evaluation of the minimum time of parasitism for infected ticks *Amblyomma aureolatum* to transmit *Rickettsia rickettsii*, the etiologic agent of spotted fever, to vertebrate hosts”, protocol number 2415/2011, utilizing 42 (forty two) guinea pigs, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by “Ethic Committee in the use of animals” of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 10/26/2011.

São Paulo, 27 de outubro de 2011.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: SARAIVA, Danilo Gonçalves

Título: Tempo mínimo de parasitismo de carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados, para que ocorra a transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira, para hospedeiros vertebrados

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

Data: ___/___/___

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Dedico esse trabalho à vida, às plantas, aos animais e à natureza em si, que sempre me deram inspiração, me despertaram curiosidade e me proporcionaram incontáveis emoções.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Paulo e Marilda, por sempre me incentivarem nos estudos, por terem me apoiado emocionalmente e financeiramente nessa fase, e acreditarem que no final, tudo dá certo.

Aos meus irmãos, Samuel e Mariana, pelo carinho e pelo orgulho que demonstram sentir por mim.

Ao meu orientador, Marcelo Bahia Labruna, pelos ensinamentos e experiência que espero carregar por toda a vida.

Ao Bruno, por me acompanhar e ajudar em todos os momentos desse novo ciclo das nossas vidas.

Aos meus amigos de Belo Horizonte: Léo, Filipe, Lorena, Rodrigo, Vini 1, Gabi, Vini 2, Bárbara, Bê, Grazi, e todos os outros componentes da “turminha”, sempre presentes, me carregando da energia necessária para seguir.

Aos amigos Gislene “Magrão”, Jeff, Vanessa Figueiredo, Maria Ogrzewalska, Adriano “Marmota”, Ricardo Dias e Marcos “Piau”, por terem sido mais do que importantes para mim em São Paulo, me fazendo sentir em casa, mesmo que distante.

Aos amigos carrapatólogos e afins, Amália, Herbert, João, Fernanda, Tati, Diego, Ricardo, Jonas, Thiago, Chico, Felipe, Mariana, Carlos, Arlei, Júlia, Igor, Andréa. A vocês e todos os outros que sempre vêm e vão, obrigado pelos momentos incríveis e inesquecíveis que passamos juntos.

Aos amigos dos laboratórios vizinhos (LABMAS, LEB, LSLV), por formarem uma família querida, na qual sempre sentirei saudade.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da USP, por sempre terem sido gentis, prestativos e por formarem um grupo extremamente competente.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio TT3 no primeiro ano e no primeiro semestre do segundo ano de mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de mestrado no segundo semestre do segundo ano dos meus estudos.

A todas as pessoas que me ajudaram nos experimentos, seja colando câmaras de infestação, colhendo sangue dos animais, observando a fixação dos carrapatos ou torcendo para que esses se fixassem antes da madrugada.

A todos os animais utilizados em meus experimentos, que involuntariamente, cederam seu sangue ou sua vida, dedico o meu profundo respeito.

RESUMO

SARAIVA, D. G. **Tempo mínimo de parasitismo de carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados, para que ocorra a transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira, para hospedeiros vertebrados.** [Minimum feeding period of *Rickettsia rickettsii*-infected *Amblyomma aureolatum* to transmit the *Rickettsia* to vertebrate hosts]. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Rickettsia rickettsii é uma bactéria Gram-negativa, intra-celular obrigatória, causadora de uma grave riquetsiose em humanos, chamada no Brasil de Febre Maculosa Brasileira (FMB). Os carrapatos vetores de *R. rickettsii* para humanos, conhecidos até o momento no Brasil são *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum*. O presente estudo avaliou o tempo mínimo de parasitismo de *A. aureolatum* (ninfas não-alimentadas, machos adultos em jejum e pré-alimentados), infectadas por *R. rickettsii*, para que ocorra a transmissão da bactéria para o hospedeiro vertebrado. Para a produção de ninfas infectadas, foi mantida uma colônia de carrapatos em laboratório, infectados por *R. rickettsii* através de infestação em cobaias (*Cavia porcellus*) inoculadas por essa bactéria (Cepa Taiacu). Para os experimentos com as ninfas de *A. aureolatum*, dividiram-se as cobaias em dez grupos de duas, sendo essas infestadas com dez ninfas cada uma. Após 2 horas da infestação (fixação da primeira ninfa), o primeiro grupo (G1) teve todas suas ninfas removidas. Após 4 horas de infestação, um segundo grupo (G2) de cobaias teve todas suas ninfas removidas de forma semelhante. Este procedimento foi repetido com os demais grupos, cada um em um determinado número de horas após a infestação: após 6 (G3), 8 (G4), 12 (G5), 18 (G6), 24 (G7), 36 (G8) e 48 (G9) horas. Para um último grupo (G10), as ninfas foram deixadas em parasitismo até seu desprendimento natural (cerca de 10 dias). Os experimentos realizados com carrapatos machos adultos em jejum seguiram os mesmos períodos utilizados para as ninfas, para fixação e retirada de carrapatos, assim como o número de cobaias. Nos experimentos com carrapatos machos adultos previamente alimentados - 48 horas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*), utilizaram-se os períodos de fixação e retirada de carrapatos idênticos aos experimentos anteriores, e além desses foi

necessária a utilização de períodos menores de fixação de *A. aureolatum*, variando entre um minuto e uma hora. As cobaias foram avaliadas clinicamente todos os dias, e sacrificadas 21 dias após a infestação. Amostras de sangue foram colhidas e testadas para presença de anticorpos anti-*R. rickettsii*. Carrapatos retirados das cobaias de todos os grupos foram testados por PCR, a fim de se certificar que estavam infectados por *R. rickettsii*. De acordo com os resultados obtidos, ninfas não alimentadas de carrapatos *A. aureolatum*, infectados por *R. rickettsii*, necessitam realizar o repasto sanguíneo por um período mínimo de 12 horas, para que ocorra a transmissão da bactéria ao hospedeiro vertebrado; carrapatos adultos não alimentados, infectados por *R. rickettsii*, necessitam realizar o repasto sanguíneo por um período mínimo de 10 horas, para que ocorra a transmissão da bactéria ao hospedeiro vertebrado; e carrapatos adultos infectados por *R. rickettsii* e pré-alimentados em coelhos por 48 horas, necessitam realizar o repasto sanguíneo por um período mínimo de 10 minutos, para que ocorra a transmissão da bactéria ao hospedeiro vertebrado, utilizando-se cobaias como modelo experimental.

Palavras-chave: *Amblyomma aureolatum*. Carrapato. Febre Maculosa Brasileira. *Rickettsia rickettsii*.

ABSTRACT

SARAIVA, D. G. **Minimum feeding period of *Rickettsia rickettsii*-infected *Amblyomma aureolatum* ticks to transmit the bacterium to vertebrate hosts.** [Tempo mínimo de parasitismo de carrapatos *Amblyomma aureolatum* infectados, para que ocorra a transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira, para hospedeiros vertebrados.]. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Rickettsia rickettsii is the causative agent of the most severe rickettsiosis, known in Brazil as Brazilian Spotted Fever (BSF). Tick vectors of *R. rickettsii* to humans in Brazil are *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma aureolatum*. The present study determined the minimum feeding period required for *A. aureolatum*-infected unfed nymphs, unfed adults, and fed adults to transmit infective forms of *R. rickettsii* to naïve guinea pigs. For this purpose, we used nymphs and adults of a laboratory colony of *A. aureolatum*, previously shown to be 100% infected by *R. rickettsii* strain Taiacu. Infected nymphs were allowed to infest 10 groups of hosts, each containing 2 guinea pigs, with each individual guinea pig receiving 10 infected. After two hours of parasitism (counting from the moment when the first infected nymph attached to the skin), this group had all infected nymphs manually removed and saved for further molecular analysis. After 4 hours of infection, guinea pigs of a second group had all their nymphs similarly removed. This procedure was repeated with the other groups, each at a given number of hours after infestation: 6, 8, 12, 18, 24, 36, and 48h. For an additional group, nymphs were allowed to complete feeding period (96-120h). In another experiment, this whole procedure was performed with adult ticks, being one infected male tick per naïve guinea pig. In a third experiment, adult male ticks were pre-fed on rabbits for 48h before allowing to feed on naïve guinea pigs for 1, 3, 5, 10, 20, 40 or 60 minutes, and then for 2 to >48h. Clinical signs and rectal temperature were evaluated daily in each guinea. Blood samples were collected at 21 days after infestation, and tested for presence of anti-*R. rickettsii* antibodies. All removed ticks in all groups showed to contain rickettsial DNA by PCR. According to the results, unfed nymphs of *R. rickettsii*-infected *A. aureolatum* ticks must feed for a minimum of 12 hours to transmit the bacterium to the vertebrate host; unfed *R. rickettsii*-infected adult ticks must feed for a minimum of 10 hours for transmission to occur, while

previously fed adult ticks must feed for a minimum of 10 minutes to transmit *R. rickettsii* to vertebrate hosts, using guinea pigs as experimental model.

Key-words: *Amblyomma aureolatum*. Tick. Brazilian Spotted Fever. *Rickettsia rickettsii*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - A) Pavilhão auricular de cão naturalmente infestado por *A. aureolatum*, no município de São Bernardo do Campo (SP); B) Fêmea em processo de oviposição no laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP32
- Figura 2 - A) Modelo utilizado para definição do início da fixação do carrapato no hospedeiro; B) coelho preparado para infestação de *A. aureolatum*; C) Macho de *A. aureolatum* fixado em cobaia, com o hipostômio inserido no hospedeiro, e os palpos em um ângulo mais que 45°; D) *A. aureolatum* fixado na cobaia, circundado com caneta atóxica, no momento da retirada da cobaia38
- Figura 3 - A e B) Câmaras de infestação instaladas no dorso de cobaias, com cola específica para tecido animal; C) Colheita de sangue das cobaias por via intracardíaca, D) Etapa da técnica de RIFI: lavagem das lâminas de antígeno específico com PBS, para detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii*.....41
- Figura 4 - A e B) Detecção do gene citrato sintase, amplificado em gel de aga-rose, nas ninfas de *A. aureolatum* infestadas em cobaias. Bandas positivas, com 401 pares de base, representam carrapatos infectados por *R. rickettsii*. Apenas as ninfas fixadas nos hospedeiros foram utilizadas; C) Necrose escrotal (seta) em cobaias infectadas por *R. rickettsii*, D) Extremidade das orelhas já em início de necrose (setas).....52
- Figura 5 - A) Detecção do gene citrato sintase, amplificado em gel de agarose, parte dos machos adultos de *A. aureolatum* (GAA8A – GAA14B), pré-alimentados em coelhos por 48 horas e infestados em cobaias. As bandas que aparecem positivas, com 401 pares de base, representam carrapatos infetados por *R. rickettsii*; B) Microscopia óptica de imunofluorescência indireta (RIFI) de cobaia (GAA7-B), com titulação positiva na diluição de 1:8192, frente aos anticorpos anti-*R. rickettsii*59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição do tempo em que as ninfas de <i>A. aureolatum</i> permaneceram fixadas nas cobaias (GN1 – GN13), número de ninfas encontradas fixadas ao final do tempo determinado, e temperatura inicial das cobaias	48
Tabela 2 - Temperatura das cobaias infestadas por ninfas de <i>A. aureolatum</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> , retirados em tempos diferenciados (GN1-A –GN6-D), durante 21 dias de monitoramento.....	49
Tabela 3 - Temperatura das cobaias infestadas por ninfas de <i>A. aureolatum</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> , retirados em tempos diferenciados (GN7-A – GN13-B), durante 21 dias de monitoramento.....	50
Tabela 4 - Período de fixação de ninfas de <i>A. aureolatum</i> em cobaias, títulos de anticorpos para as esses hospedeiros 21 dias pós-infestação, diagnosticadas através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), e sinais clínicos apresentados pelos animais.....	53
Tabela 5 - Temperatura das cobaias infestadas por machos adultos não-alimentados de <i>A. aureolatum</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> , retirados em tempos diferenciados (GAJ1-A – GAJ6-A), durante 21 dias de monitoramento.....	55
Tabela 6 - Temperatura das cobaias infestadas por machos adultos não-alimentados de <i>A. aureolatum</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> , retirados em tempos diferenciados (GAJ6-B – GAJ11-B), durante 21 dias de monitoramento.....	56
Tabela 7 - Período de fixação de machos adultos não-alimentados de <i>A. aureolatum</i> em cobaias, títulos de anticorpos para as esses hospedeiros 21 dias pós-infestação, diagnosticadas através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), e sinais clínicos apresentados pelos animais.....	57
Tabela 8 - Temperatura corporal de coelhos alimentados por <i>A. aureolatum</i> infectados com <i>R. rickettsii</i> durante 21 dias de monitoramento	58
Tabela 9 - Temperatura das cobaias infestadas por machos adultos pré-alimentados de <i>A. aureolatum</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> , retirados	

em tempos diferenciados (GAA1-A – GAA9-A), durante 21 dias de monitoramento	61
Tabela 10 - Temperatura das cobaias infestadas por machos adultos pré-alimentados de <i>A. aureolatum</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> , retirados em tempos diferenciados (GAA9-B – GAA17-B), durante 21 dias de monitoramento	62
Tabela 11 - Período de fixação de machos adultos pré-alimentados de <i>A. aureolatum</i> em cobaias, títulos de anticorpos para as esses hospedeiros 21 dias pós-infestação, diagnosticadas através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), e sinais clínicos apresentados pelos animais	63

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Tempo de fixação de ninfas (<i>A. aureolatum</i>) não-alimentadas, infectadas por <i>R. rickettsii</i> , em cobaias (<i>C. porcellus</i>)	35
Quadro 2 - Tempo de fixação de adultos (<i>A. aureolatum</i>) não-alimentados, infectados por <i>R. rickettsii</i> , em cobaias (<i>C. porcellus</i>)	36
Quadro 3 - Tempo de fixação de adultos (<i>A. aureolatum</i>) pré-alimentados, infectados por <i>R. rickettsii</i> , em cobaias (<i>C. porcellus</i>)	39
Quadro 4 - Primers utilizados nas reações da PCR para a detecção de bactérias do gênero <i>Rickettsia</i> em ninfas e adultos de <i>A. aureolatum</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	23
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	31
3.1	OBTENÇÃO DE CARRAPATOS NÃO-INFECTADOS	31
3.2	INOCULAÇÃO DE COBAIAS COM <i>R. RICKETTSII</i>	32
3.3	INFESTAÇÃO COM LARVAS E OBTENÇÃO DE NINFAS INFECTADAS	33
3.4	DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE NINFAS DE <i>A. AUREOLATUM</i> NÃO-ALIMENTADAS PARA TRANSMISSÃO DE <i>R.</i> <i>RICKETTSII</i> PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO	34
3.5	DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE ADULTOS DE <i>A. AUREOLATUM</i> NÃO-ALIMENTADOS PARA TRANSMISSÃO DE <i>R.</i> <i>RICKETTSII</i> PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO	35
3.6	DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE ADULTOS DE <i>A. AUREOLATUM</i> PRÉ-ALIMENTADOS PARA TRANSMISSÃO DE <i>R.</i> <i>RICKETTSII</i> PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO	36
3.7	SOROLOGIA DAS COBAIAS PARA <i>R. RICKETTSII</i>	39
3.8	AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS INFESTADOS	42
3.9	EXTRAÇÃO DE DNA.....	42
3.10	REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)	43
3.11	ELETROFORESE.....	44
3.12	ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	44
4	RESULTADOS	47
4.1	DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE NINFAS DE <i>A. AUREOLATUM</i> NÃO-ALIMENTADAS PARA TRANSMISSÃO DE <i>R.</i> <i>RICKETTSII</i> PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO	47
4.2	DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE ADULTOS DE <i>A. AUREOLATUM</i> NÃO-ALIMENTADOS PARA TRANSMISSÃO DE <i>R.</i> <i>RICKETTSII</i> PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO	54
4.3	DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE ADULTOS DE <i>A. AUREOLATUM</i> PRÉ-ALIMENTADOS PARA TRANSMISSÃO DE <i>R.</i> <i>RICKETTSII</i> PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO	57

5	DISCUSSÃO	65
5.1	FIXAÇÃO DOS CARRAPATOS NAS COBAIAS	65
5.2	TEMPO NECESSÁRIO PARA TRANSMISSÃO DE <i>R. RICKETTSII</i> EM NINFAS E ADULTOS DE <i>A. AUREOLATUM</i>	66
5.3	SINTOMATOLOGIA DAS COBAIAS INFECTADAS EM DIFERENTES TEMPOS DE FIXAÇÃO	68
5.4	RELAÇÃO DOS RESULTADOS COM A EPIDEMIOLOGIA DE <i>R. RICKETTSII</i> EM <i>A. AUREOLATUM</i> EM SÃO PAULO.....	69
6	CONCLUSÃO	71
	REFERÊNCIAS	73

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Carrapatos são invertebrados pertencentes à Subclasse Acari, sendo ectoparasitos obrigatórios e especializados que se alimentam de sangue, linfa e tecidos digeridos (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008). Podem utilizar como hospedeiros a maioria dos grupos de animais vertebrados – mamíferos, aves, répteis e anfíbios (KEIRANS; DURDEN, 2005). Há cerca de 900 espécies de carrapatos, agrupadas em uma única subordem – Ixodida, que se divide em três famílias – Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae (BARROS-BATTESTI; ARZUA; BECHARA, 2006). As espécies de carrapatos encontram-se dispersas na maioria dos continentes e habitam ecossistemas variados, podendo transmitir uma grande variedade de microorganismos patogênicos, entre eles vírus, bactérias, protozoários e helmintos. Dessa forma, os carrapatos possuem grande importância como vetores de patógenos, afetando animais de produção, animais de companhia e humanos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

A forma de alimentação dos carrapatos, na maioria das espécies através da sua fixação no hospedeiro vertebrado por um período determinado, aumenta a sua capacidade de dispersão no ambiente. A exemplo desse mecanismo, algumas espécies de carrapatos podem ser transportadas de um continente para outro por aves migratórias (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008, ELFVING et al., 2010).

Para que um carrapato seja considerado vetor de uma espécie de patógeno, é necessário que esse adquira o microorganismo através do repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, consiga manter esse patógeno no organismo por um ou mais estágios de vida, e possua a capacidade de transmitir esse patógeno para outros hospedeiros não infectados, através de posteriores repastos sanguíneos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Relações mais próximas entre carrapatos e microorganismos patogênicos podem ser caracterizadas por uma eficiente multiplicação desses no organismo do vetor, a conservação desses parasitos nos períodos de dormência do carrapato, transmissão transovariana e perpetuação transtadial eficientes, assim como uma distribuição ecológica e geográfica extensa (HAYES; BURGDORFER, 1982; AZAD; BEARD, 1998).

Dentre as bactérias transmitidas por carrapatos, encontram-se vários gêneros pertencentes à Ordem Rickettsiales, com um grande número de espécies que possuem importância epidemiológica. Dentre esses gêneros, podemos citar *Rickettsia* e *Orientia*, da Família Rickettsiaceae; *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Wolbachia* e *Neorickettsia*, da Família Anaplasmataceae (DUMLER et al., 2001). Doenças transmitidas por essas bactérias são amplamente distribuídas pelo mundo, com freqüentes epidemias, surtos e reemergências em populações humanas (AZAD; BEARD, 1998).

Rickettsia rickettsii é uma bactéria Gram-negativa, intracelular obrigatória, intimamente associada com carrapatos da família Ixodidae. Nesses vetores, a bactéria ocupa células de diferentes tecidos, se espalhando sistematicamente, atingindo os ovários e glândulas salivares (MCDADE; NEWHOUSE, 1986). Nos hospedeiros vertebrados, que são infectados a partir da picada do carrapato vetor, *R. rickettsii* se desenvolve em células endoteliais (RICKETTS, 1906; MCDADE; NEWHOUSE, 1986; RAOULT; ROUX, 1997).

Tanto nos carrapatos como nos hospedeiros vertebrados, *R. rickettsii* entra nas células por endocitose e se liberta do fagossomo através da polimerização da actina presente na membrana dessa organela, alojando-se livremente no citoplasma. A desorganização na membrana plasmática ocorre também no citoesqueleto da célula, permitindo que as bactérias saiam desta. Dessa forma, as células dos hospedeiros e vetores não perdem sua atividade metabólica, nem sofrem lise pela multiplicação das bactérias em seu citoplasma, podendo, porém, sofrer apoptose devido às modificações estruturais que ocorrem com a formação dos filamentos de actina (MUNDERLOH et al., 1998).

R. rickettsii é causadora da mais importante zoonose transmitida por carrapatos da América Latina, chamada no Brasil de Febre Maculosa Brasileira (FMB) ou febre do carrapato (LABRUNA, 2009). A FMB ocorre na América do Norte (EUA, Canadá e México), América Central (Panamá e Costa Rica) e América do Sul (Brasil, Colômbia e Argentina) (RAOULT; ROUX, 1997; LABRUNA et al., 2011a).

Uma vez transmitido pelo carrapato para humanos, o período médio de incubação da FMB é de sete dias, geralmente. Os sintomas clássicos são febre alta (39,5 a 40°C), cefaléia, mialgia, dor abdominal e aparecimento de manchas na pele, que dão origem ao nome da enfermidade no Brasil, Estados Unidos (Rocky Mountain Spotted Fever) e México (Fiebre Manchada). A letalidade em casos não

tratados com antibióticos específicos (principalmente tetraciclinas e cloranfenicol) pode chegar a mais de 80% (GALVÃO, 1996). No estado de São Paulo, a letalidade tem estado ao redor de 35-40% nos últimos 20 anos. A grande quantidade de casos não tratados se deve, principalmente, à carência de um diagnóstico cuidadoso, já que a maioria dos sintomas é comum a diversas outras doenças (RAOULT; ROUX, 1997; WU et al., 2005).

Os carrapatos vetores de *R. rickettsii* para humanos, conhecidos até o momento, são: *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus* nos Estados Unidos (DEMMA et al., 2005); *R. sanguineus* e *Amblyomma cajennense* no México (BUSTAMANTE; VARELA, 1947); *A. cajennense* no Panamá, Colômbia e Argentina (PATINO-CAMARGO, 1941; RODANICHE, 1953; PADDOCK et al., 2008); e *A. cajennense* e *Amblyomma aureolatum* no Brasil (GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006; LABRUNA, 2009).

Achados de carrapatos naturalmente infectados por *R. rickettsii* no Brasil incluem *A. cajennense* nos estados de São Paulo e Minas Gerais (MOREIRA; MAGALHÃES, 1935; DIAS et al., 1937; VALLEJO-FREIRE, 1946; GUEDES et al., 2005), *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* na região da Grande São Paulo, estado de São Paulo (GOMES, 1933; PINTER; LABRUNA, 2006; MORAES-FILHO et al., 2008; OGRZEWALSKA et al., 2012), e *R. sanguineus* nos Estados do Rio de Janeiro (CUNHA et al., 2009; GEHRKE et al., 2009) e Minas Gerais (PACHECO et al., 2011). Destes, apenas *A. cajennense* e *A. aureolatum* têm sido incriminados como vetores para humanos, sendo a primeira espécie a mais comum na região Sudeste, e a segunda relacionada à transmissão do agente etiológico na região Metropolitana de São Paulo.

O carrapato *Amblyomma aureolatum* é uma das 29 espécies do gênero que ocorrem no Brasil. Este ectoparasito habita regiões de Floresta Atlântica do sudeste do país, sendo encontrado também no nordeste da Argentina, Guiana Francesa, leste do Paraguai, Suriname e Uruguai. Para sua sobrevivência no ambiente, necessita de umidade alta (acima de 95%) e temperaturas amenas (entre 23 e 27°C), típicas de sua área de distribuição (PINTER et al., 2004). Os principais hospedeiros da fase adulta de *A. aureolatum* são carnívoros silvestres, entre eles, canídeos como o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e a raposinha (*Lycalopex vetulus*); e procionídeos, como o mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) (LABRUNA et

al., 2005; RODRIGUES et al., 2002; GUGLIELMONE et al., 2003). As formas imaturas de *A. aureolatum* são, comumente, encontradas em aves silvestres e, esporadicamente, em mamíferos de pequeno porte, como roedores e marsupiais (GUIMARÃES et al., 2001; GUGLIELMONE et al., 2003; OGRZEWALSKA et al., 2012).

Em áreas rurais ou periurbanas localizadas próximas a fragmentos de matas com ocorrência de *A. aureolatum*, sua forma adulta parasita principalmente cães domésticos (FONSECA, 1935; EVANS; MARTINS; GUGLIELMONE, 2000; RODRIGUES et al., 2002; GUGLIELMONE et al., 2003). Devido à baixa abundância de carnívoros silvestres em matas secundárias de pequeno porte, e o frequente acesso de cães em seu interior, esses hospedeiros se tornam muito importantes como carreadores de carrapatos adultos para áreas domiciliares, sendo a principal forma de contato desses ectoparasitos com os seres humanos (PINTER et al., 2004; OGRZEWALSKA et al., 2012).

Amblyomma aureolatum é o vetor responsável pela transmissão de *R. rickettsii* para humanos na região da Grande São Paulo. Apesar do primeiro isolamento de *R. rickettsii* em carrapatos no Brasil ter ocorrido de um espécime de *A. aureolatum* colhido de um cão na cidade de São Paulo (GOMES, 1933), este carrapato ficou praticamente esquecido como vetor de *R. rickettsii*, até trabalhos recentes que voltaram a incriminá-lo com evidências convincentes (PINTER et al., 2004; PINTER; LABRUNA, 2006; PINTER et al., 2008; OGRZEWALSKA et al., 2012). Estudos de LABRUNA et al. (2011b) observaram que *R. rickettsii* é preservada por perpetuação transestadial e transmissão transovariana em 100% dos carrapatos infectados.

Tanto no Brasil como na América do Norte, considera-se que a *R. rickettsii* mantém seu ciclo vital na natureza, entre o carrapato vetor e algumas espécies de vertebrados, ditos hospedeiros amplificadores (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988; LABRUNA, 2009). Para que um hospedeiro seja classificado como amplificador, deve possuir algumas características específicas: ocorrer em grande abundância nas áreas endêmicas para *R. rickettsii* e ser uma espécie prolífera, a fim de sempre haver animais suscetíveis à infecção por essa bactéria; ser um dos principais hospedeiros do carrapato vetor; ser suscetível à infecção por *R. rickettsii* e possuir um período de ricketsemia (no qual se encontram bactérias circulantes no sangue do hospedeiro) suficientemente longo e intenso, para que

mais carrapatos possam se alimentar e, conseqüentemente, se infectar nesse hospedeiro (LABRUNA, 2009).

Trabalhos recentes incriminaram capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e gambás-de-orelha-preta (*Didelphis aurita*) como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para *A. cajennense* no Brasil (HORTA et al., 2009; LABRUNA, 2009; SOUZA et al., 2009). Para *A. aureolatum*, suspeita-se que uma espécie de roedor da família Echimyidae, denominada *Euryzgomatomys spinosus*, seja amplificador de *R. rickettsii* em áreas endêmicas para a FMB, na região de São Paulo (LABRUNA, 2009). Porém, por ser uma espécie de hábitos fossoriais e difícil captura em armadilhas convencionais (BONVICINO; OLIVEIRA; D'ANDREA, 2008), não há dados que comprovem a eficiência desse roedor como amplificador da bactéria.

Durante o longo período entre uma fase de vida e outra, que a maioria dos carrapatos ixodídeos passa sem realizar repastos sanguíneos (podendo durar mais do que seis meses), seus microorganismos parasitos sofrem adaptações fisiológicas, necessárias para a sobrevivência destes no organismo do vetor. Essas adaptações podem ser mediadas por substâncias metabólicas formadas por hormônios do próprio hospedeiro invertebrado (GILFORD; PRICE, 1955). Tal fenômeno é relatado em diversos agentes patogênicos, entre eles *R. rickettsii*, *Borrelia burgdorferi* e *Babesia microti* (KATAVOLOS et al., 1998). Em *R. rickettsii* ocorrem mudanças estruturais em sua camada microcapsular e sua camada de muco, que fazem com que ela diminua suas atividades metabólicas (HAYES; BURGDORFER, 1982). O início da alimentação do carrapato, a ingestão de nutrientes, assim como o aumento de sua temperatura corporal devido à ingestão de sangue de hospedeiros endotérmicos (comprovadamente, mamíferos), fazem com que a bactéria se desenvolva, multiplique-se e volte ao seu estado patogênico. Esse fenômeno é denominado "Reativação" (SPENCER; PARKER, 1923; HAYES; BURGDORFER, 1982)

A reativação de patógenos transmitidos por carrapatos, ou sua replicação prévia, é conhecida para algumas espécies de vírus e bactérias. Em estudo realizado por Ebel e Kramer (2004) nos EUA, foi constatado que o vírus Powassan (*Flaviviridae*, *Flavivirus*) é transmitido, eficientemente, por ninfas do carrapato *Ixodes scapularis* em um período de 15 minutos. Também nos EUA, foi definido um tempo mínimo de 24 a 30 horas para a reativação e transmissão da bactéria *Ehrlichia phagocytophila*

(=*Anaplasma phagocytophilum*), agente causador da Anaplasmoze Granulocítica Humana (AGH), em carrapatos *Ixodes dammini* (= *Ixodes scapularis*) (KATAVOLOS; ARMSTRONG, 1998; VIGNES et al., 2001). Também para *I. scapularis*, foi observado um intervalo de tempo entre 36 e 48 horas para o estágio ninfal, e 48 horas para que fêmeas adultas transmitissem a bactéria causadora da Doença de Lyme, *Borrelia Burgdorferi*, de uma forma ativa (PIESMAN et al., 1991; PIESMAN, 1993), muito embora outros trabalhos observaram períodos superiores a 48 horas de fixação do carrapato (SOOD et al., 1997; VIGNES et al., 2001). Todos os trabalhos de reativação com *B. burgdorferi* foram realizados nos EUA.

Os primeiros estudos relacionados à reativação de *R. rickettsii* foram realizados por Ricketts (1909), Moore (1911), Spencer e Parker (1923), em carrapatos *Dermacentor andersoni*. De modo geral, a literatura atual da febre maculosa relata que um carrapato infectado por *R. rickettsii* necessita estar fixado de 2 a 8 horas sobre o hospedeiro, para que haja a transmissão efetiva da bactéria (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988; GALVÃO, 1996; VIEIRA et al., 2004). Esta informação parece ser derivada de trabalhos antigos, que avaliaram carrapatos *D. andersoni*, *Dermacentor venustus*, *Dermacentor modestus* e *Haemaphysalis leporispalustris* já alimentados, onde supostamente, a bactéria já se encontrava reativada (RICKETTS, 1909; SPENCER; PARKER, 1923). Em um desses trabalhos, Spencer e Parker (1923) sugeriram que carrapatos não alimentados das espécies *D. andersoni* e *H. leporispalustris* levam mais de 48 horas de parasitismo para transmitir *R. rickettsii*. Desta forma, faltam trabalhos que avaliem de forma comparativa a transmissão de *R. rickettsii* por carrapatos não alimentados e alimentados, sobretudo para vetores do gênero *Amblyomma* que ocorrem no Brasil. A aquisição desses dados de forma mais precisa se torna altamente relevante para o auxílio de órgãos de saúde, na realização de campanhas educativas relacionadas à febre maculosa brasileira, além de aumentar o conhecimento sobre a dinâmica de transmissão do agente e o seu ciclo epidemiológico nos vetores, hospedeiros e ambiente.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho possuiu os seguintes objetivos:

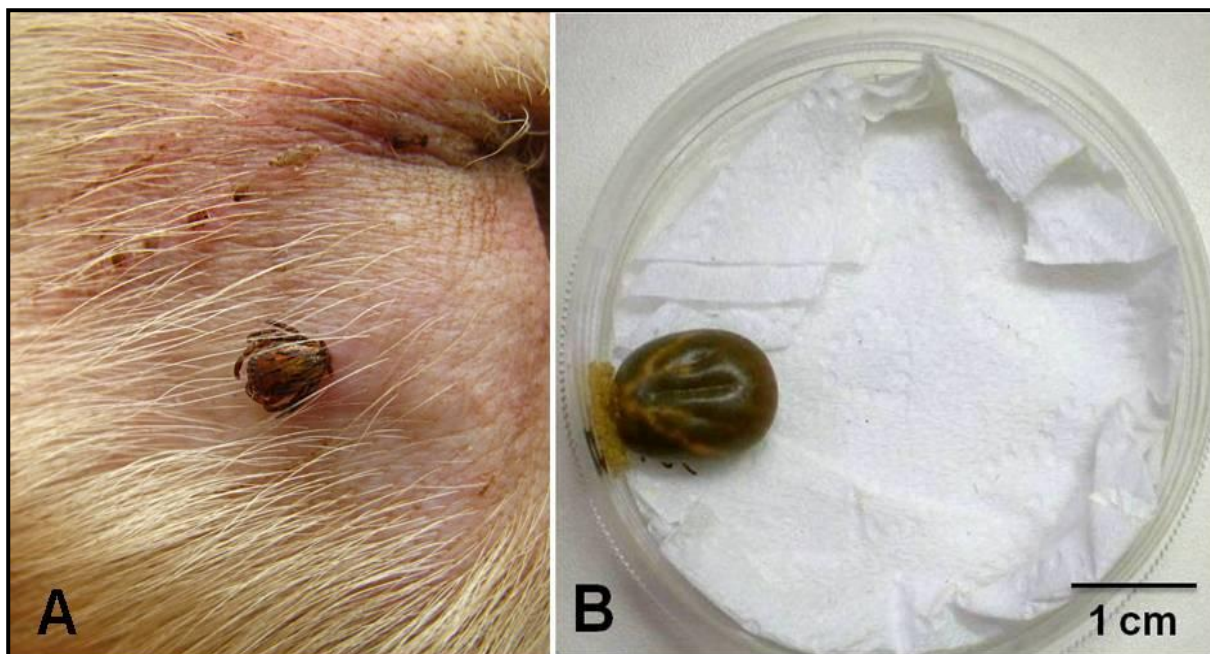
- Determinar o tempo mínimo de parasitismo de ninfas não-alimentadas de *A. aureolatum*, infectadas por *R. rickettsii*, para que ocorra a transmissão da bactéria para o hospedeiro vertebrado;
- Determinar o tempo mínimo de parasitismo de adultos não-alimentados de *A. aureolatum*, infectados por *R. rickettsii*, para que ocorra a transmissão da bactéria para o hospedeiro vertebrado;
- Determinar o tempo mínimo de parasitismo de adultos de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*, previamente alimentados, para que ocorra a transmissão da bactéria para o hospedeiro vertebrado.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP). Os procedimentos experimentais constaram das seguintes etapas:

3.1 OBTENÇÃO DE CARRAPATOS NÃO-INFECTADOS

Fêmeas ingurgitadas de *A. aureolatum* foram obtidas de cães naturalmente parasitados no município de São Bernardo do Campo (Longitude -46.56, Latitude -23.69), na região da Grande São Paulo (Figura 1A), sendo esta uma área endêmica para febre maculosa (OGRZEWALSKA et al., 2012). No laboratório, as fêmeas de *A. aureolatum* ingurgitadas foram acondicionadas em uma incubadora a 24°C e 95-100% de Umidade Relativa (UR) para oviposição e obtenção de larvas (Figura 1B). Ao final da postura, as fêmeas ainda vivas (quenóginas) foram processadas por PCR para detecção de DNA de *Rickettsia* spp. (protocolo descrito no item 3.9), e somente as larvas oriundas de fêmeas negativas na PCR foram utilizadas para iniciar as infestações com carrapatos neste estudo. As condições de temperatura e UR em que cada essa espécie de carrapato foi mantida, se devem às condições naturais em que esses carrapatos são encontrados no estado de São Paulo (PINTER et al., 2004). Desta forma, todas as etapas descritas a seguir para períodos não parasitários de *A. aureolatum* foram realizadas a 24°C e 95-100% de UR.

Figura 1 – Fixação e ovoposição do carrapato *A. aureolatum*

Legenda: A) Pavilhão auricular de cão naturalmente infestado por *A. aureolatum*, no município de São Bernardo do Campo (SP); B) Fêmea em processo de oviposição no laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP

3.2 INOCULAÇÃO DE COBAIAS COM *R. RICKETTSII*

Larvas da colônia de *A. aureolatum* foram inicialmente expostas à bactéria *R. rickettsii* através da alimentação em cobaias (*Cavia porcellus*) inoculadas com a cepa Taiacu de *R. rickettsii*, previamente isolada de carrapato *A. aureolatum* no município de Mogi das Cruzes, estado de São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006). Para tal, cada uma de cinco cobaias foi inoculada no dia zero, por via intraperitoneal, com 1 ml de suspensão de baço originário de uma cobaia previamente infectada por *R. rickettsii*, conforme descrito em outros estudos (HORTA et al., 2009, LABRUNA et al., 2008). Este inóculo correspondeu a uma linhagem da cepa Taiacu que vem sendo mantida exclusivamente por passagem em cobaias, sem nunca ter sido passada em cultivo celular, evitando desta forma, potenciais riscos de perda de infectividade para carrapatos, conforme pode acontecer para certas linhagens mantidas em cultivo *in vitro* por algum tempo (LABRUNA et al., 2008).

As cobaias são indicadas para experimentos de aquisição de infecção por *R. rickettsii* por representarem a espécie animal mais susceptível a *R. rickettsii* que se conhece (WEISS; MOULDER, 1984; MCDADE; NEWHOUSE, 1986). Além disso, estudos recentes mostraram que cerca de 100% das larvas de *A. aureolatum* se infectaram e mantiveram a infecção por *R. rickettsii* para os estágios subsequentes (perpetuação transestadial), quando essas larvas se alimentaram em cobaias experimentalmente infectadas com a cepa Taiaçu de *R. rickettsii* (LABRUNA et al. 2008; 2011).

3.3 INFESTAÇÃO COM LARVAS E OBTENÇÃO DE NINFAS INFECTADAS

Larvas não infectadas de *A. aureolatum*, nascidas das fêmeas coletadas conforme descrito no item 3.1, com 20 a 30 dias de idade, foram levadas a infestar as 5 cobaias (cerca de 1000 larvas por cobaia) descritas acima, no dia seguinte à inoculação com *R. rickettsii*. Cada infestação em cobaia foi realizada dentro de uma câmara de pano de algodão, colada ao dorso do animal (Figuras 3A/B), que foi previamente tricotomizado com tosquiador elétrico. A fixação da câmara foi realizada através de cola específica para tecido animal (Kamar heat detector adhesive, Kamar, Steamboat Springs, CO), conforme previamente descrito (LABRUNA et al. 2008). Os animais infestados foram mantidos em caixas individuais, com fita de dupla face (5 cm de largura) colada por toda a extremidade superior das quatro laterais, impedindo um eventual escape de carrapatos, caso houvesse abertura acidental da câmara de infestação.

As larvas ingurgitadas de *A. aureolatum* nessas cobaias foram recuperadas diariamente, quantificadas, e levadas à incubadora, onde foram observadas, até a ecdise das ninfas. A infecção dessas ninfas não alimentadas por *R. rickettsii* foi confirmada por PCR, conforme descrito abaixo no item 3.9.

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE NINFAS DE *A. AUREOLATUM* NÃO-ALIMENTADAS PARA TRANSMISSÃO DE *R. RICKETTSII* PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Ninfas infectadas de *A. aureolatum*, geradas a partir da alimentação de larvas em cobaias previamente inoculadas com *R. rickettsii*, foram utilizadas nesta etapa do estudo. Para tal, foram utilizados 13 grupos de cobaias, cada um composto por duas ou quatro cobaias, as quais foram infestadas com 10 ninfas por cobaia. As condições de infestação foram as mesmas descritas acima para larvas. Uma vez infestadas, as cobaias foram observadas nos minutos subsequentes. Assim que a primeira ninfa se fixava na cobaia, era iniciado o tempo de contagem de parasitismo de carrapato infectado no hospedeiro. Após 2 horas de fixação das ninfas, um grupo de duas cobaias (GN1) teve todas suas ninfas removidas, contadas e armazenadas em freezer a -80°C . Após 4 horas de infestação, um segundo grupo de cobaias (GN2) teve todas suas ninfas removidas de forma semelhante. Este procedimento foi repetido com os demais grupos, cada um em um determinado número de horas após a fixação da primeira ninfa, conforme descrito no quadro 1. Para um último grupo (GN13), as ninfas foram deixadas em parasitismo até seu desprendimento natural, ou seja, quando totalmente ingurgitadas.

As cobaias infestadas foram avaliadas clinicamente todos os dias, e sacrificadas 21 dias após a infestação. Amostras de soro sanguíneo foram colhidas e testadas para presença de anticorpos anti-*R. rickettsii*, conforme descrito no item 3.7. Das cobaias que morreram no período febril, antes de completar 21 dias pós-infestação, foram colhidas amostras de tecidos (pulmão e baço) para realização de PCR e detecção de DNA riquetsial nesse material (protocolo descrito no item 3.9). As ninfas retiradas das cobaias de todos os grupos foram descongeladas e testadas por PCR, a fim de se certificar que estavam infectadas por *R. rickettsii*.

Quadro 1 - Tempo de alimentação de ninfas de *Amblyomma aureolatum* infectadas por *Rickettsia rickettsii* em cobaias (*Cavia porcellus*)

GRUPO	TEMPO DE FIXAÇÃO (HORAS)	Nº COBAIAS
GN1	2	2
GN2	4	2
GN3	6	2
GN4	8	4
GN5	10	2
GN6	12	4
GN7	14	2
GN8	16	2
GN9	18	4
GN10	24	2
GN11	36	2
GN12	48	2
GN13	Natural (>48)	2

3.5 DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE ADULTOS DE *A. AUREOLATUM* NÃO-ALIMENTADOS PARA TRANSMISSÃO DE *R. RICKETTSII* PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Os carrapatos adultos utilizados neste estudo foram oriundos de ninfas infectadas, que adquiriram a infecção por *R. rickettsii* durante a alimentação larval descrita no item 3.3. Para esta etapa do estudo, machos adultos de *A. aureolatum* foram colocados pra se alimentar em cobaias de diferentes grupos avaliados (GAJ1 – GAJ10). Estes carrapatos foram observados, individualmente, até que se ocorresse sua fixação no hospedeiro. Imediatamente após a fixação, iniciou-se a contagem do tempo pré-determinado para cada grupo (Quadro 2). Uma vez atingido o tempo de alimentação pré-determinado, que variou de 2 a 48h, os carrapatos eram retirados manualmente e mantidos congelados a -80°C até serem processados por PCR, conforme descrito no item 3.9. Em um grupo adicional de cobaias (GAJ11), os carrapatos adultos foram deixados por 10 dias (240h), como forma de simular uma infestação natural.

Quadro 2 - Tempo de fixação de adultos machos (*A. aureolatum*) não-alimentados, infectados por *R. rickettsii*, em cobaias (*C. porcellus*)

GRUPO	TEMPO DE FIXAÇÃO (HORAS)	Nº COBAIAS
GAJ1	2	2
GAJ2	4	2
GAJ3	6	2
GAJ4	8	2
GAJ5	12	2
GAJ6	16	2
GAJ7	20	2
GAJ8	24	2
GAJ9	36	2
GAJ10	48	2
GAJ11	Natural (240)	2

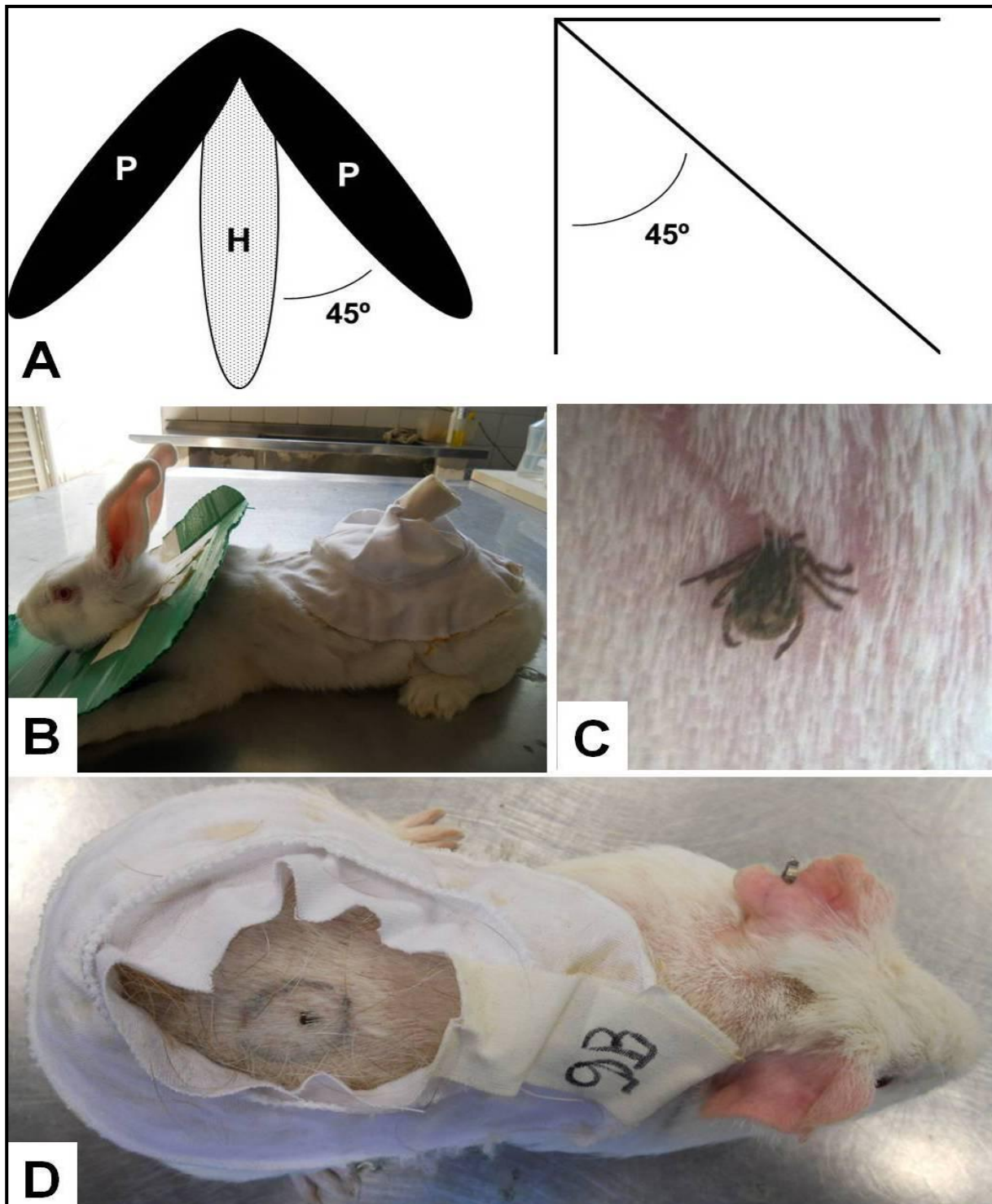
3.6 DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE ADULTOS DE *A. AUREOLATUM* PRÉ-ALIMENTADOS PARA TRANSMISSÃO DE *R. RICKETTSII* PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Os carrapatos adultos utilizados neste estudo foram também oriundos de ninfas infectadas, que adquiriram a infecção por *R. rickettsii* durante a alimentação larval descrita no item 3.3. Para pré-alimentação dos carrapatos adultos infectados, foram utilizados dois coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) para alimentar 40 adultos de *A. aureolatum* dentro de câmaras de pano coladas ao dorso tricotomizado de cada animal, conforme descrito para cobaias no item 3.3. Os coelhos foram mantidos com colar elizabetano, para que não danificassem as câmaras enquanto os carrapatos se alimentavam (Figura 2B). Os carrapatos foram observados, frequentemente, até o momento em que se fixaram na pele desses animais. Com a fixação do carrapato no coelho, era feita uma marca com caneta atóxica, próxima ao ectoparasito. Caso o carrapato se desprendesse e locomovesse do local, era descartado do experimento, sendo que somente os carrapatos que se mantiveram fixados por 48 horas no mesmo ponto foram considerados pré-alimentados. A partir deste momento, esses carrapatos adultos eram manualmente removidos dos coelhos e imediatamente

levados a infestar cobaias previamente preparadas com câmaras de pano coladas sobre o dorso tricotomizado.

Em cada cobaia foi colocado um carrapato adulto macho, pré-alimentado por 48 h no coelho. Através de observação com lupa manual, considerou-se que o carrapato se encontrava fixado na pele da cobaia a partir do momento em que seus palpos estivessem abertos em um ângulo aproximado de 45° em relação ao próprio hipostômio (Figura 2A/C). Todos os carrapatos fixados foram circundados com caneta atóxica aplicada na pele das cobaias, para um melhor monitoramento desses ectoparasitos. Caso algum carrapato fosse encontrado fixado fora do círculo, era descartado do experimento, não havendo como definir o tempo exato em que esse carrapato permaneceu fixado na cobaia (Figura 2D). Desta forma, esta cobaia era também descartada do experimento. O tempo mínimo de fixação dos carrapatos nas cobaias, assim como o número de cobaias utilizadas em cada grupo, encontram-se no quadro 3. Uma vez atingido o tempo de alimentação pré-determinado nas cobaias, que variou de 1 minuto a 48h, os carrapatos eram retirados manualmente e mantidos congelados a -80°C até serem processados por PCR, conforme descrito no item 3.9. Em um grupo adicional de cobaias (GAA17), os carrapatos adultos foram deixados por 10 dias (240h), como forma de simular uma infestação natural.

Figura 2 - Modelo utilizado para definição do início da fixação do carrapato adulto no hospedeiro e hospedeiros infestados com *A. aureolatum*



Legenda: A) Modelo utilizado para definição do início da fixação do carrapato adulto no hospedeiro; B) coelho preparado para infestação de *A. aureolatum*; C) Macho de *A. aureolatum* fixado em cobaia, com o hipostômio inserido no hospedeiro, e os palpos em um ângulo maior que 45°; D) *A. aureolatum* fixado na cobaia, circundado com caneta atóxica, no momento da retirada da cobaia

Quadro 3 - Tempo de parasitismo de adultos (*A. aureolatum*) pré-alimentados, infectados por *R. rickettsii* em cobaias (*C. porcellus*)

GRUPO	TEMPO DE FIXAÇÃO	Nº COBAIAS
GAA1	1 minuto	2
GAA2	3 minutos	2
GAA3	5 minutos	2
GAA4	10 minutos	2
GAA5	20 minutos	2
GAA6	40 minutos	2
GAA7	1 hora	2
GAA8	2 horas	2
GAA9	4 horas	2
GAA10	6 horas	2
GAA11	8 horas	2
GAA12	12 horas	2
GAA13	18 horas	2
GAA14	24 horas	2
GAA15	36 horas	2
GAA16	48 horas	2
GAA17	Natural (240)	2

3.7 SOROLOGIA DAS COBAIAS PARA *R. RICKETTSII*

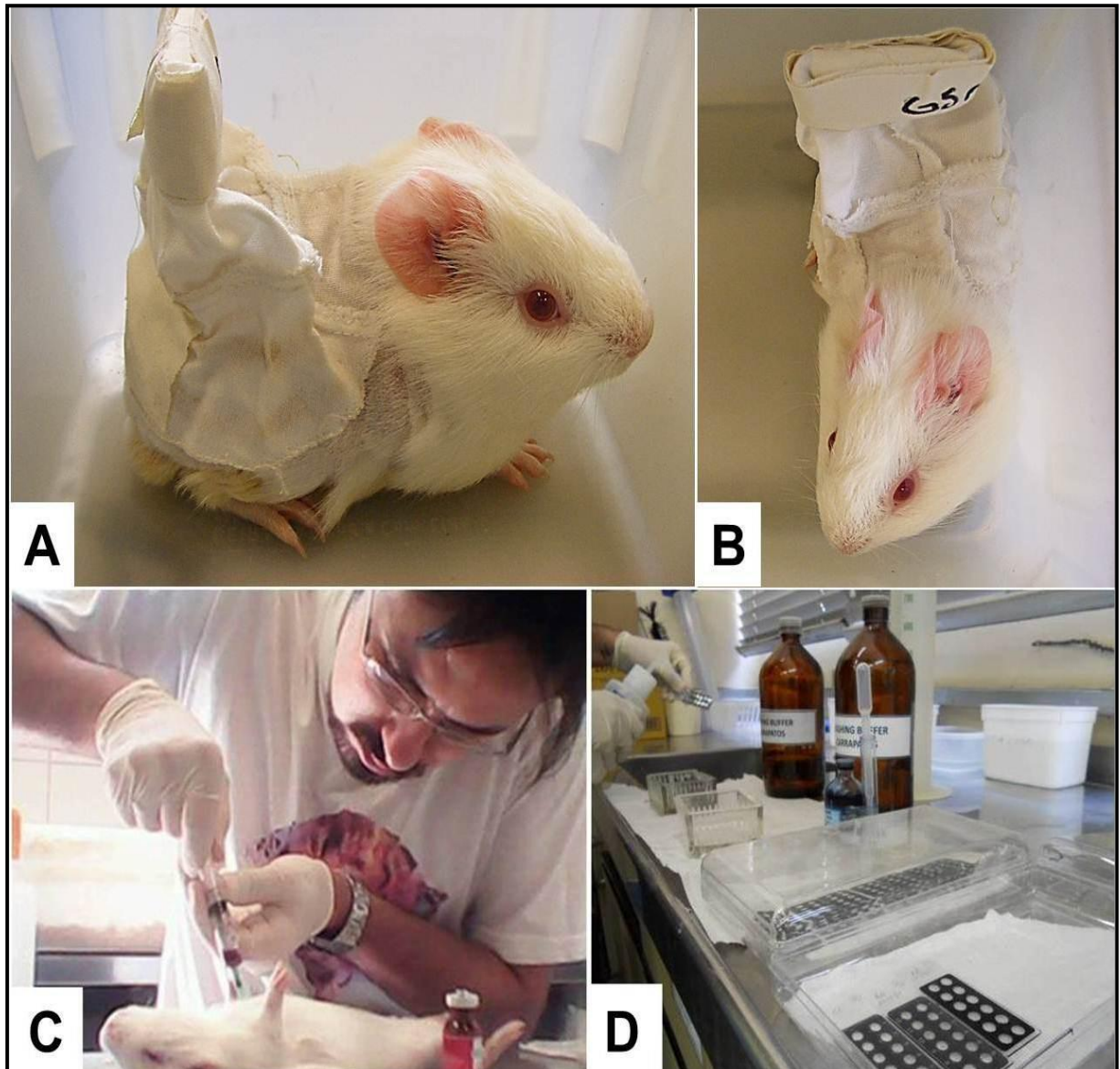
Todas as cobaias e coelhos utilizadas no trabalho foram oriundas de biotério, sendo criadas sem qualquer contato com carrapatos ou outros ectoparasitos. Aos 21 dias após as infestações, o sangue de todas as cobaias foi colhido, através de via intracardíaca (Figura 3C). Para esse procedimento, cada animal foi sedado com 0,6 ml de anestésico à base de quetamina e xilazina. O sangue colhido foi centrifugado (10 minutos a 13.000g), para a obtenção de soro sanguíneo. As amostras de soro foram processadas pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) frente ao antígeno de *R. rickettsii*, conforme previamente descrito (HORTA et al. 2004, HORTA et al., 2007), usando lâminas de antígeno produzidas no próprio laboratório, para *R. rickettsii* cepa Taiacu.

Os soros colhidos das cobaias e dos coelhos foram diluídos em PBS (0,1M, pH 7,2) a uma diluição inicial de 1:64. Vinte microlitros da diluição foram adicionados em cada poço da lâmina contendo os antígenos. As lâminas foram incubadas em

câmara úmida a 37°C por 30 minutos, posteriormente foram lavadas com solução PBS (0,1M, pH 7,2) e mantidas em uma cuba com uma mesma solução durante 15 minutos em PBS (Figura 3D), por duas vezes. Após secarem foram incubadas a 37°C por 30 minutos com anticorpo anti-IgG de cobaia ou coelho (sigma Diagnostics, St Louis) conjugados à Isotiocianato de Fluoresceína na diluição 1:400 para cobaias e 1:500 para coelhos. As lâminas foram lavadas como descrito acima e coradas em solução de PBS (0,1M, pH 7,2) contendo 0,2% de azul de Evans. Após completamente secas, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínula, sendo por fim lidas em microscópio de luz ultravioleta (Olympus BX60, Tokyo, Japan) em objetiva de 40X (MORAES-FILHO et al., 2009). Foram consideradas reagentes as amostras com títulos ≥ 64 . Em cada lâmina foi utilizado soro previamente testado não reativo (controle negativo) e o sabidamente positivo (controle positivo) (PINTER; LABRUNA, 2006).

Quando constatada reação positiva na diluição de triagem (1/64), os soros também foram testados para determinação do título final de reação (HORTA et al. 2004, HORTA et al., 2007). Para as cobaias que morreram antes dos 21 dias pós-infestação, realizou-se a necropsia do animal, sendo que amostras de baço e pulmão foram colhidas e processadas por PCR para *Rickettsia* spp., conforme descrito no item 3.9.

Figura 3 – Cobaias preparadas para infestação, coleta de sangue e sorologia (RIFI)



Legenda: A e B) Câmaras de infestação instaladas no dorso de cobaias, com cola específica para tecido animal; C) Colheita de sangue das cobaias por via intracardiaca, D) Etapa da técnica de RIFI: lavagem das lâminas de antígeno específico com PBS, para detecção de anticorpos anti-*R. rickettsii*

3.8 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS INFESTADOS

Todas as cobaias infestadas tiveram sua temperatura retal aferida diariamente, do dia zero ao vigésimo-primeiro dia após a infestação. Foi considerado estado febril temperaturas superiores a 39,5°C, conforme previamente estabelecido (Monteiro 1931). A ocorrência de lesões escrotais, assim como lesões nas extremidades das orelhas e dedos, típicas de infecção por *R. rickettsii* em cobaias (Monteiro 1931) foram também observadas. Além desses sintomas, observou-se uma perda de peso aparente dos animais no período pós-infestação.

Os coelhos utilizados pré-alimentação de adultos de *A. aureolatum* (item 3.6) foram monitorados por 21 dias, avaliando-se a temperatura corporal e a presença de sinais clínicos característicos da infecção por *R. rickettsii*. Para esse hospedeiro, é considerado estado febril temperaturas acima de 40,0°C (Monteiro 1933). No vigésimo primeiro dia pós-infestação, foi colhido sangue dos coelhos, através de punção sanguínea da artéria auricular caudal. Este foi centrifugado (10 minutos a 13.000 g), para obtenção de soro sanguíneo, e testado para a técnica de imunofluorescência indireta, conforme descrito no item 3.7, a fim de avaliar a presença de anticorpos anti-*R. rickettsii*.

3.9 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA de carrapatos foi realizada de acordo com a técnica de Isotiocianato de Guanidina (GT) descrita por Chomkzynski (1993) e posteriormente modificada por Sangioni et al. (2005). Cada uma das ninfas e adultos utilizados foi colocado em microtubo contendo 150 µL de tampão TE (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7.4), triturado com a ponta queimada de uma ponteira de 1 mL e homogeneizado no vórtex por 10 segundos e centrifugado por 6 segundos. Foi então adicionado 450 µL de Isotiocianato de Guanidina, incubado por 10 minutos em temperatura ambiente, homogeneizando brevemente no vórtex a cada 2 minutos. Posteriormente foram acrescentados 100 µL de clorofórmio, fazendo a inversão deste por algumas vezes e deixando descansar por 2 minutos. O microtubo foi então

centrifugado a 12.000 *g* por 5 minutos para separar a fase aquosa, a qual foi pipetada e transferida para outro microtubo de 1500 μ L previamente identificado. Foi incorporado à fase aquosa 600 μ L de isopropanol com posterior incubação a -20°C de 2 a 18 horas. Na etapa seguinte, o microtubo foi centrifugado a 12.000 *g* a 4°C por 15 minutos, o sobrenadante descartado e adicionou-se 800 μ L de etanol a 70%. Novamente o microtubo foi centrifugado a 12.000 *g* por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante desprezado e o pelet no microtubo aberto secaram a 56°C por 15 minutos no termobloco. O pelet foi ressuspensão em 40 μ L de TE, incubando-se novamente, porém com o microtubo fechado, a 56°C por 15 minutos. O microtubo foi então armazenado a -20°C até utilização do DNA extraído.

A extração de DNA a partir do baço e pulmão das cobaias que morreram durante a infecção foi realizada através de kit comercial (DNEasy Tissue Kit, Qiagen, USA), conforme instruções do fabricante. Amostras de 300 ng de DNA foram utilizadas para cada reação de PCR.

3.10 REAÇÃO EM CADEIA DE POLIMERASE (PCR)

Para detecção de *Rickettsia* através de PCR, cada amostra de DNA, extraído dos carrapatos e dos órgãos das cobaias, foi testada individualmente pelo protocolo de PCR convencional descrito por Labruna et al. (2004). A presença de riquetsia nos carrapatos *A. aureolatum* coletados foi avaliada individualmente através da amplificação de um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia*, utilizando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores (“*primers*”), presente no quadro 4. Para cada reação eram utilizados controles negativos (água MilliQ livre de DNA) e positivos (*Rickettsia parkeri* cepa NOD).

A reação de amplificação para o gene *gltA* foi realizada em microtubos de 200 μ L adicionando 2,5 μ L de DNA extraído acrescido de 22,5 μ L de Mix (12,6 μ L de água de miliQ; 4 μ L de Buffer [200mM Tris pH 8.4, 500 mM KCl, Invitrogen®]; 2,5 μ L de dNTP [Invitrogen®]; 1,25 μ L de cada *primer*; 0,75 μ L de Cloreto de Magnésio [50 mM, Invitrogen®]; e 0,15 μ L de Taq polimerase [Invitrogen®]), para um volume total

de 25µL de solução. O protocolo térmico utilizado para o gene *gltA*, realizado em termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf®), foi o seguinte: 1 ciclo à 95°C por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos de 30 segundos à 95°C, 30 segundos à 58°C, 40 segundos 45 à 72°C, e 7 minutos à 72°C.

Quadro 4 - Primers utilizados nas reações da PCR para a detecção de bactérias do gênero *Rickettsia*

Gene alvo e pares de primers	Especificidade	Sequência dos primers (5' → 3')	Fragmento amplificado (pb)	Referência
<i>gltA</i> CS-78 CS- 323	Gênero <i>Rickettsia</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	401	Labruna et al., 2004

3.11 ELETROFORESE

Todos os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com tampão de corrida TBE 1X pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA) à 110v/50mA. O gel era posteriormente corado com brometo de etídio (0,5µL/mL – Invitrogen®) e visualizado sob luz ultravioleta (UV) em câmara escura (Alphamager®) (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). As amostras que revelavam bandas de DNA na altura do controle positivo, confirmando a amplificação de nucleotídeos, eram consideradas positivas para a reação da PCR utilizada.

3.12 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Após o término dos experimentos, foi realizada uma análise descritiva dos resultados. De acordo com os dados obtidos, procurou-se estabelecer um ciclo epidemiológico mais semelhante às condições naturais nas quais ocorrem o parasitismo de *A. aureolatum* em cães domésticos, e seu parasitismo acidental em pessoas que vivem próximas às áreas de vida desse carrapato. Através desse

juízo, propõe-se identificar as fases e condições fisiológicas de carrapatos *A. aureolatum* que provavelmente, são mais importantes para a transmissão de *R. rickettsii* para humanos.

4 RESULTADOS

Para obtenção de carrapatos infectados por *R. rickettsii*, larvas de *A. aureolatum* não infectadas foram levadas a infestar cobaias experimentalmente infectadas com *R. rickettsii*. Assim que as larvas ingurgitadas recuperadas completaram a ecdise para ninfas, uma amostra de 10 ninfas não alimentadas foi testada por PCR, a fim de verificar a infecção por *Rickettsia*. Todas as 10 ninfas não alimentadas foram positivas na PCR, indicando uma frequência de infecção próxima de 100% nos carrapatos expostos a *R. rickettsii* na fase de larva. A partir daí, todos os carrapatos nas fases de ninfas e adultos de *A. aureolatum* utilizados neste estudo se mostraram infectados por *Rickettsia*, conforme demonstrado pela PCR realizada nos carrapatos após se alimentarem nas cobaias por diferentes períodos.

4.1 DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE NINFAS DE *A. AUREOLATUM* NÃO-ALIMENTADAS PARA TRANSMISSÃO DE *R. RICKETTSII* PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO

O número de carrapatos que se fixou dentre as 10 ninfas levadas a infestar cada cobaia, assim como os períodos de fixação avaliados e a temperatura retal inicial, encontram-se na tabela 1. A variação de temperatura das cobaias monitoradas nos 21 dias subsequentes é apresentada nas tabelas 2 e 3. O tempo mínimo para que a primeira ninfa se fixasse em cada cobaia foi, em média, 80 minutos (desvio padrão: 7,61 min.; amplitude: 68-95 min.). Todas as ninfas retiradas das cobaias e submetidas à PCR, para amplificação do gene citrato sintase (*glTA*), apresentaram resultado positivo, comprovando estarem infectadas por *R. rickettsii* (Figuras 4A/B).

Tabela 1 - Descrição do tempo em que as ninfas de *A. aureolatum* permaneceram fixadas nas cobaias (GN1 – GN13), número de ninfas encontradas fixadas ao final do tempo determinado, e temperatura inicial das cobaias

COBAIA	TEMPO PARASITISMO (horas)	NINFAS (N=10)		TEMPERATURA INICIAL (°C)
		FIXADAS	LIVRES	
GN1 – A	2	2	8	38,5
GN1 – B	2	1	9	38,5
GN2 – A	4	1	9	38,6
GN2 – B	4	2	8	38,2
GN3 – A	6	4	6	38,4
GN3 – B	6	4	6	38,5
GN4 – A	8	1	9	38,7
GN4 – B	8	2	8	38,7
GN4 – C	8	2	8	38,3
GN4 – D	8	3	7	37,8
GN5 – A	10	2	8	38,1
GN5 – B	10	6	4	38,3
GN6 – A	12	2	8	39,1
GN6 – B	12	2	8	38,6
GN6 – C	12	8	2	37,8
GN6 – D	12	5	5	37,9
GN7 – A	14	9	1	38,0
GN7 – B	14	4	6	38,1
GN8 – A	16	7	3	38,1
GN8 – B	16	4	6	37,3
GN9 – A	18	6	4	38,7
GN9 – B	18	5	5	39,2
GN9 – C	18	3	7	38,1
GN9 – D	18	3	7	37,8
GN10 – A	24	5	5	38,5
GN10 – B	24	4	6	38,3
GN11 – A	36	7	3	38,7
GN11 – B	36	6	4	38,5
GN12 – A	48	3	7	38,4
GN12 – B	48	8	2	38,5
GN13 – A	96-120	7	3	38,8
GN13 – B	96-120	10	0	38,3

Tabela 2 - Temperatura das cobaias infestadas por ninfas de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*, retirados em tempos diferenciados (GN1-A –GN6-D), durante 21 dias de monitoramento

DIA	TEMPERATURA DAS COBAIAS (°C)															
	GN1 A	GN1 B	GN2 A	GN2 B	GN3 A	GN3 B	GN4 A	GN4 B	GN4 C	GN4 D	GN5 A	GN5 B	GN6 A	GN6 B	GN6 C	GN6 D
01	38,6	38,6	38,6	38,6	38,3	38,5	38,8	39,2	38,4	38,1	38,7	38,3	38,5	38,7	38,2	38,3
02	38,5	38,6	38,2	38,2	38,4	38,8	38,8	38,8	38,4	38,6	38,8	38,7	38,7	38,5	38,5	38,5
03	39,0	38,5	39,1	38,5	38,8	38,5	38,9	38,5	39,5	39,2	39,0	39,0	38,9	38,7	38,8	38,8
04	38,7	38,6	38,7	38,3	38,3	38,7	38,5	38,6	38,5	38,7	39,2	38,7	38,6	38,3	38,9	39,0
05	38,3	38,3	38,7	38,7	38,5	38,9	38,5	38,6	38,5	38,5	38,8	38,8	39,4	38,7	38,7	39,2
06	38,5	38,5	38,8	38,5	38,5	38,8	38,7	38,9	38,6	38,5	38,9	38,3	40,0	38,5	38,6	38,6
07	38,5	38,6	38,8	38,7	38,5	38,8	38,8	38,7	38,8	38,9	38,5	38,4	40,2	39,1	38,7	38,3
08	38,5	38,9	38,9	38,7	38,5	38,7	38,6	38,5	38,8	38,6	38,7	38,5	40,1	38,8	38,7	38,5
09	38,5	38,3	38,7	38,7	38,2	38,8	38,4	38,7	38,6	38,4	38,8	38,4	40,5	38,8	39,2	38,3
10	38,5	38,4	39,1	38,8	38,1	38,3	38,4	38,5	38,5	38,0	38,5	38,3	39,9	38,6	38,4	38,4
11	38,7	38,9	38,3	38,4	38,4	38,7		38,5	38,2	38,1	38,2	38,1	38,3	38,4	38,3	38,3
12	38,5	38,4	38,7	38,2	38,3	38,7	38,5	38,7	38,2	38,3	38,5	38,2	†	38,8	38,6	38,4
13	38,6	38,1	38,4	38,0	38,0	38,7	38,9	38,6	38,3	38,2	38,4	38,3		37,9	38,7	38,5
14	39,1	38,5	38,8	38,4	38,4	38,8	38,6	38,8	38,0	38,3	38,5	38,3		38,4	38,6	38,4
15	38,8	38,6	38,6	38,5	38,5	38,6	38,6	38,7	38,0	38,4	38,4	38,2		38,5	38,7	38,5
16	38,7	38,7	38,6	38,5	38,4	38,7	38,7	38,8	38,2	38,3	38,3	38,2		38,6	38,6	38,4
17	38,8	38,7	38,7	38,6	38,5	38,8	38,8	38,7	38,3	38,5	38,4	38,3		38,7	38,6	38,5
18	38,7	38,8	38,7	38,8	38,8	38,9	38,7	38,8	38,2	38,4	38,5	38,2		38,9	38,7	38,4
19	38,7	38,6	38,6	38,7	38,6	38,6	38,7	38,7	38,0	38,3	38,4	38,3		38,8	38,6	38,3
20	39,1	38,9	38,8	38,3	38,7	38,6	38,6	38,8	39,2	38,4	38,3	38,3		38,6	38,6	38,5
21	38,8	39,0	38,9	38,3	38,8	38,6	38,9	38,9	38,4	38,3	38,4	38,2		38,7	38,5	38,4

Legenda: (†) Óbito. Temperaturas em negritos são consideradas febris para cobaias

Tabela 3 - Temperatura das cobaias infestadas por ninfas de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*, retirados em tempos diferenciados (GN7-A – GN13-B), durante 21 dias de monitoramento

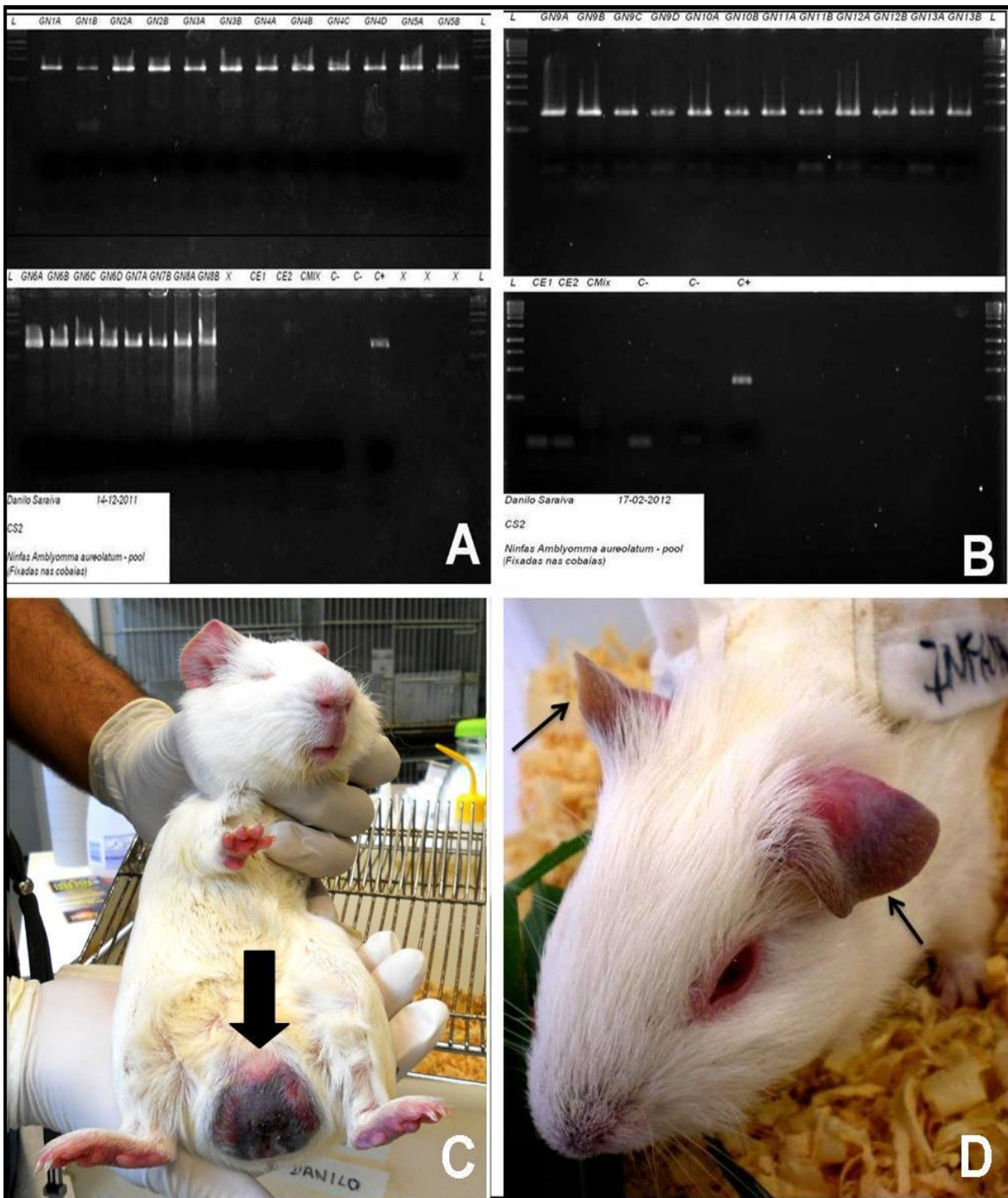
DIA	TEMPERATURA DAS COBAIAS (°C)															
	GN7 A	GN7 B	GN8 A	GN8 B	GN9 A	GN9 B	GN9 C	GN9 D	GN10 A	GN10 B	GN11 A	GN11 B	GN12 A	GN12 B	GN13 A	GN13 B
01	38,4	38,2	38,3	38,5	38,3	39,1	38,3	38,9	38,6	38,7	38,7	38,5	38,5	38,5	38,6	39,5
02	38,6	38,7	38,5	38,6	38,5	38,3	38,6	38,8	38,6	38,6	38,6	38,5	38,5	38,4	38,6	38,3
03	38,8	39,2	38,8	38,9	38,3	38,6	38,7	38,7	38,6	38,8	39,4	38,6	38,4	38,7	38,7	38,4
04	38,4	39,1	38,7	38,8	38,3	38,3	38,6	39,0	38,6	39,1	38,5	39,0	38,6	38,8	38,5	38,4
05	39,8	39,0	39,3	38,6	38,8	38,6	38,3	38,6	39,1	38,9	39,4	39,1	39,1	39,9	38,7	39,2
06	40,4	39,1	39,8	38,9	38,4	39,8	38,3	38,9	38,9	38,5	39,9	40,0	39,0	40,0	39,3	40,3
07	40,8	38,5	39,9	39,4	39,6	39,6	40,6	38,9	38,8	38,9	40,0	40,0	40,0	40,1	39,9	40,5
08	40,9	38,8	39,8	39,7	40,2	39,9	40,9	39,5	40,2	39,4	40,4	40,5	40,9	40,4	40,2	40,4
09	40,5	38,7	39,7	39,9	40,1	39,6	40,7	39,6	40,3	39,9	40,3	40,8	40,8	40,4	40,4	40,2
10	40,2	38,6	39,0	40,0	40,1	38,9	40,6	40,0	40,6	40,0	40,3	40,6	40,7	40,2	40,4	40,2
11	39,8	38,6	38,8	39,5	39,4	38,9	40,4	40,7	40,0	39,9	40,2	40,1	40,0	39,5	40,3	39,6
12	39,4	38,3	38,8	39,0	39,0	38,9	39,9	40,3	39,8	39,8	40,2	40,2	40,1	39,3	40,3	39,2
13	39,3	38,4	38,7	38,6	38,4	38,1	39,8	40,4	39,2	39,3	39,5	39,5	39,3	39,1	40,1	39,1
14	39,0	38,5	38,8	38,7	38,5	37,9	39,3	40,0	38,9	38,8	39,7	38,8	39,5	38,8	39,6	38,9
15	38,8	38,4	38,7	38,7	38,6	37,8	39,2	39,7	38,7	38,6	39,3	38,7	39,3	38,7	39,5	38,7
16	38,7	38,3	38,7	38,6	38,6	38,3	39,0	39,5	38,6	39,0	39,0	38,6	39,1	38,7	39,0	38,6
17	38,8	38,4	38,7	38,7	38,7	38,3	38,4	39,4	38,6	38,4	38,8	38,8	38,8	38,8	38,8	38,6
18	38,1	38,4	38,6	38,6	38,7	38,4	38,3	39,2	38,8	38,6	38,8	38,7	38,7	38,7	38,7	38,7
19	38,4	38,3	38,7	38,7	38,6	38,6	38,0	38,6	38,7	38,5	38,7	38,6	38,7	38,6	38,7	38,6
20	39,5	38,4	38,8	38,7	38,7	38,7	38,6	38,6	39,9	38,7	38,5	38,8	38,6	38,7	38,2	38,6
21	38,4	38,5	38,8	38,6	38,7	38,3	38,5	38,4	38,8	38,8	38,6	38,5	38,8	38,6	38,4	38,7

Temperaturas em negritos são consideradas febris para cobaias

De acordo com os exames sorológicos realizados, as cobaias pertencentes aos grupos GN1 a GN5 não produziram anticorpos anti- *R. rickettsii* aos 21 dias pós-infestação, indicando que esses animais não tiveram contato com a bactéria. A cobaia GN6-A foi a óbito no décimo segundo dia pós-infestação, com sintomas característicos de infecção por *R. rickettsii* (febre alta, prostração, lesão escrotal). Esta apresentou resultado positivo para a amplificação do gene citrato sintase, através de DNA extraído de uma porção de seu pulmão e baço. Através desse diagnóstico, pode-se confirmar que cobaia em questão foi infectada por *R. rickettsii*. As outras três cobaias pertencentes ao grupo GN6 (12 horas de fixação) não apresentaram nenhum sinal clínico da infecção por *R. rickettsii*, e não houve a soroconversão de nenhuma delas frente ao antígeno específico. No grupo GN7 (14 horas de fixação) houve a produção de anticorpos anti-*R. rickettsii* em ambas as cobaias, porém apenas uma (GN7-A) apresentou sinais clínicos de infecção por *R. rickettsii*. Todas as cobaias restantes, dos grupos GN8 ao GN13, apresentaram febre e produziram anticorpos para *R. rickettsii*, em diferentes titulações (Tabela 4), indicando que foram infectadas por *R. rickettsii*.

Dentre as 32 cobaias utilizadas no presente experimento, 17 apresentaram infecção por *R. rickettsii*, 11 apresentaram necrose na extremidade das orelhas, cinco apresentaram necrose escrotal e três delas apresentaram uma aparente perda de peso (Figuras 4C/D). Os sintomas clínicos apresentados pelas cobaias encontram-se descritos na tabela 4.

Figura 4 – Detecção do gene citrato sintase em gel de agarose e necrose em cobaias infectadas



Legenda: A e B) Detecção do gene citrato sintase, amplificado em gel de agarose, nas ninfas de *A. aureolatum* infestadas em cobaias. Bandas positivas, com 401 pares de base, representam carrapatos infectados por *R. rickettsii*. Apenas as ninfas fixadas nos hospedeiros foram utilizadas; C) Necrose escrotal (seta) em cobaias infectadas por *R. rickettsii*, D) Extremidade das orelhas já em início de necrose (setas)

Tabela 4 - Período de fixação de ninfas de *A. aureolatum* em cobaias, títulos de anticorpos para as esses hospedeiros 21 dias pós-infestação, diagnosticadas através da técnica de reação de imunofluorescência indireta (RIFI), e sinais clínicos apresentados pelos animais

COBAIA	TEMPO PARASITISMO (horas)	TITULAÇÃO RIFI	SINAIS CLÍNICOS
GN1 – A	2	N	-
GN1 – B	2	N	-
GN2 – A	4	N	-
GN2 – B	4	N	-
GN3 – A	6	N	-
GN3 – B	6	N	-
GN4 – A	8	N	-
GN4 – B	8	N	-
GN4 – C	8	N	-
GN4 – D	8	N	-
GN5 – A	10	N	-
GN5 – B	10	N	-
GN6 – A	12	†	NO, NE
GN6 – B	12	N	-
GN6 – C	12	N	-
GN6 – D	12	N	-
GN7 – A	14	2048	NO
GN7 – B	14	256	-
GN8 – A	16	512	-
GN8 – B	16	512	-
GN9 – A	18	8192	NO, PP
GN9 – B	18	256	-
GN9 – C	18	4096	NO, NE, PP
GN9 – D	18	8192	NO, PP
GN10 – A	24	4096	NO
GN10 – B	24	512	-
GN11 – A	36	16384	NO, NE
GN11 – B	36	8192	NO
GN12 – A	48	4096	NO, NE
GN12 – B	48	8192	NO
GN13 – A	96-120	16384	NE
GN13 – B	96-120	16384	NO

Legenda: (N) sorologia negativa; (-) ausência de sinal clínico; (NO) necrose na orelha; (NE) necrose escrotal; (PP) perda de peso aparente; (†) óbito da cobaia

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE ADULTOS DE *A. AUREOLATUM* NÃO-ALIMENTADOS PARA TRANSMISSÃO DE *R. RICKETTSII* PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Os carrapatos adultos não alimentados demoraram, em média, 270 minutos (desvio padrão: 19,33 min.; amplitude: 213-300 min.) para se fixarem nas cobaias. Depois de fixados, os carrapatos não se deslocaram para outros sítios de alimentação durante o tempo de infestação determinado para cada um deles. Um dos machos de *A. aureolatum* (GAJ3- A) morreu fixado na cobaia, sendo necessário que se repetisse o experimento para esse grupo. Todos os carrapatos retirados das cobaias tiveram resultado positivo para a amplificação do gene citrato sintase, confirmando estarem infectados por *R. rickettsii*. A variação da temperatura corporal das cobaias infestadas por *A. aureolatum* é apresentada nas tabelas 5 e 6.

As cobaias do grupo GAJ5, referente a 12 horas de fixação por *A. aureolatum*, demonstraram estado febril e sinais clínicos da infecção por *R. rickettsii*. Em concordância com a sintomatologia dos hospedeiros, o sangue colhido no vigésimo-primeiro dia pós-infecção apresentou anticorpos anti-*R. rickettsii*. A partir desse grupo, todos os animais também apresentaram anticorpos para essa bactéria. A titulação da sorologia das cobaias 21 dias pós-infestação, assim como os sinais clínicos encontrados nesses animais, encontram-se na tabela 7.

Das 22 cobaias utilizadas nessa etapa do experimento, 14 apresentaram infecção por *R. rickettsii*. Do total de cobaias infectadas, 13 apresentaram necrose nas extremidades das orelhas, 10 apresentaram necrose escrotal e três delas apresentaram uma aparente perda de peso. Todas as cobaias que apresentaram estado febril no período de ricketsemia produziram anticorpos anti-*R. rickettsii*, exceto duas (GAJ8-B e GAJ10-A referentes a 24 e 48 horas de fixação, respectivamente) que vieram a óbito e apresentaram PCR de seus órgãos (baço e pulmão) positivo para *Rickettsia*, podendo-se supor que ambas morreram devido à infecção por *R. rickettsii*.

Tabela 5 - Temperatura das cobaias infestadas por machos adultos não-alimentados de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*, retirados em tempos diferenciados (GAJ1-A – GAJ6-A), durante 21 dias de monitoramento

DIA	TEMPERATURA DAS COBAIAS (°C)										
	GAJ1 A	GAJ1 B	GAJ2 A	GAJ2 B	GAJ3 A	GAJ3 B	GAJ4 A	GAJ4 B	GAJ5 A	GAJ5 B	GAJ6 A
01	38,8	38,6	38,3	38,7	38,7	38,5	38,5	38,7	38,0	38,6	38,4
02	38,6	38,6	38,2	39,1	38,7	38,6	38,5	38,6	38,1	38,7	38,5
03	38,5	38,7	38,3	39,0	38,8	38,7	38,8	38,5	37,9	38,9	38,8
04	38,5	38,8	38,4	38,7	38,7	38,7	39,0	38,3	39,9	38,8	39,7
05	38,5	38,6	38,4	38,6	38,6	38,6	38,8	38,8	40,4	38,9	39,8
06	38,4	38,5	38,5	38,6	38,6	38,9	38,7	38,4	40,8	38,9	39,6
07	38,4	38,5	38,4	38,8	38,7	38,6	38,8	39,0	40,7	39,1	40,0
08	38,9	38,6	38,3	38,6	38,8	38,8	38,6	38,5	40,3	39,8	39,8
09	39,0	38,6	38,4	38,5	38,7	38,8	38,6	38,8	39,7	39,9	39,6
10	38,8	38,7	38,3	38,5	38,9	38,9	38,7	38,5	40,0	39,9	38,9
11	38,7	38,7	38,6	38,9	38,8	38,7	38,6	38,8	40,0	39,8	39,2
12	38,7	38,6	38,5	38,8	38,9	38,4	38,7	38,6	39,7	39,6	38,6
13	38,6	38,6	38,6	38,7	39,0	38,5	38,5	38,7	39,6	39,1	38,8
14	38,6	38,7	38,5	38,9	38,9	38,4	38,5	38,6	39,5	39,0	38,7
15	38,5	38,7	38,4	38,7	38,8	38,3	39,4	38,7	38,3	38,9	38,8
16	38,7	38,5	38,3	38,7	38,7	38,5	39,3	38,5	38,5	38,7	38,7
17	38,7	38,4	38,4	38,8	38,8	38,4	39,0	38,6	38,4	38,7	38,5
18	38,6	38,5	38,5	38,7	38,9	38,4	38,8	38,6	38,4	38,6	38,6
19	38,7	38,7	38,5	38,7	38,8	38,8	38,7	38,6	38,5	38,6	38,5
20	38,6	38,8	38,4	38,6	38,7	38,7	38,6	38,5	38,6	38,5	38,7
21	38,5	38,6	38,5	38,8	38,9	38,7	38,5	38,7	38,6	38,6	38,5

Temperaturas em negritos são consideradas febris para cobaias

Tabela 6 - Temperatura das cobaias infestadas por machos adultos não-alimentados de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*, retirados em tempos diferenciados (GAJ6-B – GAJ11-B), durante 21 dias de monitoramento

DIA	TEMPERATURA DAS COBAIAS (°C)										
	GAJ6 B	GAJ7 A	GAJ7 B	GAJ8 A	GAJ8 B	GAJ9 A	GAJ9 B	GAJ10 A	GAJ10 B	GAJ11 A	GAJ11 B
01	38,3	38,4	38,2	38,6	38,5	38,7	38,6	38,8	38,7	38,5	38,5
02	38,2	38,5	38,0	38,7	38,7	38,6	38,7	38,7	38,6	38,6	38,9
03	39,1	38,8	38,9	38,9	38,6	38,9	38,9	39,2	38,8	38,9	39,1
04	39,0	38,9	39,0	39,2	38,8	38,7	39,5	39,5	39,2	38,8	39,2
05	38,9	39,6	39,8	39,3	39,1	38,8	39,9	39,9	39,5	39,6	39,8
06	39,5	40,0	40,1	39,8	39,6	38,6	40,0	40,0	39,7	39,6	40,0
07	39,8	39,9	40,0	40,0	40,1	39,3	40,1	40,3	39,8	40,0	40,0
08	39,9	39,8	39,7	39,8	40,0	39,7	40,0	40,2	39,8	39,8	40,0
09	39,4	39,7	39,3	39,9	39,8	39,9	40,0	40,3	40,2	39,9	39,9
10	38,9	39,5	38,5	39,8	39,5	39,9	39,9	39,2	40,3	39,7	39,8
11	38,8	39,1	38,7	39,8	39,2	40,0	39,7	38,5	40,0	39,4	39,8
12	38,7	38,9	39,0	39,8	39,1	39,6	39,1	38,1	39,8	39,1	39,3
13	38,6	38,7	38,8	39,6	38,9	39,2	39,1	†	39,2	39,0	39,0
14	38,6	38,5	38,7	39,4	38,4	39,0	38,6		38,9	38,9	38,8
15	38,4	38,4	38,8	39,1	†	38,7	38,7		38,8	38,8	38,9
16	38,5	38,6	38,6	38,7		38,7	38,6		38,9	38,7	38,7
17	38,7	38,5	38,5	38,8		38,7	38,8		38,7	38,7	38,7
18	38,4	38,6	38,6	38,7		38,6	38,7		38,9	38,7	38,6
19	38,8	38,7	38,5	38,6		38,8	38,8		38,7	38,6	39,0
20	38,6	38,6	38,5	38,6		38,7	38,6		38,8	38,7	38,6
21	38,7	38,5	38,4	38,7		38,6	38,6		38,6	38,6	38,8

Legenda: (†) Óbito. Temperaturas em negritos são consideradas febris para cobaias

Tabela 7 - Período de fixação de machos adultos não-alimentados de *A. aureolatum* em cobaias e títulos de anticorpos 21 dias pós-infestação determinado pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), e sinais clínicos apresentados pelos animais

COBAIA	TEMPO FIXAÇÃO	TITULAÇÃO RIFI	SINAIS CLÍNICOS
GAJ1 – A	2	N	-
GAJ1 – B	2	N	-
GAJ2 – A	4	N	-
GAJ2 – B	4	N	-
GAJ3 – A	6	N	-
GAJ3 – B	6	N	-
GAJ4 – A	8	N	-
GAJ4 – B	8	N	-
GAJ5 – A	12	4096	NO
GAJ5 – B	12	256	-
GAJ6 – A	16	2048	NO, NE
GAJ6 – B	16	1024	NO
GAJ7 – A	20	512	NO, PP
GAJ7 – B	20	2048	NO, NE
GAJ8 – A	24	2048	NO, NE
GAJ8 – B	24	†	NO, NE, PP
GAJ9 – A	36	2048	NO, NE
GAJ9 – B	36	4096	NO, NE, PP
GAJ10 – A	48	†	NO, NE
GAJ10 – B	48	8192	NO, NE
GAJ11 – A	240	16384	NO, NE
GAJ11 – B	240	16384	NO, NE

Legenda: (N) sorologia negativa; (-) ausência de sinal clínico; (NO) necrose na orelha; (NE) necrose escrotal; (PP) perda de peso aparente; (†) óbito da cobaia

4.3 DETERMINAÇÃO DO TEMPO MÍNIMO DE PARASITISMO DE ADULTOS DE *A. AUREOLATUM* PRÉ-ALIMENTADOS PARA TRANSMISSÃO DE *R. RICKETTSII* PARA O HOSPEDEIRO VERTEBRADO

Os dois coelhos utilizados para a pré-alimentação dos carrapatos machos adultos por 48 horas, apresentaram febre (>40.0°C) no intervalo de cinco a seis dias pós-infestação, sendo observado o surgimento de necrose nas extremidades das orelhas de ambos, sinais clínicos característicos de infecção por *R. rickettsii*. A temperatura corporal dos coelhos durante 21 dias pós-infestação se encontra na tabela 8. As sorologias de ambos os coelhos apresentaram resultado positivo para a

presença de anticorpos anti-*R. rickettsii*, sendo que a titulação final alcançada para o coelho 1 foi de 8192, e 16384 para o coelho 2.

O período médio que os carrapatos levaram para se fixar nas cobaias foi de 15 minutos (desvio padrão: 4,77 min.; amplitude: 7-27 min.). Após a fixação destes, observou-se que apenas um macho adulto se locomoveu para outro ponto, no corpo do animal. Devido a essa ocorrência, repetiu-se o experimento para esse único grupo (GAA6-A). Todos os carrapatos utilizados nesse experimento apresentaram resultado positivo na PCR, para amplificação do gene citrato sintase, comprovando estarem infectados por *R. rickettsii* (Figura 5A).

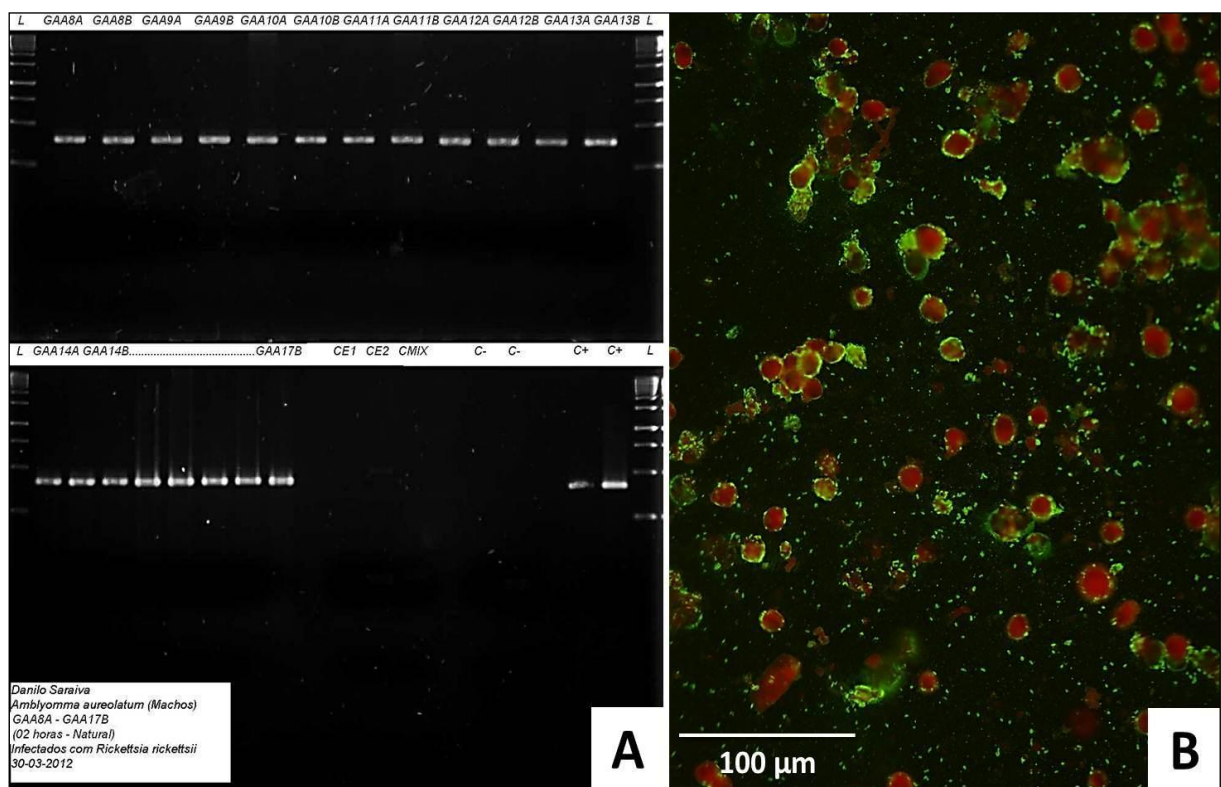
Tabela 8 - Temperatura corporal de coelhos alimentados por *A. aureolatum* infectados com *R. rickettsii* durante 21 dias de monitoramento

DIA	TEMPERATURA (°C)	
	COELHO 1	COELHO 2
1	39,9	39,8
2	39,9	39,7
3	39,8	39,7
4	39,8	39,8
5	39,9	40,6
6	40,0	40,6
7	40,8	40,8
8	40,8	40,8
9	40,7	40,5
10	40,6	40,3
11	40,5	39,8
12	40,3	39,6
13	39,7	39,6
14	39,6	39,8
15	39,7	39,7
16	39,7	39,9
17	39,9	39,9
18	39,8	39,8
19	39,9	39,7
20	39,8	39,7
21	39,7	39,6

A variação de temperatura das cobaias monitoradas ao longo dos 21 dias pós-infestação é apresentada nas tabelas 9 e 10. Das 34 cobaias utilizadas no experimento, 27 apresentaram sintomas de infecção por *R. rickettsii*. Dessas, 15 apresentaram necrose nas extremidades das orelhas, 16 apresentaram necrose

escrotal, sete tiveram perda de peso aparente, e 14 vieram a óbito. Todas as cobaias que morreram apresentaram um ou mais sinais clínicos característicos de infecção por *R. rickettsii*. Através da amplificação do gene citrato sintase, presente no DNA extraído dos pulmões e baço das cobaias, confirmou-se a presença de DNA riquetsial em 100% desses animais, podendo-se comprovar que os óbitos ocorreram devido à infecção pela bactéria. O resultado das sorologias realizadas para as cobaias que sobreviveram os 21 dias pós-infestação, assim como o tempo de fixação dos carrapatos em cada cobaia e a presença de sinais clínicos da infecção por *R. rickettsii*, encontram-se na tabela 11.

Figura 5 – Detecção do gene citrato sintase em gel de agarose e imunofluorescência indireta



Legenda: A) Detecção do gene citrato sintase, amplificado em gel de agarose, parte dos machos adultos de *A. aureolatum* (GAA8A – GAA14B), pré-alimentados em coelhos por 48 horas e infestados em cobaias. As bandas que aparecem positivas, com 401 pares de base, representam carrapatos infetados por *R. rickettsii*; B) Microscopia óptica de imunofluorescência indireta (RIFI) de cobaia (GAA7-B), com titulação positiva na diluição de 1:8192, frente aos anticorpos anti-*R. rickettsii*

Tabela 9 - Temperatura das cobaias infestadas por machos adultos pré-alimentados de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*, retirados em tempos diferenciados (GAA1-A – GAA9-A), durante 21 dias de monitoramento

DIA	TEMPERATURA DAS COBAIAS (°C)																	
	GAA1 A	GAA1 B	GAA2 A	GAA2 B	GAA3 A	GAA3 B	GAA4 A	GAA4 B	GAA5 A	GAA5 B	GAA6 A	GAA6 B	GAA7 A	GAA7 B	GAA8 A	GAA8 B	GAA9 A	
1	38,6	38,4	38,5	37,8	38,5	38,0	38,1	38,7	38,3	38,8	38,7	38,2	38,2	38,4	39,1	38,5	38,6	
2	38,4	38,5	38,5	38,3	38,6	38,3	38,8	38,4	38,7	38,8	38,1	38,5	38,4	38,4	38,6	38,4	39,4	
3	39,0	38,7	38,7	38,9	39,0	38,6	39,4	38,9	38,9	39,2	39,2	38,4	38,7	38,6	38,6	38,5	39,1	
4	38,6	39,1	38,6	38,7	39,0	39,0	39,1	39,0	39,0	39,0	38,6	38,6	38,5	38,3	38,7	38,7	38,9	
5	38,6	38,9	38,8	38,6	38,7	38,8	38,7	39,0	40,2	39,0	39,9	38,3	39,6	39,7	38,3	38,1	39,9	
6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,8	38,6	38,7	40,2	40,1	39,5	39,9	38,5	40,3	39,7	39,0	38,1	40,1	
7	38,1	38,2	38,7	38,4	38,7	38,4	38,6	40,3	40,1	40,0	40,5	39,9	40,2	40,1	40,1	38,9	40,5	
8	38,6	38,6	38,7	38,9	38,8	39,1	38,7	40,2	39,5	40,2	40,4	40,1	40,6	40,2	40,5	38,6	40,8	
9	38,0	38,3	38,6	38,4	38,7	39,4	39,1	39,6	39,4	39,8	40,0	39,8	40,6	40,2	40,9	39,1	40,3	
10	38,2	38,5	38,5	38,5	38,3	39,1	38,5	39,3	38,6	39,5	39,4	39,9	39,6	39,9	39,8	39,6	40,1	
11	38,4	38,6	38,5	38,4	38,9	38,9	38,6	39,3	38,6	39,3	39,3	39,7	39,3	40,0	39,0	39,7	39,9	
12	38,5	38,7	38,6	38,5	38,9	38,8	38,5	38,9	38,6	39,1	39,1	39,3	39,1	39,8	†	40,0	39,8	
13	38,4	38,6	38,5	38,4	38,6	38,7	38,5	38,7	38,7	39,0	39,0	39,3	39,0	39,7		39,8	39,5	
14	38,5	38,4	38,4	38,6	38,8	38,7	38,5	38,6	38,8	38,7	38,8	38,9	38,8	39,4		39,6	39,3	
15	38,5	38,5	38,7	38,5	38,6	38,6	38,6	38,7	38,6	38,8	38,7	38,8	38,6	39,1		39,5	39,2	
16	38,6	38,6	38,7	38,6	38,7	38,7	38,5	38,5	38,7	38,7	38,5	38,7	38,7	38,8		39,5	39,0	
17	38,4	38,5	38,6	38,6	38,6	38,6	38,6	38,5	38,8	38,6	38,4	38,5	38,7	38,8		39,5	38,8	
18	38,2	38,5	38,6	38,4	38,5	38,6	38,6	38,6	38,8	38,7	38,5	38,4	38,6	38,7		39,4	38,8	
19	38,4	38,6	38,5	38,5	38,7	38,5	38,7	38,6	38,6	38,7	38,5	38,5	38,6	38,7		39,4	38,7	
20	38,4	38,5	38,4	38,4	38,7	38,5	38,4	38,5	38,6	38,6	38,4	38,5	38,8	38,6		39,3	†	
21	38,3	38,6	38,3	38,6	38,6	38,7	38,4	38,5	38,7	38,5	38,6	38,4	38,7	38,5		38,8		

Legenda: (†) Óbito

Tabela 10 - Temperatura das cobaias infestadas por machos adultos pré-alimentados de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*, retirados em tempos diferenciados (GAA9-B – GAA17-B), durante 21 dias de monitoramento

DIA	TEMPERATURA DAS COBAIAS (°C)																
	GAA9 B	GAA 10 A	GAA 10 B	GAA 11 A	GAA 11 B	GAA 12 A	GAA 12 B	GAA 13 A	GAA 13 B	GAA 14 A	GAA 14 B	GAA 15 A	GAA 15 B	GAA 16 A	GAA 16 B	GAA 17 A	GAA 17 B
1	38.7	39.1	38.9	38.7	38.8	39.0	39.0	38.5	38.6	38.7	38.6	38.8	38.6	38.5	38.0	38.9	38.9
2	38.6	38.8	38.6	38.4	38.5	38.5	38.6	38.6	38.5	38.7	38.3	38.6	38.8	38.6	38.2	38.6	39.0
3	38.8	38.7	38.9	38.3	38.1	38.2	38.5	38.5	38.4	38.9	38.4	38.1	38.9	39.0	38.8	38.5	38.5
4	38.3	38.3	38.6	38.1	38.4	38.0	39.1	37.9	38.2	40,1	38.8	39.1	38.8	38.9	38.6	38.5	38.6
5	38.2	38.7	38.6	39.3	38.9	39.2	39.2	38.6	38.9	40,1	38.4	39.2	39,9	39.1	38.8	39.2	39.3
6	28.5	38.9	39,6	39,6	39,4	39.2	39.2	38.7	39,6	40,1	38.2	40,1	40,3	38.9	38.0	39,6	39.3
7	28.9	38.6	40,2	40,0	39,9	40,4	40,7	40,1	40,5	40,5	38.5	40,7	40,6	38.9	38.8	40,2	40,7
8	39,6	39.5	40,5	40,1	40,4	40,2	40,2	40,4	40,8	40,7	38.8	40,5	40,6	38.8	39,8	40,1	40,5
9	39,6	38.7	40,0	40,4	40,4	40,1	40,5	40,5	40,2	40,7	38.6	40,7	40,6	39,8	40,0	40,2	40,4
10	40,6	39,6	39,9	40,4	40,6	40,2	39,9	39.0	40,6	40,6	38.9	40,0	38.9	40,2	40,5	40,4	40,6
11	40,3	40,0	39.1	40,3	39,7	39,8	†	†	40,6	40,2	39,5	39.3	37.2	39,6	40,4	40,2	40,4
12	40,2	40,2	38,3	39,9	39.3	39.3			40,6	40,3	39,8	†	†	39.0	40,5	39.4	39,5
13	39,8	40,1	†	38.4	39.4	38.2			40,6	40,0	39,9			38.8	40,3	38.9	39,6
14	39,1	39,8		†	†	†			39,9	39,6	39.3			38.0	40,5	38.5	39.3
15	38.8	39.3							39,5	39,5	39.0			38.0	39,6	38.6	39.1
16	38.8	39.1							39.3	39.4	38.7			30.1	39.3	38.4	38.9
17	39.0	38.3							39.1	39.2	38.4			†	38.9	38.5	38.6
18	39.2	38.3							39.0	39.0	38.3				38.8	38.4	38.5
19	39,3	†							38.7	38.9	38.5				38.2	38.5	†
20	39.1								38.6	38.7	38.4				37.8	38.6	
21	38.8								38.7	38.5	38.3				†	38.7	

Legenda: (†) Óbito

Tabela 11 - Período de fixação de machos adultos pré-alimentados de *A. aureolatum* em cobaias, títulos de anticorpos para as esses hospedeiros 21 dias pós-infestação, diagnosticadas através da técnica de imunofluorescência indireta (RIFI), e sinais clínicos apresentados pelos animais

COBAIA	TEMPO FIXAÇÃO	TITULAÇÃO RIFI	SINAIS CLÍNICOS
GAA1 – A	1 M	N	-
GAA1 – B	1 M	N	-
GAA2 – A	3 M	N	-
GAA2 – B	3 M	N	-
GAA3 – A	5 M	N	-
GAA3 – B	5 M	N	-
GAA4 – A	10 M	N	-
GAA4 – B	10 M	1024	-
GAA5 – A	20 M	1024	-
GAA5 – B	20 M	512	-
GAA6 – A	40 M	1024	-
GAA6 – B	40 M	4096	NO
GAA7 – A	1 H	4096	NO, NE
GAA7 – B	1 H	8192	NO, NE
GAA8 – A	2 H	†	NE
GAA8 – B	2 H	512	-
GAA9 – A	4 H	†	NO, NE
GAA9 – B	4 H	16384	NO, PP
GAA10 – A	6 H	†	NO
GAA10 – B	6 H	†	NE
GAA11 – A	8 H	†	NO, NE, PP
GAA11 – B	8 H	†	NO, NE
GAA12 – A	12 H	†	NO, NE
GAA12 – B	12 H	†	NE
GAA13 – A	18 H	†	NE
GAA13 – B	18 H	8192	NO, NE
GAA14 – A	24 H	8192	NO, NE
GAA14 – B	24 H	16384	-
GAA15 – A	36 H	†	NO, NE, PP
GAA15 – B	36 H	†	NO, NE, PP
GAA16 – A	48 H	†	PP
GAA16 – B	48 H	†	NO, PP
GAA17 – A	> 48 H	16384	NE
GAA17 – B	> 48 H	†	NO, NE, PP

Legenda: (M) minutos; (H) horas; (N) sorologia negativa; (-) ausência de sinal clínico; (NO) necrose na orelha; (NE) necrose escrotal; (PP) perda de peso aparente; (†) óbito da cobaia

5 DISCUSSÃO

5.1 FIXAÇÃO DOS CARRAPATOS NAS COBAIAS

A fixação dos carrapatos nas cobaias (*C. porcellus*) ocorreu em tempos bastante distintos, sendo as médias: 80 minutos para as ninfas, 270 minutos para machos adultos em jejum e 15 minutos para machos adultos previamente alimentados por 48 horas em coelhos (*O. cuniculus*). Esses resultados expressam a alta especificidade de *A. aureolatum* frente a seus hospedeiros preferenciais, em seu estado de jejum.

Enquanto os carrapatos adultos são encontrados parasitando apenas mamíferos da Ordem Carnivora, preferencialmente das Famílias Procyonidae e Canidae (GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004; LABRUNA et al., 2005), as fases imaturas de *A. aureolatum* utilizam aves e, possivelmente, roedores da Subordem Caviomorpha como hospedeiros (GUGLIELMONE et al., 2003; ARZUA; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2005; LABRUNA, 2009; LABRUNA et al., 2011b; OGRZEWALSKA et al.; 2012). Encontram-se inclusive nesse grupo de roedores as famílias Echimyidae e Caviidae, sendo pertencente à primeira, o roedor *E. spinosus*, potencial hospedeiro de *A. aureolatum* e amplificador de *R. rickettsii* na Mata Atlântica (FONSECA, 1935; GUGLIELMONE et al., 2003; LABRUNA, 2009); e à última, roedores do gênero *Cavia*, comuns na América do Sul e hospedeiros de diversas espécies de carrapatos em suas formas imaturas (NAVA; MANGOLD; GUGLIELMONE, 2006a; NAVA; MANGOULD; GUGLIELMONE, 2006b; VENZAL et al., 2008; GUGLIELMONE; NAVA, 2010). Dentre as espécies do gênero, *C. porcellus* é amplamente utilizada em experimentos laboratoriais, popularmente nomeada “cobaia”.

O tempo médio que os carrapatos se fixaram nas cobaias foi menor em ninfas do que em adultos em jejum, porque sendo as cobaias do mesmo grupo taxonômico de seus hospedeiros preferenciais, estas servem como boas hospedeiras de *A. aureolatum* em condições de laboratório. Corroborando com esses resultados, Pinter (2004) concluiu que cobaias (*C. porcellus*) e galinhas (*Gallus gallus domesticus*) são

os melhores hospedeiros experimentais para larvas e ninfas de *A. aureolatum*, após realizar testes com diferentes animais.

O tempo que os machos adultos pré-alimentados demoraram a se fixar nas cobaias foi expressivamente menor que o tempo para ninfas e adultos em jejum. Isso ocorre porque carrapatos machos, exclusivamente, quando se desafixam do hospedeiro em busca de fêmeas para copular (URQUHART et al., 1998; BARROS-BATTESTI et al., 2006), necessitam se fixar rapidamente no mesmo hospedeiro ou em qualquer outro, devido ao risco de sofrerem desidratação e morrerem, quando o ambiente em que o hospedeiro se encontra não possui condições ideais para sua sobrevivência, perdendo assim, especificidade parasitária.

5.2 TEMPO NECESSÁRIO PARA TRANSMISSÃO DE *R. RICKETTSII* EM NINFAS E ADULTOS DE *A. AUREOLATUM*

Foi observado um tempo mínimo de transmissão de *R. rickettsii* dos carrapatos infectados para os hospedeiros: 12 horas para ninfas, 10 horas para machos adultos em jejum e 10 minutos para machos adultos alimentados por 48 horas em coelhos. Não há estudo semelhante com carrapatos do gênero *Amblyomma*. Para a bactéria *R. rickettsii*, estudos desse aspecto foram realizados com outros gêneros de carrapatos, sendo as espécies estudadas: *D. andersoni*, *D. venustus*, *D. modestus* e *H. leporispalustris*.

Trabalhos conduzidos por Ricketts (1909) resultaram em um período mínimo de duas a 10 horas de fixação do carrapato *D. venustus* em cobaias, para que ocorra a transmissão de *R. rickettsii*. No mesmo trabalho, o autor diz que esse período não pode ser bem determinado e varia de acordo com o “vigor da alimentação” do carrapato. Também não é especificado se foram utilizados ninfas, adultos e/ou adultos pré-alimentados para os experimentos. De qualquer forma, esse período é menor do que o encontrado para carrapatos não-alimentados no presente estudo, e maior para os carrapatos que foram previamente alimentados.

Moore (1911) observou em experimento semelhante, que carrapatos adultos, das espécies *D. andersoni* e *D. modestus*, pré-alimentados em cobaias por 5 a 10 dias, transmitiam *R. rickettsii* para cobaias em um período mínimo de 01:45 horas.

Esse período é maior do que o obtido para a transmissão da bactéria por *A. aureolatum*, provavelmente devido às diferenças fisiológicas entre os gêneros de carrapatos, e diferenças nos potenciais de transmissão que essas espécies possuem. Spencer e Parker (1923), ao realizarem testes de infectividade de *R. rickettsii* em cobaias, utilizando carrapatos adultos *H. leporispalustris* como vetores, concluíram que em 48 a bactéria é transmitida para o hospedeiro. Porém, não foram realizados testes com um tempo inferior a esse. Dessa forma, é provável que também essa espécie de carrapato transmita *R. rickettsii* para o hospedeiro vertebrado em um menor período de tempo.

Em dois estudos realizados com a bactéria *E. phagocytophila* (KATAVOLOS et al., 1998; VIGNES et al., 2001), pertencente também à Ordem Rickettsiales, foram encontrados períodos mínimos de 24 e 30 horas, respectivamente, para que se transmitisse a bactéria reativada para camundongos (*Mus musculus*), usando como vetores ninfas de “deer tick”, *I. scapularis* (sendo *I. dammini* sua espécie sinônima). No primeiro estudo, Vignes et al. (2001) retiraram os carrapatos no período mínimo de 24 horas, não sendo possível detectar se os camundongos se infectaram antes desse momento. Em ambos os estudos, os resultados diferem do obtido com ninfas de *A. aureolatum*, pois essas necessitam de um menor tempo para infectarem o seu hospedeiro. Essa diferença pode ser devida às diferenças fisiológicas dos patógenos, dos vetores e dos hospedeiros utilizados.

Estudos com a bactéria gram-negativa *B. burgdorferi*, também transmitida por carrapatos, demonstraram um período mínimo de 48 horas para infecção em coelhos, utilizando-se como vetor, fêmeas adultas de *I. dammini* (PIESMAN et al., 1991), e 36 horas para infecção em camundongos, utilizando-se como vetor, ninfas de *I. dammini* (PIESMAN, 1993). Outro trabalho semelhante observou a transmissão de *B. burgdorferi* por carrapatos *I. scapularis* em um período mínimo de 48 horas, também em camundongos (PIESMAN; SCHNEIDER; ZEIDNER, 2001). Sood et al. (1997) observaram pessoas que manifestavam sintomas da Doença de Lyme, transmitida através da picada de *I. scapularis*, e pelo relato dessas pessoas, chegaram à conclusão de que seria necessário que o carrapato permanecesse fixado por no mínimo 72 horas no ser humano para transmitir *B. burgdorferi* em sua forma patogênica. Todos os resultados diferem dos achados no presente trabalho,

sendo necessário um tempo menor para que ocorra a transmissão de *R. rickettsii*, tanto na fase de ninfa quanto de adultos de *A. aureolatum*.

Através do resultado obtido, supõe-se que adultos e ninfas de *A. aureolatum* em jejum necessitem de um período mínimo de 10 e 12 horas, respectivamente, para que ocorra a reativação de *R. rickettsii* em suas células, e essas iniciem o processo de multiplicação e circulação no organismo do hospedeiro. Após esse processo, a bactéria já se encontra livre nas glândulas salivares dos carrapatos e são transmitidas através das trocas de fluidos que ocorrem durante o repasto sanguíneo. Por isso, o período de transmissão para carrapatos adultos machos que já foram alimentados é breve, de 10 minutos.

5.3 SINTOMATOLOGIA DAS COBAIAS INFECTADAS EM DIFERENTES TEMPOS DE FIXAÇÃO

Das 88 cobaias utilizadas nos experimentos, 58 apresentaram infecção por *R. rickettsii*. Do total de cobaias infectadas, apenas uma apresentou soroconversão sem passar por um estado febril característico de riquetsemia. Em experimentos realizados por Spencer e Parker (1923, 1930), foi observada uma soroconversão sem sinais clínicos da infecção por *R. rickettsii*, em cobaias inoculadas com carrapatos infectados, triturados em solução aquosa. Segundo Ormsbee et al. (1977), infecções não-aparentes acompanhadas por soroconversão são encontradas raramente em cobaias.

Dos sinais clínicos observados – necrose na extremidade das orelhas, necrose escrotal e perda de peso aparente, o mais comum encontrado foi a necrose na extremidade das orelhas, atingindo 67% das cobaias infectadas. Esse sintoma já foi bem descrito por Ricketts (1906), que o definiu como frequente, mas não constante. Assim como a necrose na extremidade das orelhas, a necrose escrotal demonstrou ser um sinal clínico comum à infecção por *R. rickettsii*, afetando 53% das cobaias infectadas. Ambos os sinais são apontados em diversos estudos (RICKETTS, 1909; SPENCER; PARKER, 1923; LABRUNA et al., 2011; SOARES et al., 2012) e não demonstram estar relacionados com o estágio do carrapato ou o

tempo de fixação desse ao hospedeiro, mas sim pela variação interespecífica da cobaia.

Apenas 6% das cobaias infectadas através de ninfas e 14% das cobaias infectadas através de machos adultos em jejum vieram a óbito. Em contraste com esses resultados, 52% das cobaias infectadas através de machos adultos pré-alimentados morreram. Estudos realizados por Labruna et al. (2011) observaram o óbito de 50% das cobaias infestadas por larvas e ninfas de *A. aureolatum* infectados por *R. rickettsii*. Porém, em contraste com o presente estudo, as cobaias eram infestadas com um número bem maior de carrapatos – 50 ninfas e entre 1000 a 2000 larvas para cada cobaia. Dessa forma, parece haver uma relação positiva entre a concentração da bactéria reativada no organismo de *A. aureolatum*, que é transmitida para o hospedeiro no momento do repasto sanguíneo, e a porcentagem de óbitos nos grupos de cobaias infestadas.

5.4 RELAÇÃO DOS RESULTADOS COM A EPIDEMIOLOGIA DE *R. RICKETTSII* E *A. AUREOLATUM* EM SÃO PAULO

O ciclo epidemiológico de *R. rickettsii* em regiões de Mata Atlântica da Grande São Paulo é bem específico e conduzido principalmente, pelas necessidades ambientais de seu vetor, o carrapato *A. aureolatum*. Por se tratar de uma espécie que necessita de um ambiente com umidade alta e temperaturas amenas (RODRIGUES et al., 1997; PINTER et al., 2004), esse carrapato não é encontrado em áreas distantes de vegetação densa e úmida. Porém, na região metropolitana de São Paulo, com o crescimento rápido da área urbana, essa se funde com as áreas rurais e com locais de mata preservada, rapidamente. Quando os moradores passam a viver em maior proximidade com as matas, pode-se ocorrer mais facilmente o contato com carrapatos *A. aureolatum*, podendo estes estar infectados com *R. rickettsii* (GUGLIELMONE et al., 2003; OGRZEWALSKA et al., 2012).

Esse relação ocorre, frequentemente, através de cães domésticos criados semi-livres, que frequentam as matas em busca de alimento e/ou outros cães para reprodução, retornando às moradias onde vivem em algum período do dia. Como os

cães são excelentes hospedeiros para *A. aureolatum* em sua forma adulta (RODRIGUES et al., 1997), estes adquirem os carrapatos na mata, que são transportados para as residências (GUGLIELMONE et al., 2003). Por serem um dos hospedeiros principais de *A. aureolatum*, os cães que conduzem esses carrapatos não sofrem nenhum sintoma da infecção por *R. rickettsii* (PINTER et al., 2004).

Dessa forma, o contato dos carrapatos adultos com os seres humanos ocorre no momento em que o cão se aproxima das pessoas que vivem nessas residências. Os machos adultos de *A. aureolatum*, quando se desafixam do cão em busca de fêmeas para copular, perdem especificidade parasitária devido ao ambiente hostil, podendo se fixar nas pessoas que entram em contato direto com os cães parasitados (GUGLIELMONE et al., 2003; PINTER et al., 2004; OGRZEWALSKA et al., 2012).

A partir do ciclo epidemiológico descrito, torna-se claro que os carrapatos que entram em contato com as pessoas são principalmente, machos adultos que já estavam se alimentando em cães, ou seja, já possuem a bactéria reativada e concentrada em seu organismo, pronta para ser transferida juntamente com os fluidos do repasto sanguíneo. De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, o carrapato *A. aureolatum* nessas condições pode transmitir *R. rickettsii* e causar infecção nas cobaias em um período mínimo de 10 minutos. Este período é provavelmente, similar para hospedeiros vertebrados susceptíveis, entre eles o homem, causando a Febre Maculosa Brasileira.

É provável que o parasitismo de ninfas e adultos não alimentados de *A. aureolatum* em humanos seja menos frequente, devido à alta especificidade parasitária dessa espécie de carrapato (GUGLIELMONE et al., 2003). Para que ocorra o parasitismo de *A. aureolatum* em uma dessas fases, é necessário que a pessoa frequente o interior de matas úmidas, local onde esse carrapato encontra condições ideais para viver. Além de entrar em contato com os carrapatos em vida livre, a pessoa deve permanecer com eles em seu corpo até que ocorra a fixação. De acordo com os resultados obtidos, ninfas e adultos de *A. aureolatum* podem demorar cerca de 80 a 270 minutos, respectivamente, para se fixarem em hospedeiros não específicos como as cobaias e provavelmente, o homem.

6 CONCLUSÃO

Através da análise dos dados obtidos, podemos concluir que:

- Ninfas e adultos em jejum de *A. aureolatum* demoram um tempo longo para se fixarem em hospedeiros inespecíficos, como as cobaias (80 e 270 minutos, respectivamente), enquanto adultos pré-alimentados durante 48 horas em coelhos demandam um tempo bem menor (em média, 15 minutos), devido à perda de especificidade parasitária;
- Ninfas não alimentadas de carrapatos *A. aureolatum*, infectados por *R. rickettsii*, necessitam realizar o repasto sanguíneo por um período mínimo de 12 horas, para que ocorra a transmissão da bactéria ao hospedeiro vertebrado, utilizando-se cobaias (*C. porcellus*) como modelo experimental;
- Adultos não alimentados de *A. aureolatum*, infectados por *R. rickettsii*, necessitam realizar o repasto sanguíneo por um período mínimo de 10 horas, para que ocorra a transmissão da bactéria ao hospedeiro vertebrado, utilizando-se cobaias (*C. porcellus*) como modelo experimental;
- Adultos de carrapatos *A. aureolatum*, infectados por *R. rickettsii* e pré-alimentados em coelhos (*O. cuniculus*) por 48 horas, necessitam realizar o repasto sanguíneo por um período mínimo de 10 minutos, para que ocorra a transmissão da bactéria ao hospedeiro vertebrado, utilizando-se cobaias (*C. porcellus*) como modelo experimental;
- Os sinais clínicos mais comuns apresentados em cobaias infectadas por *R. rickettsii* foram necrose na extremidade das orelhas (67%) e necrose escrotal (53%);
- Um baixo número de cobaias infestadas por ninfas e adultos não alimentados de *A. aureolatum* vieram a óbito (6 e 14%, respectivamente). Em contraste, mais da metade das cobaias (54%) infestadas por carrapatos pré-alimentados em coelhos por um período de 48 horas vieram a óbito. Esses resultados podem estar relacionados a uma maior concentração ou uma maior virulência da bactéria que é inoculada no hospedeiro durante o repasto sanguíneo do carrapato;

- De acordo com o ciclo epidemiológico de *R. rickettsii* em áreas endêmicas de São Paulo e sua região metropolitana, a maioria dos casos de infestação em humanos supostamente ocorre através de carrapatos machos adultos pré-alimentados em cães domésticos, que vivem em áreas próximas a matas. Com os resultados obtidos para os carrapatos nessas condições (utilizando-se cobaias como hospedeiros experimentais), o período de transmissão da bactéria ao hospedeiro é muito mais baixo do que o período mínimo de duas horas divulgado pelos órgãos de saúde e pela mídia, à população;
- A FMB em São Paulo e sua região metropolitana possui características epidemiológicas distintas das outras áreas onde ocorre no mundo, devido às diferenças ambientais, dos hospedeiros e do carrapato vetor. Dessa forma, torna-se necessário um trabalho de prevenção diferenciado nesses locais, através da divulgação pelos órgãos de saúde locais, principalmente em relação ao risco causado por cães domésticos que possuem contato frequente com a Mata Atlântica ou seus fragmentos, a fim de que se evite esse tipo de atividade.

REFERÊNCIAS

- ANDERSON, J. F.; MAGNARELLI, L. A. Biology of ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, p. 195-215, 2008.
- ARZUA, M.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari: Ixodidae) of the Museu de História Natural Capão do Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. **Revista brasileira de Zoologia**, v. 22, p. 623-632, 2005.
- AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.
- 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: Instituto Butantan, 2006.
- BONVICINO, C. R.; OLIVEIRA, J. A.; D'ANDREA, P. S. **Guia de roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseados em caracteres externos**. Rio de Janeiro: Centro Pan-Americano de Febre Aftosa – OPAS/OMS, 2008. 120p.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. **Biology of Rickettsial Diseases**, v. 1, p. 33-50, 1988.
- BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsiosis en Mexico. **Revista del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales**, v. 8, p. 3-14, 1947.
- CHOMKZYNSKI, P. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. **Biotechniques**, v. 15, p. 532–537, 1993;
- CUNHA, N. C.; FONSECA, A. H.; REZENDE, J.; ROZENTAL, T.; FAVACHO, A. R. M.; BARREIRA, J. D.; MASSARD, C. L.; LEMOS, E. R. S. First identification of natural infection of *Rickettsia rickettsii* in the *Rhipicephalus sanguineus* tick, in the State of Rio de Janeiro. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, p. 105-108, 2009.
- DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEYA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON, J. J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.
- DIAS, E.; MARTINS, A.; RIBEIRO, D. J. Thypho exanthematico no Oeste de Minas Gerais. **Brasil-Médico**, v. 51, n. 24, p. 651-655, 1937.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P. J.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RIKIHISA, Y.; RURANGIRWA, F. R. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophyla*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 51, p. 2145-2165, 2001.

EBEL, G. D.; KRAMER, L. D. Short report: duration of tick attachment required for transmission of powassan virus by deer ticks. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 3, p. 268-271, 2004.

ELFVING, K.; OLSEN, B.; BERGSTROM, S.; WALDESTROM, J.; LUNDKVIST, A.; SJOSTEDT, A.; MEJLON, H.; NILSSON, K. Dissemination of spotted fever *Rickettsia* agents in Europe by migrating birds. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. 1-5, 2010.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A. A. A review of the ticks (Acari: Ixodida) of Brazil, their hosts and geographical distribution. 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p. 453-470, 2000.

FONSECA, F. Validade de espécie e ciclo evolutivo de *Amblyomma striatum* Koch, 1844 (Acarina, Ixodidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 9, p. 43-58, 1935.

GALVÃO, M. A. M. **Febre maculosa em Minas Gerais**: um estudo sobre a distribuição da doença no estado e seu comportamento em área de foco periurbano. 1996. 114 f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical). Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Belo Horizonte, Minas Gerais, 1996.

GEHRKE, F. S.; GAZÊTA, G. S.; SOUZA, E.R.; RIBEIRO, A.; MARRELLI, M. T.; SCHUMAKER, T. T. S. Infecting *Rhipicephalus sanguineus* and *Ctenocephalides felis* collected from dogs in a Brazilian Spotted Fever focus in the State of Rio de Janeiro/Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 267-268, 2009.

GILFORD, J. H.; PRICE, W. H. Virulent-avirulent conversions of *Rickettsia rickettsii* in vitro. **Biochemistry**, v. 41, p. 870-873, 1955.

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

GUEDES, E.; LEITE, R.; PRATA, M. C. A.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 841-848, 2005.

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; VENZAL, J. M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J. E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae):

hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, p. 273-288, 2003.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Rodents of the Subfamily Caviinae (Hystricognathi, Caviidae) as hosts for hard ticks (Acari: Ixodidae). **Mastozoologia Neotropical**, v. 17, n. 2, p. 279-286, 2010.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. D.; BARROS-BATTESTI, D.M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo: FAPESP, 2001. 213 p.

HAYES, S. F.; BURGDORFER, W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 2, p. 779-785, 1982.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, M. S.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C.; VIDOTTO, O.; SCHUMACKER, T. T. S.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p. 93-97, 2004.

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

HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; CASAGRANDE, R. A.; SAITO, T. B.; ROSA, S. C.; OGRZEWALSKA, M.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1, p. 109-117, 2009.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3-14, 2004.

KATAVOLOS, P.; ARMSTRONG, P. M.; DAWSON, J. E.; TELFORD III, S. R. Duration of tick attachment required for transmission of Granulocytic Ehrlichiosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1422-1425, 1998;

KEIRANS, J. E.; DURDEN, L. A. Ticks systematic and identification. In:_____. **Tick Borne Diseases of Humans**. Washington, DC: ASM Press, 2005. p. 123-140.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an endemic area for Brazilian spotted fever in the state of São Paulo, Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S.; SANA, D. A.; JÁCOMO, A. T.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S. J.;

MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, GOMES, A. A.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F.; MORATO, R. L.; ALHO, C. J.; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 36, n. 1-2, p. 149-163, 2005.

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

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

LABRUNA, M. B.; MATTAS, S. V.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; SOUZA, R.; OTEO, J.; ZAVALA-CASTRO, J. *Rickettsioses* in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, n. 2, p. 2435-2457, 2011a.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; ALMEIDA, A. P.; PINTER, A. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 829-834, 2011b.

MACDADE, J. E.; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 40, p. 287-309, 1986.

MONTEIRO, J. L. Estudos sobre o typho exantemático de São Paulo. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 6, p. 1-136, 1931.

MONTEIRO, J. L. Comportamento experimental do coelho aos vírus do "Typho Exantemático de S. Paulo" e da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 8, p. 41-47, 1933.

MOORE, J. J. Time relationships of the wood-tick in the transmission of Rocky Mountain Spotted Fever. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 8, p. 339-347, 1911.

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

MOREIRA, J.A.; MAGALHÃES, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. **Brasil-Médico**, v. 44, p. 465-470, 1935.

MUNDERLOH, U. G.; HAYES, S. F.; CUMMINGS, J.; KURTTI, T. J. Microscopy of Spotted Fever Rickettsia movement through tick cells. **Microscopy and Microanalysis**, v. 4, n. 2, p. 155-121, 1998.

NAVA, S.; MANGOULD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. The natural hosts for larvae and nymphs of *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 40, p. 123-131, 2006a.

NAVA, S.; MANGOULD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. The natural hosts of larvae and nymphs of *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 140, p. 124-132, 2006b.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D. G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; COSTA, F. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian Spotted Fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, p. 1-18, 2012.

ORMSBEE, R.; PEACOCK, M.; GERLOFF, R.; TALLENT, G.; WIKE, D. Limits of rickettsial infectivity. **Infection and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 239-245, 1977.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; GUEDES, E.; SILVEIRA, I.; RICHTZENHAIN, L. J.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infections of dogs, horses, and ticks in Juiz de Fora, southeastern Brazil, and isolation of *Rickettsia rickettsii* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 25, p. 148-155, 2011.

PADDOCK, C. D.; FERNANDEZ, S.; ECHENIQUE, G. A.; SUMMER, J. W.; REEVES, W. K.; ZAKY, S. R.; REMONDEGUI, C. E. Rocky Mountain spotted fever in Argentina. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, p. 687-692, 2008.

PATINO-CAMARGO, L. Nuevas observaciones sobre un tercer foco de fiebre petequial (maculosa) en el hemisferio americano. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, v. 20, p. 1112-1124, 1941.

PIESMAN, J.; MAUPIN, G. O.; CAMPOS, E. G.; HAPP, C. M. Duration of adult female *Ixodes dammini* attachment and transmission of *Borrelia burgdorferi*, with description of a needle aspiration isolation method. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 163, p. 895-897, 1991.

PIESMAN, J. Dynamics of *Borrelia burgdorferi* transmission by nymphal *Ixodes dammini* ticks. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 167, p. 1082-1085, 1993.

PISMAN, J.; SCHENEIDER, B. S.; ZEIDNER, N. S. Use of quantitative PCR to measure density of *Borrelia burgdorferi* in the midgut and salivary glands of feeding tick vectors. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 11, 4145-4148, 2001.

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

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell cultura from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Science**, v. 1078, p. 523-530, 2006.

PINTER, A.; PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Sero evaluation on dogs and humans from a Spotted fever endemic área in the state of São Paulo, Brazil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, p. 247-252, 2008.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

RICKETTS, H. T. Observations on the virus and means of transmission of Rock Mountain Spotted Fever. **Memorial Institute for Infectious Diseases**, v. 1, p. 141-153, 1906;

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rocky Montain Spotted Fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, v. 76, p. 843-855, 1909.

RODANICHE, E. C. Natural infection of the tick *Amblyomma cajennense* with *Rickettsia rickettsii* in Panama. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, p. 696-699, 1953.

RODRIGUES, D. S.; CARVALHO, H. A.; FERNANDES, A. A.; FREITAS, C. M. V.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Biology of *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (Acari: Ixodidae) on Some Laboratory Hosts in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 6, p. 996-999, 1997.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. S.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMACKER, 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. 265-270, 2005.

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain Spotted Fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, p. 139-151, 2012.

SOOD, S. K.; SALZMAN, M. B.; JOHNSON, J. B.; HAPP, C. M.; CARMODY, L.; RUBIN, L. G.; HILTON, E.; PIESMAN, J. Duration of tick attachment as a predictor of the risk of Lyme Disease in an area wich Lyme Disease is endemic. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 175, p. 895-897, 1997.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; UCHOA, F. C.; HORTA, M. C.; SOUZA, S. S. L.; BORBA, R. C. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochaeris hydrochoerus* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, p. 116-121, 2009.

SPENCER, R. R.; PARKER, R. R. Rocky Mountain spotted fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. **Public Health Reports**, v. 38, p. 333-339, 1923.

SPENCER, R. R.; PARKER, R. R. studies on Rocky Mountain Spotted Fever, infection by other means than tick bite. **Hygienic Laboratory bulletin**, v. 154, p. 60-63, 1930.

URQUHART, G. M.; ARMOUR, J.; DUNN, A. M.; JENNINGS, F. W. **Parasitologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan SA, 1998. 306 p.

VALLEJO-FREIRE, A. Spotted fever in Mexico. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 19, p. 159-180, 1946.

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; SOUZA, C. G.; FÉLIX, M. L.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts and seasonality of the vector of *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v. 155, p. 104-109, 2008.

VIEIRA, A. M. L.; SOUZA, C. E.; LABRUNA, M. B.; MAYO, R. C.; SOUZA, S. S. L.; CAMARGO_NEVES, V. L. F. **Manual de Vigilância Acarológica, Estado de São Paulo**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 2004. 62 p.

VIGNES, F.; PIESMAN, J.; HEFFERNAN, R.; SCHULZE, T.; STAFFORD, K. C.; FISH, D. Effect of tick removal on transmission of *Borrelia burgdorferi* and *Ehrlichia phagocytophila* by *Ixodes scapularis* nymphs. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 773-778, 2001;

WEISS, E.; MOULDER, J. W. The Rickettsias and Chlamydias. In: KREIG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1984. p. 687-739.

WU, F. J.; HUANG, D. B.; PANG, K. R.; TYRING, S. K. Rickettsial infections around the world, part 1: Pathophysiology and the Spotted Fever Group. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 9, n. 2, p. 54-62, 2005.