FELIPE DA SILVA KRAWCZAK

Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados

SÃO PAULO

2012

FELIPE DA SILVA KRAWCZAK

Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados

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 Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T.2741 Krawczak, Felipe da Silva
FMVZ Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados / Felipe da Silva Krawczak. -- 2012.
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2013.

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 ovale*. 2. *Rickettsia parkeri*. 3. Transmissão transestadial e transovariana. 4. Competência vetorial. 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 da dinâmica da infecção por Rickettsia parkeri cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos Amblyomma ovale naturalmente infectados", protocolado sob o nº 2191/2011, utilizando 18 (dezoito) Calomys callosus e 6 (seis) coelhos, 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 22/6/2011.

São Paulo, 22 de junho de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

Av. Prof. Dr. Orlando Marques de Paiva, nº87
Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
São Paulo/SP – Brasil
05508-270

Fax: +55 11 3032-2224 / 3091-7757
Fone: + 55 11 3091-7671/7676
E-mail: fmvz@usp.br
http://www.fmvz.usp.br

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: KRAWCZAK, Felipe da Silva

Título: Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados

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_____

DEDICATÓRIA E AGRADECIMENTOS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A minha família, pois devo todas as minhas conquistas ao apoio de vocês, seja para comemorar nos momentos de vitória e alegria como também o amparo nos momentos difíceis.

Minha dedicatória é em especial ao meu pai Mauri Krawczak por ser meu melhor amigo e conselheiro e a minha mãe por ser meu anjo guardião e por sempre acreditar em mim,

As minhas queridas avós Anilda Amaral da Silva e Hilda Kommers Krawczak (*in memorian*) por todo amor e carinho,

A minha irmã Francieli Krawczak por sempre torcer pelo meu sucesso,

Aos demais familiares:

Tios e Padrinhos: Leonir Krawczak, Danila (tia Dani) , Selenir (tia Nice), Ereni (*in memorian*), Marcelo e Jairo,
Aos primos e primas: Fabiana, Lidiane, Tiago (quase irmão), Katiane, Kaoanne, Lucas (inicío geração $F_{2,}$ hehehe), Luana (minha afilhada), Juliane,
Aos meus avôs Arno (*in memorian*) e Manoel (*in memorian*).

Obrigado família por toda ajuda nos momentos que precisei de vocês e por saber que sempre que precisar poderei contar com o amor de todos.

Sem eles, nada seria possível.....

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e Jesus, que fizeram tudo isto se tornar possível, pela minha vida e pelo restabelecimento total da minha saúde, depois do problema que tive em 2008 e também pela oportunidade de estar concluindo com êxito mais esta etapa da minha vida,

Aos meus pais pelo amor incondicional e por todo incentivo aos meus estudos, apesar da saudade gerada pela distância e por serem meu maior exemplo de vida,

Ao professor Dr. Marcelo Bahia Labruna, por confiar em meu potencial e por todas as oportunidades, ensinamentos, pelo exemplo de profissionalismo e pela grande amizade,

Ao professor Dr.Luís Antônio Sangioni, a todas as oportunidades, por acreditar no meu potencial, também por todos os conselhos e por sempre escutar minhas idéias,

A professora Dra. Sônia Terezinha Lopes dos Anjos pela primeira oportunidade de estágio e pela amizade,

Ao professor e amigo Dr. Fábio Gregori, obrigado por todas as explicações pelos ensinamentos passados, pela paciência nas explicações e pelas caronas ao bandejão,

Ao professor Dr. Paulo Brandão, obrigado pela amizade e pelos ensinamentos,

A professora Dra. Solange Maria Gennari por todas oportunidades e pelos ensinamentos,

Ao professor Dr Ricardo Augusto Dias, pela amizade e pelos ensinamentos,

A todos os Professores da Universidade Federal de Santa Maria que fizeram parte da minha formação profissional até o presente momento, muito obrigado,

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da FMVZ/USP, por durante estes 2 anos de mestrado terem sido minha família em SP, pela amizade e por todos os ensinamentos compartilhados.

Especialmente ao: Thiago (vida louca mano), Jonas (vai Corinthias), João Fábio (acreditem, *Rangelia* existe) conterrâneo e amigo de longa data, Ricardo (Lobinho), Júlia (Menino) grande amiga, Francisco (Chapadinha, Maranhão e Chico convicção) grande amigo, Andrea (minha irmã) e grande amiga, Arlei por todos ensinamentos (os tripanossomatídeos), Fernanda (tenho que olhar as Vero, vamos tomar um café), Danilo (uai, é mesmo), Diego (tenho que ir no Butantã, os argasídeos), Amália (Somália, ai meu), Tati (tenho que ir no Bacharel, dona do Tatimóvel) obrigado por todas as caronas, Igor (vou escutar um Arrocha nervoso), Mariana (a Alice) e a Maria (PCR, vou correr um gel) muito obrigado à todos vocês,

Aos Funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS) da FMVZ/USP: Danival, Cris, Virgínia, Pedrinho, Renatinho, Dra.Hilda, Marcos, muito obrigado por toda ajuda e auxílio quando solicitados que não foram poucas vezes, sempre atendendo com agilidade e cordialidade e em especial ao Washington que me auxiliou bastante nas extrações de DNA, meu muito obrigado a todos vocês.

Aos meus amigos e amigas que sempre me apoiaram nos momentos de dificuldades, obrigado pelas palavras amigas e em especial a minha grande amiga Suzete (Su), muito obrigado por toda ajuda quando precisei pela cordialidade e por todo carinho,

À FAPESP pelo auxílio financeiro processo 2010/12993-6

E a todas as pessoas que fizeram parte desta etapa de enorme aquisição de conhecimentos durante o meu mestrado e que não foram citadas diretamente.

MUITO OBRIGADO A TODOS.....

RESUMO E ABSTRACT

RESUMO

KRAWCZAK, F. S**. Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados.** [Dynamics of the infection by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest, the etiologic agent of a novel rickettsiosis in Brazil, in naturally infected *Amblyomma ovale* Koch, 1844 ticks]. 2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

No início de 2010, uma nova riquetsiose foi descrita em um paciente humano, que foi infestado por carrapato em Barra do Una, no litoral sul do Estado de São Paulo. Técnicas moleculares indicaram que esta nova doença foi causada por uma nova cepa de riquétsia, que foi denominada de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica. Estudos mais recentes demonstraram que 10 a 15% dos carrapatos *Amblyomma ovale,* coletados em áreas de Mata Atlântica nos estados de São Paulo (incluindo a área do caso índice da infecção humana em Barra do Una) e Santa Catarina estavam infectados com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Desta forma, o presente estudo iniciou-se a partir de fêmeas ingurgitadas de *A. ovale*, coletadas de cães naturalmente infestados em Barra do Una. No laboratório, foi constatado por PCR que parte dessas fêmeas (6,25%) estavam naturalmente infectadas por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica; os ovos dessas fêmeas foram utilizados para formar uma colônia de *A. ovale* naturalmente infectada por *R. parkeri.* Ovos de fêmeas não infectadas, foram utilizados para formar uma colônia não infectada. As duas colônias foram estudadas de forma paralela no laboratório, visando analisar e quantificar a transmissão transestadial e transovariana de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica e a competência vetorial do *A. ovale*. As infestações por larvas foram realizadas em roedores (*Calomys callosus*), enquanto ninfas e adultos foram alimentados em *Oryctolagus cunicullus* (coelho doméstico). Amostras de 10 indivíduos de cada uma das fases (larvas, ninfas e adultos F_1, ovos, larvas e ninfas F_2) foram testadas individualmente por um sistema de taqman real-time PCR, para presença de *Rickettsia* spp. Os soros sanguíneos de todos animais infestados foram testados por imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri,* no dia zero e 21 dias após a infestação por carrapatos, a fim de verificar soroconversão para antígenos de *Rickettsia*. Os resultados obtidos demonstraram 100% de transmissões transestadial

(larva para ninfas e ninfas para adultos) e transovariana de *R. parkeri* em *A. ovale,* uma vez que todas as amostras de ovos, larvas, ninfas e adultos do grupo infectado foram positivas na PCR. Larvas e ninfas de *A. ovale* demonstraram alta competência vetorial, pois todos animais infestados por esses estágios infectados soroconverteram para *R. parkeri.* Por outro lado, adultos foram parcialmente competentes, pois apenas metade dos coelhos soroconverteu após ser infestada com carrapatos adultos infectados. Nenhum carrapato do grupo controle foi positivo na PCR, assim como nenhum animal deste grupo soroconverteu para *R. parkeri.* Fêmeas infectadas por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica tiveram parâmetros reprodutivos inferiores aos das fêmeas não infectadas, indicando algum efeito deletério da infecção por este agente sobre os carrapatos. Os resultados sugerem a importância do carrapato *A. ovale* na epidemiologia desta nova riquetsiose brasileira, assim como sugerem uma capacidade vetorial de *A. ovale* para *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, uma vez que este carrapato é frequentemente encontrado infestando humanos no bioma de Mata Atlântica.

Palavras-chave: *Amblyomma ovale. Rickettsia parkeri.* Transmissão Transestadial e Transovariana. Competência Vetorial.

ABSTRACT

KRAWCZAK, F.S**. Dynamics of the infection by *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest, the etiologic agent of a novel rickettsiosis in Brazil, in naturally infected *Amblyomma ovale* Koch, 1844 ticks.** [Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados].2013. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

In early 2010, a novel rickettsiosis was described in a human patient that had been infested by a tick in Barra do Una, southern coast of the state of São Paulo, Brazil. Molecular tests indicated that the disease was caused by a new rickettsial strain, named *Rickettsia parkeri* strain Atlantic rainforest. More recent studies demonstrated that 10 to 15% of *Amblyomma ovale* ticks*,* collected in Atlantic rainforest areas in the states of São Paulo (including the human index case area in Barra do Una) and Santa Catarina were infected with *R. parkeri* strain Atlantic rainforest. Within this context, the present study started with *A. ovale* engorged females collected from naturally infested dogs in Barra do Una. In the laboratory, it was shown by PCR that part of these females (6.25%) were naturally infected with *R. parkeri* strain Atlantic rainforest; the eggs of these females were used to form a lab colony of *A. ovale,* naturally infected by *R. parkeri.* Eggs laid by uninfected females were used to form an uninfected tick colony. Both colonies were evaluated in parallel in the lab, aiming to verify and quantify the transstadial and transovarian transmissions of *R. parkeri* strain Atlantic rainforest in *A. ovale* ticks, and the vector competence of the different parasitic stages of this tick. Larval infestations were done on rodents (*Calomys callosus*), while nymphal and adult infestations were done on rabbits (*Oryctolagus cunicullus*). Samples of 10 individuals of each tick stage (F_1 larvae, nymphs and adults; F_2, eggs, larvae, and nymphs) were tested individually by a taqman real-time PCR targeting the genus *Rickettsia*. Blood serum samples from all infested animals were tested through immunofluorescence assay employing *R. parkeri* antigens*,* on zero and 21 days post tick infestation, in order to verify seroconversion to rickettsial antigens. The results demonstrated 100% of transstadial (larvae to nynphs; nymphs

to adults) and transovarian transmissions of *R. parkeri* in *A. ovale* ticks, since all egg, larval, nymphal, and adult samples from the infected colony were PCR-positive. *A. ovale* larvae and nymphs demonstrated high vector competence because all animals infested by these tick infected stages seroconverted to *R. parkeri.* On the other hand, adult ticks were partially competent since only half of the animals seroconverted after being infested by infected adult ticks. None tick of the uninfected control colony was PCR positive, as well as no animal from this group seroconverted to *R. parkeri.* Tick females infected by *R. parkeri* strain Atlantic rainforest had lower reproductive parameters than uninfected females, indicating some deleterious effect of the infection on these ticks. The results suggest an important role of *A. ovale* ticks in the epidemiology of this novel Brazilian rickettsiosis, and also suggest that *A. ovale* are capable to transmit *R. parkeri* strain Atlantic rainforest under natural conditions, since this tick is frequently found infesting humans on the Atlantic rainforest biome.

Keywords: *Amblyomma ovale. Rickettsia parkeri.* Transstadial and Transovarian. Transmissions. Vector Competence.

LISTAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Infestação com larvas F_1 de *A. ovale* em *C. callosus*: avaliação do período parasitário, %ecdise larva-ninfa, % de transmissão transestadial larva-ninfa de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica pela PCR *gltA* e analise da transmissão para hospedeiro, através da sorologia utilizando a técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri*.....53

Tabela 2- Parâmetros da infestação com ninfas de *A. ovale* em *Oryctolagus cunicullus* (coelho), avaliação da transmissão transestadial ninfa-adulto de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica utilizando a PCR para *Rickettsia* (gene *gltA*) e análise da transmissão para hospedeiro, através da sorologia pela técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri* e temperatura retal média dos animais aferida durante 21 dias.....55

Tabela 3 - Taxa de recuperação de adultos de *A. ovale*, peso das teleóginas, peso das posturas e eficiência reprodutiva (ER) das fêmas recuperadas a partir de 10 casais de *A. ovale* levados a infestar cada *Oryctolagus cunicullus* (coelho doméstico).....57

Tabela 4 - Infestação com 10 casais de *A. ovale* em *Oryctolagus cunicullus* (coelho doméstico): avaliação da transmissão transovariana de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica pela PCR para *Rickettsia* (gene *gltA*) em ovos e larvas F_2, analise da transmissão para hospedeiro através da sorologia pela técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri* e temperatura retal média dos animais aferida durante 21 dias.....58

Tabela 5 - Infestação com larvas F_2 de *A. ovale* em *C. callosus*: avaliação do período parasitário, % de ecdise larva F_2-ninfa F_2, transmissão transestadial larva-ninfa F_2 de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica pela PCR *gltA* e analise da

transmissão para hospedeiro, através da sorologia utilizando a técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri*.....60

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Análise Molecular Filogenética da *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica de um fragmento de 463 pares de bases do gene *ompA* de riquétsias.....28

Figura 2 - Infestação com Larvas de *Amblyomma ovale* em *Calomys callosus* 39

Figura 3 - Método utilizado para armazenar ovos, larvas, ninfas e adultos de carrapatos em estufa B.O.D, empregado no presente estudo 39

Figura 4 - Câmara e colar em coelhos (*Oryctolagus cunicullus*) empregados na infestação com carrapatos.....41

Figura 5 - Exemplares adultos de *A.ovale*.....42

Figura 6 - Reação de Imunofluorescência Indireta, utilizando antígeno de *Rickettsia parkeri*.....43

Figura 7 - Localização de Peruíbe, SP, Brasil. Local onde foram coletadas as teleóginas que deram inicio ao estudo. Área de Bioma de Mata Atlântica.....65

Figura 8 - Coelho (*Oryctolagus cunicullus*) infestado com adultos de *Amblyomma ovale*.....69

Quadro 1 - Pares de primers utilizados nas reações de PCR no presente estudo 47

Quadro 2 - Análise descritiva dos valores da eficiência reprodutiva, comparando todas as teleóginas recuperadas dos coelhos (*Oryctolagus cunicullus*) dos grupos controles e infectados.....58

Anexo A - Foto de gel de agarose a 1,5%, demonstrando amplificação de produtos de PCR de um fragmento de aproximadamente 460 pb do gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos negativos na PCR para *Rickettsia* spp 88

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

B.O.D= Bio Chemical Oxigen Demand

DNA= Ácido Desoxirribonucleico

FM= Febre Maculosa

FMB= Febre Maculosa Brasileira

FMVZ= Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

GFM= Grupo da Febre Maculosa

LACEN= Laboratório Central

PCR= Reação em Cadeia pela Polimerase

RIFI= Reação de Imunofluorescência Indireta

UR= Umidade Relativa

USP= Universidade de São Paulo

VPS= Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

ng= nanogramas

nm=nanometro

mg= miligramas

pb= pares de bases

rcf= Relative Centrifugal Force

uL= microlitro

F_2= segunda geração

%= por cento

°C= graus Celsius

≥= menor igual

≤= maior igual

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO..... 22
1.1 UMA NOVA RIQUETSIOSE BRASILEIRA..... 26
1.2 *Rickettsia parkeri*..... 28
1.3 *Amblyomma ovale*..... 30
2 JUSTIFICATIVA..... 33
3 OBJETIVOS..... 35
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 37
4.1 OBTENÇÃO DE CARRAPATOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS..... 37
4.2 INFESTAÇÕES COM LARVAS..... 38
4.3 INFESTAÇÕES COM NINFAS..... 40
4.4. INFESTAÇÕES COM ADULTOS..... 41
4.5 SOROLOGIA DOS ANIMAIS INFESTADOS COM A.ovale PARA *Rickettsia parkeri*..... 42
4.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS INFESTADOS..... 44
4.7 VERIFICAÇÃO DA TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL..... 44
4.8 VERIFICAÇÃO DA TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA..... 44
4.9 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR..... 45
4.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS CONFORME OS OBJETIVOS PROPOSTOS (Item 3)..... 47
4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 48
5 RESULTADOS……... 51
5.1 OBTENÇÃO DE CARRAPATOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS..... 51
5.2 INFESTAÇÕES COM LARVAS..... 51
5.3 INFESTAÇÕES COM NINFAS..... 53
5.4 INFESTAÇÕES COM ADULTOS..... 55
5.5 INFESTAÇÕES COM LARVAS F2..... 59
5.6 PCR DO BAÇO E PULMÃO DOS ANIMAIS QUE VIERAM A ÓBITO.. 60
5.7 PCR DO GENE MITOCONDRIAL 16S rDNA DAS AMOSTRAS DE

CARRAPATOS DOS GRUPOS CONTROLES E AMOSTRAS NEGATIVAS PARA *Rickettsia* DOS GRUPOS INFECTADOS..... 61
5.8 PCR PARA O GENE ompA DE Rickettsia EM OVOS F1 E LARVAS F2 DOS GRUPOS POSITIVOS E SEQUENCIAMENTO..... 61
6 DISCUSSÃO..... 63
6.1 OBTENÇÃO DE CARRAPATOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS..... 63
6.2 TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL DE *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica ENTRE LARVA-NINFA EM CARRAPATOS *A.ovale*..... 65
6.3 TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL DE *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica ENTRE NINFA-ADULTO EM CARRAPATOS *A.ovale*..... 66
6.4 TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DE *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica PARA OVOS E LARVAS F2 DE *Amblyomma ovale*..... 68
6.5 TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL DE *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica ENTRE LARVAS F2-NINFA F2 EM CARRAPATOS A.ovale..... 70
6.6 COMPETÊNCIA VETORIAL DE: LARVAS, NINFAS, ADULTOS E LARVAS F2 DE *Amblyomma ovale* PARA *R.parkeri* cepa Mata Atlântica.. 71
6.7 IMPORTÂNCIA DO *Amblyomma ovale* NA EPIDEMIOLOGIA DA NOVA RIQUETSIOSE BRASILEIRA CAUSADA PELA *R. parkeri* cepa Mata Atlântica..... 72
7 CONCLUSÃO..... 78
REFERÊNCIAS..... 80
ANEXOS…… 88

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos, considerados de importância econômica e com significativo papel como vetores de patógenos para animais e humanos, são artrópodes pertencentes a classe Arachnida, ordem Acari, subordem Ixodida e famílias Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. As duas primeiras estão amplamente distribuídas no mundo, enquanto que Nuttalliellidae, família monotípica e sem importância médica, está restrita à África do Sul e Tanzânia. De acordo com Guglielmone et al. (2010) a família Argasidae é constituída aproximadamente por 200 espécies, divididas nas subfamílias: Argasinae e Ornithodorinae. A família Ixodidae está representada atualmente por 14 gêneros e 702 espécies, subdivididas em 2 grupos: Prostriata com 242 espécies, todas do gênero *Ixodes*, e Metastriata com 458 espécies divididas nos 13 gêneros a seguir: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Compluriscutula*, *Cornupalpatum*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus*, (GUGLIELMONE et al., 2010; GUGLIELMONE; NAVA, 2011).

Todas as espécies de carrapatos requerem obrigatoriamente, em algum estágio do seu ciclo de vida, de sangue de vertebrados (hematofagia) e possuem significativo grau de especificidade, podendo utilizar hospedeiros alternativos, incluindo o homem. No processo de alimentação, os carrapatos causam: a) ação traumática, pela dilaceração de células e tecidos; b) ação mecânica, pela compressão de células; c) espoliação direta, pelo hematofagismo; d) ação tóxica, pela inoculação de substâncias de alto peso molecular da saliva; além da depreciação do couro e predisposição a miíases e abscessos em animais domésticos. Carrapatos ixodídeos são ectoparasitas obrigatórios e o hábito hematofágico destes os transforma em vetores de vários agentes infecciosos, como protozoários, vírus, bactérias, incluindo as riquétsias, tanto para humanos como para animais (CUPP, 1991). Neste contexto, é interessante mencionar que os carrapatos só perdem para os mosquitos como transmissores de agentes infecciosos para humanos (HOSKINS; CUPP, 1988). Já para animais, carrapatos transmitem uma variedade maior de microorganismos patogênicos do que qualquer outro grupo de vetores (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Considerando a longevidade excepcional

destes ácaros eles se tornam não apenas vetores, mas também reservatórios de agentes infecciosos (LABUDA; NUTTALL, 2004).

Dentre todas as categorias de agentes que podem ser veiculados por carrapatos, bactérias do gênero *Rickettsia,* vulgarmente chamadas de riquétsias, são agentes de extrema importância em saúde pública. As riquétsias são bactérias da ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae e subgrupo α-Proteobacteria (RAOULT; ROUX, 1997), apresentam o formato de pequenos bastonetes, Gram-negativos, com propriedades de reter a fucsina básica no método de Giménez e são parasitas intracelulares obrigatórios. Os membros patogênicos deste gênero de bactérias são subdivididos em dois grupos principais, a saber, grupo da febre maculosa e grupo tifo (FOURNIER; RAOULT, 2009). Mais recentemente, através do uso de ferramentas moleculares aplicadas a uma analise multigênica, Weinert et al. (2009) sugeriram uma nova filogenia para o gênero *Rickettsia*, subdividindo esta bactéria da seguinte forma: i) grupo do tifo (GT), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; ii) grupo da febre maculosa, representado por mais de vinte espécies; 3) grupo de transição, onde estão inseridas *R. akari*, *R. felis* e *R. australis*; 4) grupo Canadensis, formado pela espécie *R. canadensis* e afins; 5) grupo Bellii, representado pela espécie *R. bellii* e uma gama de outros genótipos encontrados em insetos. Até o momento, constata-se que 22 espécies e subespécies de riquétsias causam infecção ao homem, sendo elas: *Rickettsia rickettsii, R. prowazekii, R. typhi, R. conorii subsp. conorii, R. conorii subsp. israelensis, R. conorii subsp. caspia, R. conorii subsp. indica, R. sibirica subsp sibirica, R. sibirica subsp. mongolotimonae, R. heilogjiangensis, R. slovaca, R. marmionii, R. raoutii, R. africae, R. parkeri, R. australis, R. honei, R. japonica, R. massiliae, R. aeschlimannii, R. akari e R. felis* (MERHEJ; RAOULT, 2011). A maioria destas bactérias está associada a carrapatos, sendo estes considerados os seus reservatórios e vetores (FOURNIER; RAOULT, 2009).

A Febre Maculosa, metazoonose causada pela espécie *R. rickettsii*, primeiramente foi descrita nos Estados Unidos, América do Norte, onde foi denominada de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (Rocky Mountain Spotted Fever). Neste mesmo país, o cientista Dr. Howard Taylor Ricketts efetuou o primeiro isolamento de *R. rickettsii* no início do século XX, quando também estabeleceu o papel do carrapato *Dermacentor andersoni* na transmissão da doença (RICKETTS, 1909). Atualmente, *D. andersoni* é o vetor da *R. rickettsii* na costa oeste, enquanto que *Dermacentor variabilis* é o vetor na costa leste dos Estados Unidos.

Além dos Estados Unidos, *R. rickettsii* ocorre endemicamente no Brasil, onde é chamada de febre maculosa brasileira (FMB), e no México (febre manchada), Colômbia (febre de Tobia), Costa Rica, Panamá e Argentina (DIAS; MARTINS, 1939; PATINO; AFAFANADOR; PAUL, 1937; BUSTAMANTE; VARELA, 1947; RODANICHE, 1953; PHILIP et al.,. 1978; LABRUNA et al., 2011a). Nos Estados Unidos, *R. rickettsii* é transmitida a humanos por carrapatos principalmente do gênero *Dermacentor*. Nos demais países, incluindo o Brasil, a bactéria é transmitida primariamente por carrapatos do gênero *Amblyomma* (McDADE; NEWHOUSE, 1986). Em algumas áreas do sul dos Estados Unidos e norte do México, o carrapato *Rhipicephalus sanguineus* é incriminado como principal vetor, ao passo que na região metropolitana de São Paulo, *Amblyomma aureolatum* é vetor de *R. rickettsii* para humanos (RAOULT; PAROLA, 2009; LABRUNA et al., 2011b). No Brasil, os primeiros casos de febre maculosa foram descritos no final da década de 20 em São Paulo (PIZA, 1932) e início da década de 30 em Minas Gerais (DIAS; MARTINS, 1939).

A denominação doença “emergente” se refere às doenças antes inexistentes ou raras e cuja prevalência aumentou consideravelmente (TELFORD; GOETHERT, 2004). Esta prevalência crescente, porém, pode ser atribuída, em muitos casos, ao simples reconhecimento e diagnóstico de doenças infecciosas pré-existentes. A distinção entre estas duas situações não tem apenas importância acadêmica; doenças emergentes estão associadas a um incremento real no número de casos para patamares e consequências desconhecidas. Assim sendo, a distinção entre as duas situações é de extrema relevância para nortear atitudes visando saúde pública e animal. Muitas das riquetsioses humanas estão listadas entre as doenças emergentes embora o conceito “emergência” tenha frequentemente sido usado de forma muito ampla e subjetiva (PADDOCK, 2009).

Riquetsioses graves como a FMB já são reconhecidas há muito tempo, provavelmente pela elevada letalidade da enfermidade. Recentemente, ocorreu um novo impulso na riquetsiologia devido a uma evolução significativa na caracterização epidemiológica, microbiológica e molecular dos agentes etiológicos e que, entre outros, culminou com a identificação de nove espécies ou subespécies novas de riquétsias no mundo entre 1984 e 2004 (RAOULT; PAROLA, 2009). Por outro lado, houve sem dúvida emergência ou reemergência destas infecções, mas a razão para este incremento das doenças humanas por riquetsias se deve a diversos fatores nem sempre bem compreendidos. Modificações ecológicas com alteração na diversidade e

distribuição geográfica de animais e plantas, medidas de conservação frequentemente acompanhadas por favorecimento de determinadas espécies em detrimento de outras (OGRZEWALSKA et al., 2011), crescente contato de seres humanos com nichos naturais para lazer e descanso estão entre os possíveis fatores causais.

Na presença de novas espécies de riquétsias bem como na descoberta de espécies já conhecidas, porém em nova localidade, é essencial determinar se o agente etiológico é patogênico ou não. Uma das dificuldades neste sentido é que muitas das riquétsias causam doença com sintomatologia inespecífica e mais branda do que aquela causada pela *R. rickettsii*. Esta dificuldade é bem ilustrada pelo caso da *Rickettsia parkeri*. Esta riquetsia conhecida desde 1939 nos Estados Unidos só foi reconhecida como patogênica para seres humanos em 2004, ou seja, mais de 60 anos depois (PADDOCK et al., 2004). Até então, provavelmente, muitos casos de riquetsioses humanas causadas pela *R. parkeri* foram atribuídas á casos brandos de infecção por *R. rickettsii* (PADDOCK, 2009).

De importância fundamental para as riquetsioses são os vetores, notadamente os carrapatos. Carrapatos também determinam o perfil epidemiológico de muitas doenças infecciosas. Por exemplo, no caso dos Estados Unidos há vetores diferentes para as riquetsioses já mencionadas; o carrapato *Amblyomma maculatum* veicula a *R. parkeri* e carrapatos do gênero *Dermacentor* a *R. rickettsii* (PADDOCK, 2009). Como estes carrapatos muitas vezes ocupam regiões geográficas diferentes e ecótonos distintos, seu contato com hospedeiros pode ser diverso. Outro aspecto de extrema relevância para a epidemiologia das riquetsioses é a agressividade das espécies de carrapatos ao homem e que muitas vezes determina a transmissão ou não de agente patogênico para os seres humanos.

Até o ano 2000 apenas três espécies de riquétsias eram conhecidas na América do Sul. Desde então pelo menos sete outras espécies foram relatadas no continente (LABRUNA, 2009a). Dentre todas estas espécies apenas *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia prowazekii, Rickettsia parkeri*, *Rickettsia felis*, *Rickettsia typhi* e *Rickettsia massiliae* são sabidamente patogênicas para o homem (LABRUNA 2009a; PADDOCK, 2009). O agente da febre maculosa, a *R. rickettsii*, é a riquétsia mais patogênica do mundo, aquela reconhecida há mais tempo no Brasil e até pouco tempo, era a única dentro do grupo da febre maculosa que fora relatada causando doença em seres humanos no Brasil (GALVÃO, 1996; GALVÃO et al., 2005; LABRUNA, 2009a). Esta constatação é intrigante, pois apesar de ser responsável nos

Estados Unidos, Uruguai e Argentina por infecções humanas e doença ganglionar (PADDOCK et al., 2004; VENZAL et al., 2004; ROMER et al., 2011), e apesar de também ter sido isolada de carrapatos no Brasil (SILVEIRA et al., 2007), não há relatos de doença causada pela *R. parkeri sensu stricto* em humanos no país. É mais provável que o cenário atual possa ser atribuído à pesquisa ainda incipiente e, por conseguinte, diagnóstico de riquetsioses muito reduzidos frente á realidade.

1.1 UMA NOVA RIQUETSIOSE BRASILEIRA

Os fatos e também as especulações acima mencionados, no entanto, são agora reforçados por um relato recente de novo caso de riquetsiose humana no Brasil. Neste relato, um paciente apresentou uma doença febril-exantemática em maio de 2009, dez dias após infestação por carrapato ocorrida em área de reserva de Mata Atlântica em Barra do Una, Peruíbe, litoral sul de São Paulo. No local do parasitismo pelo artrópode foi constatada uma lesão papular típica de “escara de inoculação” (*tache noire*), a qual é frequentemente observada em infecções humanas por diferentes riquétsias do grupo da febre maculosa, porém extremamente rara no caso de *R. rickettsii.* Após isolamento, amplificação e sequenciamento de DNA de amostra da pele do local da picada, a presença de uma nova amostra de riquetsia do grupo da febre maculosa foi constatada no paciente (SPOLIDORIO et al., 2010). Análise filogenética molecular posicionou esta nova amostra no grupo composto por *R. africae, R. parkeri* e *R. sibirica* (Figura 1). Este trabalho, portanto, caracterizou pela primeira vez e de forma irrefutável uma nova riquetsiose humana do grupo da febre maculosa, distinta daquela causada pela *R. rickettsii* no Brasil e das demais rickettsioses do mundo, sendo chamada de febre maculosa da Mata Atlântica.

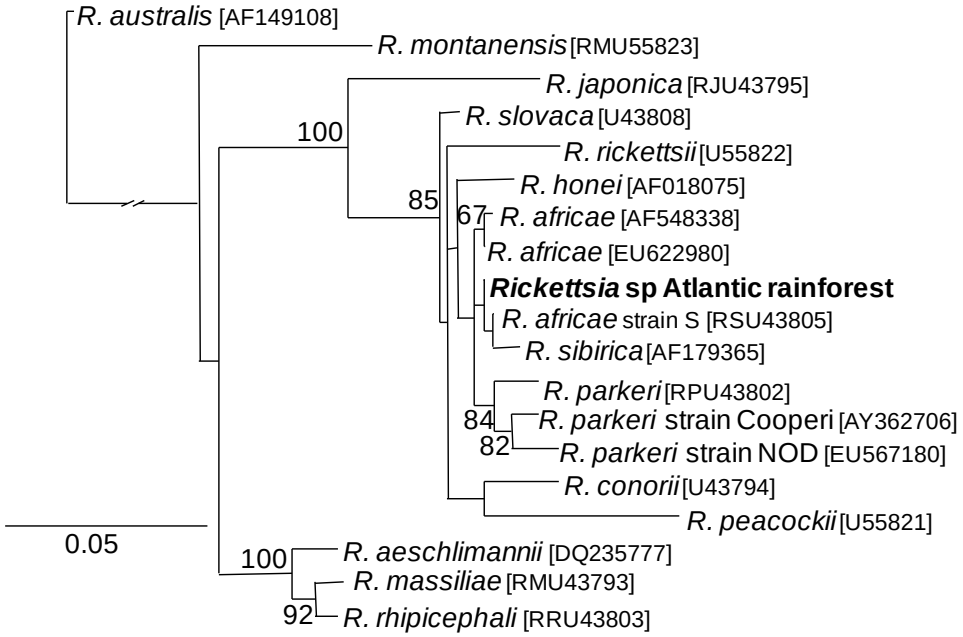
Também recentemente, esta nova cepa de riquétsia, que devido a suas similaridades filogenéticas com *R.parkeri,* está sendo chamada de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, foi detectada em 13% de carrapatos *Amblyomma ovale* no Parque Nacional da Serra do Mar, núcleo Itatinga Pilões, município de Cubatão (SABATINI et al., 2010). Sendo o estágio adulto de *A. ovale* notadamente antropofílico (GUGLIELMONE et al., 2006), Sabatini et al. (2010) sugeriram que este carrapato deva ser um importante vetor de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica nas aéreas de

preservação da Mata Atlântica no litoral paulista, por onde *A. ovale* está contiguamente distribuído. Silva et al. (2011) também relataram em um paciente do estado da Bahia um caso de Febre Maculosa Brasileira com quadro muito semelhante e com características de analises moleculares do patógeno, muito parecidas ao relatado por Spolidorio et al. (2010). Medeiros et al. (2011) e Barbieri (2012), com o auxílio de técnicas moleculares, verificaram que exemplares de *A. ovale* e *A. aureolatum* coletados de cães (*Canis lupus familiaris*) no estado de Santa Catarina, área de Mata Atlântica, estavam infectados com uma riquétsia, 100% similar a *R.parkeri* cepa Mata Atlântica. Esses autores sugeriram que esta cepa Mata Atlântica deva ser o agente responsável pelos casos brandos de febre maculosa que vem sendo confirmados em pacientes humanos no estado de Santa Catarina, apenas por técnicas sorológicas, as quais não têm possibilitado a identificação da espécie de *Rickettsia* em questão.

Com a descrição desta nova riquetsiose, torna-se essencial uma melhor caracterização do agente, para definição clara da espécie envolvida bem como de sua ecologia, visando o aprimoramento no diagnóstico e compreensão da epidemiologia das riquetsioses brasileiras. Para esse fim é de extrema importância o isolamento e cultivo do agente vivo. Isto permitiria um estoque ilimitado da riquetsia para as diversas análises. Além disso, são necessários estudos “in loco” para determinar as possíveis espécies de carrapatos vetores e formas de contato que estes possam ter com humanos e animais domésticos e silvestres. Com relação a essas demandas, através de um projeto de pesquisa Szabó et al. (2012a[1]) conseguiram isolar em cultivo celular de células Vero, *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica de carrapatos *A. ovale* coletados em Barra do Una, na mesma localidade do caso índice desta nova rickettsiose brasileira, reportado por Spolidorio et al. (2010). Neste trabalho, foram obtidos três isolados de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica de carrapatos *A. ovale* coletados de cães em Barra do Una, reforçando ainda mais o papel deste carrapato como vetor desta nova riquetsiose (SZABÓ et al., 2012a[2]).

[1,2]SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. 2012a. In print

Figura 1- Análise Molecular Filogenética da *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica de um fragmento de 463 pares de bases do gene *ompA* de riquétsias



Fonte: Spolidorio et al. (2010)

1.2 *RICKETTSIA PARKERI*

De acordo com Weinert et al. (2009) e Fournier e Raoult (2009), *Rickettsia parkeri* pertence as riquétsias do grupo da febre maculosa. Esta bactéria foi observada pela primeira vez em 1937 em carrapatos *Amblyomma maculatum* no Estado do Texas, sul nos Estados Unidos da América, pelo diretor do Rocky Mountain Laboratory, Ralph Robinson Parker, que realizava uma vigilância acarológica coletando carrapatos para analisar a presença de possíveis agentes patogênicos ao homem. Esta pesquisa foi realizada devido a ocorrência local de doença diagnosticada como Febre Maculosa. Este novo agente causava em cobaios (*Cavia porcellus*) sintomas semelhantes à *R. rickettsii*, porém brandos e sem mortalidade. Este agente apresentou imunidade cruzada com a Febre Maculosa das montanhas Rochosas (causada por *R. rickettsii*) e Febre Botonosa do Mediterrâneo (causada por *R. conorii*), mas era um agente distinto dos citados (PARKER et al.,1939).

A posterior nomeação por Lackman et al. (1965) do novo isolado como *Rickettsia parkeri* foi um epônimo que se deu em homenagem ao Dr. R. R.Parker. Até

o presente, o encontro de *R. parkeri* sensu stricto em carrapatos se restringe às espécies *Amblyomma maculatum* nos Estados Unidos, e *Amblyomma triste* no Brasil, Argentina e Uruguai. Por outro lado, outros genótipos considerados como variantes de *R. parkeri* tem sido reportados em carrapatos *Amblyomma dubitatum*, *Amblyomma nodosum*, *A.ovale*, *Amblyomma parkeri, Amblyomma longirostre, Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* no Brasil (PARKER et al.,1939; LABRUNA et al., 2004; VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007;OGRZEWALSKA et al., 2009a; SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011; SZABÓ et al., 2012a[3]; BARBIERI, 2012, PACHECO et al., 2012).

R.parkeri passou 65 anos após a sua descoberta sendo considerada não patogênica para humanos e por este motivo pouco estudada. Em 2004 Paddock et al. relatam que em 2002 um paciente do sexo masculino, de 40 anos de idade que morava no sudeste da Vírginia, Estados Unidos, apresentou o primeiro caso comprovado de Febre Maculosa causada por *R. parkeri sensu stricto* (cepa Maculatum 20), sendo que o autor confirmou este achado através de isolamento, cultivo celular e posterior analise molecular da bactéria. Na América do Sul esta bactéria já foi demonstrada causando doenças em humanos na região do Delta do Rio Paraná, na Argentina (ROMER et al.,2011) e no Uruguai (VENZAL et al., 2004; CONTI-DÍAZ et al., 2009). Todos esses casos sul-americanos apresentaram fortes indícios de que o possível vetor nestes países seja *A. triste*, carrapato que se apresenta muito antropofílico nestes locais. Conforme dito anteriormente, uma nova cepa de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) foi recentemente relatada causando quadro clínico de febre maculosa em dois pacientes no Brasil (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011), sendo possivelmente transmitida primariamente por *A. ovale* (SABATINI et al., 2010). Há indícios que esta nova cepa esteja também causando quadros clínicos no estado de Santa Catarina (MEDEIROS et al. 2011; BARBIERI 2012).

---

[3]SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. In print, 2012a

1.3 *AMBLYOMMA OVALE*

Carl Ludwig Koch entomólogo alemão, nascido em Kusel cidade da Alemanha, especializado em aracnologia foi o responsável pela primeira descrição do carrapato *Amblyomma ovale* em 1844.

A.ovale pertence a família Ixodidae, subfamília Amblyomminae, que inclui cerca de 130 espécies, sendo este o terceiro maior gênero dentro desta família. A maior diversidade de espécies do gênero *Amblyomma* localiza-se no continente Americano, onde se encontra mais da metade das espécies do gênero. Neste continente os carrapatos estão localizados entre o paralelo 40º no Hemisfério Norte e o paralelo 50º no Hemisfério Sul, estando presente mesmo na zona alpina dos Andes (KOLONIM, 2009). As espécies deste gênero possuem ciclo trioxeno, necessitando de 3 hospedeiros para completar o seu ciclo biológico. Normalmente apresentam hábito de tocaia, porém algumas espécies são nidícolas e outras com hábitos predominantemente de caçadoras (LABRUNA et al., 2009b; SZABÓ et al., 2009). Muito embora *A. ovale* seja considerada uma espécie tipicamente de hábito de tocaia, Szabó et al. (2012b) observaram uma situação peculiar na Estação Ecológica Jureréia-Itatins, localizada no Município de Peruíbe, SP, em que ações antrópicas ocasionaram excepcionalmente um comportamento nidícola deste carrapato.

A sua distribuição ocorre desde o México até a Argentina. Todos os países da América do Sul, com exceção do Chile e Uruguai, possuem populações fixas estabelecidas (GUGLIELMONE et al., 2003). A fase adulta de *A.ovale* utiliza principalmente como hospedeiros primários carnívoros de diferentes famílias (LABRUNA et al., 2005a). Labruna et al. (2010) também afirmam que *Tapirus terrestris* (Anta) pode ser um hospedeiro importante para a fase adulta de *A.ovale* em áreas mais preservadas. Entretanto, o cão doméstico (*Canis lupus familiaris*) é o hospedeiro que possui a maior quantidade de relatos de parasitismo pela fase adulta do carrapato (GUGLIELMONE et al., 2003). Já as fases imaturas, larvas e ninfas deste carrapato, utilizam preferencialmente como hospedeiros, pequenos roedores, marsupiais e carnívoros (GUGLIELMONE, et al., 2003; MARTINS; MOURA; LABRUNA., 2012; SARAIVA et al., 2012). Ogrzewalska et al. (2009b) relataram larvas e ninfas de *A. ovale* parasitando três espécies de aves passeriformes no

sudeste do Brasil, o que sugere um possível papel das aves na dispersão de *A. ovale* a outras áreas, podendo assim ampliar a distribuição das enfermidades veiculadas pelo mesmo. Sabatini et al. (2010) e Szabó et al. (2012a[4]) apresentaram evidências epidemiológicas que *A.ovale* seja o vetor da *R. parkeri* cepa Mata Atlântica no estado de São Paulo; Forlano et al. (2005) também no Brasil sugerem que *A.ovale* possa ser vetor de *Hepatozoon canis* para cães no país.

Dando continuidade ao projeto de Szabó et al. (2012a[5]), a presente pesquisa de mestrado visou complementar em laboratório os estudos epidemiológicos desta nova riquetsiose brasileira, uma vez que nada se conhece sobre a competência vetorial de *A. ovale* para *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Sendo assim, colônias de carrapatos infectadas por esta riquétsia foram avaliadas em laboratório quanto a sua capacidade ou não de transmitir o patógeno para hospedeiros susceptíveis, e se este patógeno é mantido em carrapatos por transmissões transovariana e transestadial.

[4,5]SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. In print, 2012a

JUSTIFICATIVA

2 JUSTIFICATIVA

A partir da descoberta e descrição de casos clínicos de febre maculosa brasileira causados por um novo agente patogênico (*Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica), em áreas de Mata Atlântica onde o carrapato *Amblyomma ovale* foi apontado como o possível vetor, estudos que verifiquem a competência vetorial e a dinâmica da bactéria no carrapato (transmissão transestadial e transovariana), assim como os efeitos deletérios do patógeno para o vetor e para o hospedeiro, são de extrema importância para a Saúde Pública e Vigilância Epidemiólogica. Os resultados deverão elucidar questões relacionadas à história natural desta zoonose emergente no bioma Mata Atlântica brasileiro.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

1. Avaliar a competência vetorial de larvas, ninfas e adultos de *Amblyomma ovale* em transmitir *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica para hospedeiros susceptíveis.

2. Avaliar e quantificar a transmissão transovariana de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em carrapatos *Amblyomma ovale* naturalmente infectados.

3. Avaliar e quantificar a transmissão transestadial de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em carrapatos *Amblyomma ovale* naturalmente infectados.

4. Avaliar efeitos deletérios da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em carrapatos *Amblyomma ovale* naturalmente infectados.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Nos itens abaixo serão descritos detalhadamente os materiais e métodos que foram utilizados neste estudo.

4.1 OBTENÇÃO DE CARRAPATOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS

Fêmeas ingurgitadas de *A. ovale* foram coletadas em janeiro de 2011 de cães (*Canis lupus familiaris*) naturalmente infestados em Barra do Una, no município de Peruíbe (24°19’12”S 46°59’52”O), local do caso índice da nova riquetsiose brasileira causada por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica. Peruíbe é um município do estado de São Paulo, localizado na região metropolitana da baixada Santista. A população estimada segundo o censo de 2010 do IBGE foi de 59.793 habitantes. Neste município o turismo ambiental se destaca em função das reservas naturais de Mata Atlântica e pelas belezas de suas praias.

No laboratório, as fêmeas ingurgitadas foram separadas individualmente em placas de Petri, mantidas em uma incubadora B.O.D (Bio Chemical Oxygen Demand) a 25°C e 95% de umidade relativa(UR), para que realizassem a oviposição. De cada fêmea, a postura total foi colocada em tubo de ensaio separado, fechado com algodão hidrófilo, contendo um fragmento enrolado de papel absorvente dentro do tubo (evitando condensação de vapor d’água dentro do tubo), para que ocorresse a eclosão das larvas F_1.

De cada fêmea, pequenas amostras de ovos e larvas (máximo de 50 indivíduos em um único *pool* de ovos ou de larvas), e a própria fêmea ao final da postura, foram submetidos a extração de DNA e PCR para detecção de *Rickettsia* (protocolos descritos abaixo no item 4.9). As larvas eclodidas de duas fêmeas que foram negativas ao PCR (assim como seus ovos e larvas) foram usadas para formar os grupos controle do presente projeto, não infectado por *Rickettsia.* Paralelamente, as larvas eclodidas de duas fêmeas que foram positivas ao PCR (assim como seus ovos e larvas) foram usadas para formar os grupos infectados por riquétsia do presente trabalho. Produtos de PCR de ovos dessas duas fêmeas infectadas foram submetidos ao sequenciamento de DNA, resultando em *Rickettsia parkeri* cepa Mata

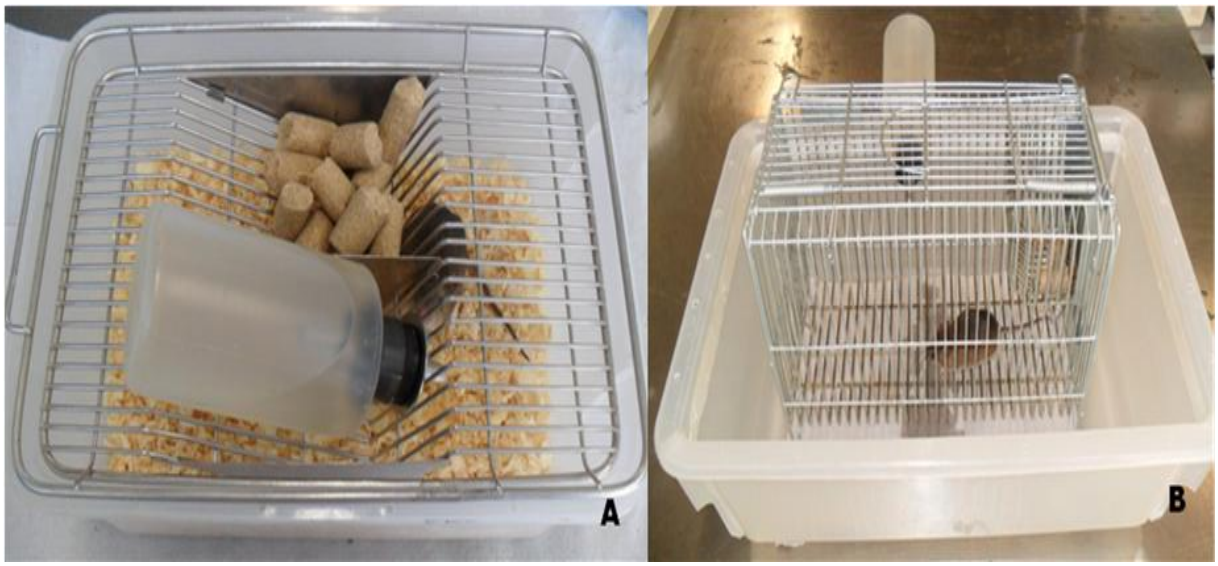
Atlântica (100% de similaridade de acordo com a sequencia do GenBank n° GQ855237).

4.2 INFESTAÇÕES COM LARVAS

Larvas F_1 não alimentadas e não infectadas de *A. ovale,* dos grupos controles, foram obtidas de duas fêmeas não infectadas, designadas como fêmeas 15 e 19. Desta forma, as larvas de cada uma dessas fêmeas foram criadas separadamente, porém paralelamente, formando portanto duas colônias não infectadas, designadas como colônias 15 e 19, respectivamente. Em paralelo, larvas não alimentadas de *A. ovale* infectadas por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (grupos infectados), provenientes de fêmeas infectadas designadas como fêmeas 1 e 31, foram utilizadas para formar as colônias 1 e 31, respectivamente. De cada colônia, larvas de 20 a 30 dias de idade foram utilizadas para infestar 3 roedores da espécie *Calomys callosus* (cerca de 500 larvas por roedor), provenientes do biotério do VPS da FMVZ/USP e sem qualquer contato prévio com carrapatos. As infestações consistiram na colocação dos carrapatos livremente sobre o dorso dos roedores, e nada foi feito para evitar a auto-limpeza. Durante 2 dias após a infestação, os animais permaneceram em caixas individuais especificas para roedores, contendo maravalha, sendo que ao entorno destas caixas foi passado fita dupla face, evitando assim o escape de carrapatos (Figura 2). No terceiro dias após a infestação, os pequenos roedores foram transferidos individualmente para gaiolas suspensas e estas foram colocadas dentro de caixas tipo Growing®, forradas com papel absorvente e ao seu entorno foi passado fita dupla face para evitar o escape de larvas (Figura 2). As larvas ingurgitadas nesses roedores foram recuperadas diariamente, armazenadas em tubos de ensaio devidamente identificados, fechados com algodão hidrófilo (Figura 3) e levados a uma incubadora B.O.D a 25°C e 95% UR. Também foram separadas 100 larvas por colônia, as quais foram observadas diariamente para ecdise de ninfas. O número de larvas ingurgitadas que morreram sem fazer ecdise foi anotado. As ninfas obtidas foram utilizadas nas infestações descritas no item 4.3 e nas análises moleculares descritas no item 4.9. A escolha de roedores *C. callosus* para essas infestações baseou-se na alta susceptibilidade

desta espécie animal para *R. parkeri* (dados não publicados) e porque roedores Cricetidae são incriminados como principais hospedeiros para estágios imaturos de *A. ovale*.

Figura 2 - Infestação com Larvas de *Amblyomma ovale* em *Calomys callosus*



A: gaiola usada para infestação do dia 0 ao 3°dia pós infestação.B: gaiola e forma de alojar o animal do 3° dia pós infestação até a queda de todas as larvas ingurgitada

Figura 3 - Método utilizado para armazenar ovos, larvas, ninfas e adultos de carrapatos em estufa B.O.D, empregado no presente estudo

4.3 INFESTAÇÕES COM NINFAS

Ninfas F_1 não alimentadas de *A. ovale,* não infectadas dos grupos controle*,* de 20 a 30 dias de idade, foram levadas a infestar 3 *C. callosus* por colônia (60 ninfas por roedor), provenientes do biotério do VPS/FMVZ/USP e sem qualquer contato prévio com carrapatos. Em paralelo e sob as mesmas condições de infestações, ninfas não alimentadas de *A. ovale* infectadas por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (grupos infectados) foram levadas a infestar outros 3 *C. callosus* por colônia*,* também sem qualquer contato prévio com carrapatos (o manejo de infestação foi conforme descrito no item 4.2). Como foi verificado que *C. callosus* não se portou como um bom hospedeiro para fase de ninfas de *A.ovale*, foram repetidos os mesmos procedimentos citados acima, utilizando-se 2 *Oryctolagus cunicullus* (coelho doméstico) por colônia, com exceção da colônia 1 que foi utilizado somente um coelho, devido a baixa quantidade de estoque destas ninfas para infestação. Os coelhos eram provenientes de cunicultores especializados e sem qualquer contato prévio com carrapatos, obtendo-se assim êxito na infestação com as ninfas de *A.ovale*. As infestações em coelhos foram feitas dentro de câmaras de tecido de algodão, coladas ao dorso tricotomizado dos coelhos, conforme previamente descrito (PINTER; LABRUNA; FACCINI, 2002). Um colar elizabetano foi confeccionado para cada coelho, de acordo com a figura 4, evitando assim que o animal ocasionasse danos à câmara através de mordeduras, eliminando assim as possibilidades de escape de carrapatos. As câmaras foram abertas e vistoriadas diariamente e as ninfas ingurgitadas nesses lagomorfos, foram recuperadas e armazenadas em tubos de ensaio devidamente identificados, fechados com algodão hidrófilo e levados a uma incubadora B.O.D a 25°C e 95% UR. Também foram separadas 50 ninfas por animal, que foram observadas diariamente para ecdise ninfa-adulto. O número de ninfas ingurgitadas que morreram sem fazer ecdise foi anotado. Os adultos obtidos foram utilizados nas infestações descritas no item 4.4. e nas análises moleculares descritas no item 4.9.

Figura 4 - Câmara e colar em coelhos (*Oryctolagus cunicullus*) empregados na infestação com carrapatos

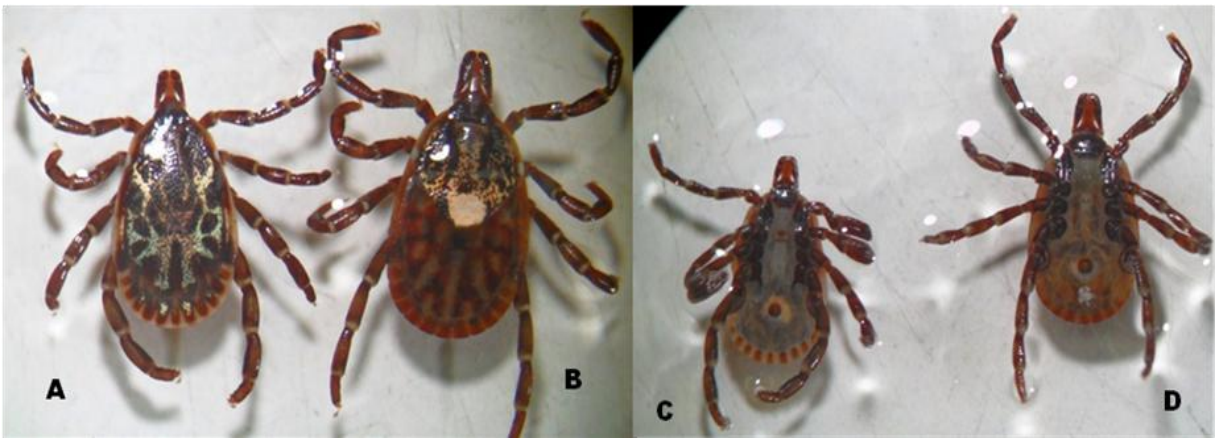
4.4 INFESTAÇÕES COM ADULTOS

Adultos F_1 não alimentados de *A. ovale* (Figura 5), não infectados dos grupos controle, de 20 a 30 dias de idade, foram levados a infestar 2 coelhos domésticos (10 casais por coelho) por colônia, provenientes de cunicultores especializados e sem qualquer contato prévio com carrapatos. Em paralelo e sob as mesmas condições de infestações, adultos não alimentados de *A. ovale* infectados por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (grupos infectados) foram levados a infestar outros 2 coelhos por colônia, também sem qualquer contato prévio com carrapatos (o manejo de infestação de coelhos está descrito no item 4.3). As fêmeas ingurgitadas nesses coelhos foram recuperadas diariamente, quantificadas, pesadas individualmente em balança eletrônica com precisão de 0,1mg, transferidas para uma Placa de Petri devidamente identificada e levadas a uma incubadora B.O.D a 25°C e 95% UR, onde foram observadas diariamente para postura e incubação de seus ovos. Após 14 dias, a postura de cada fêmea foi pesada e transferida para um tubo de ensaio e fechado com algodão hidrófilo. O número de fêmeas ingurgitadas que morreram sem fazer a postura foi anotado. O percentual de eclosão de cada postura foi

determinado conforme previamente descrito (PINTER; LABRUNA; FACCINI, 2002). A eficiência reprodutiva (ER) de cada fêmea foi calculada utilizando a fórmula matemática descrita por Bennett (1974): peso da massa de ovos/ peso da fêmea ingurgitada (teleógina) X 100.

Parte dos ovos e das larvas (F_2), obtidas de fêmeas ingurgitadas dos dois grupos experimentais (controles e infectados) foram separadas para análises moleculares descritas no item 4.9, buscando atingir a verificação descrita no item 4.8, ao passo que outra parte foi utilizada para infestar *C. callosus*, sendo 2 animais por grupo, na relação de dois *C. callosus* para larvas oriundas de uma mesma postura.

Figura 5 - Exemplares adultos de *A.ovale*



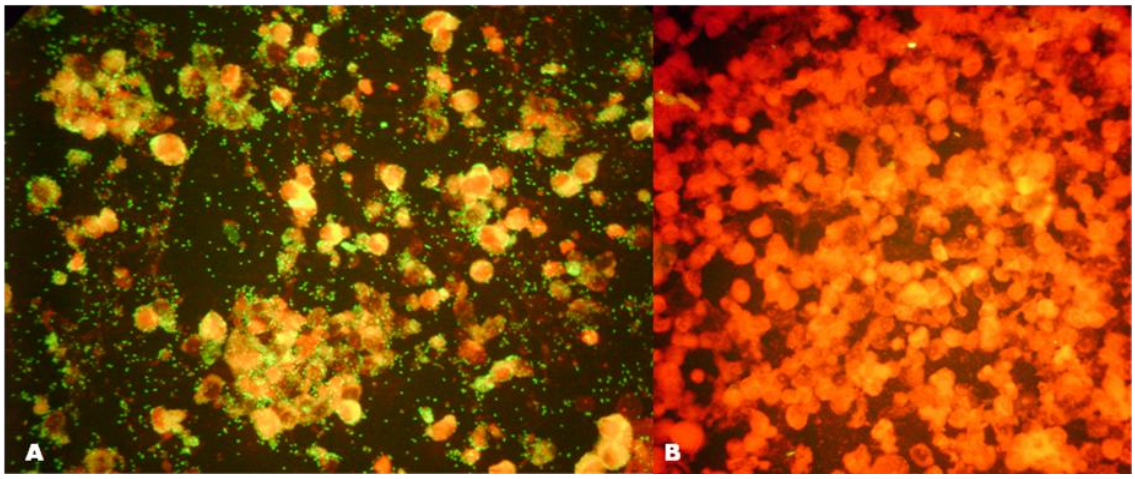
A: macho vista dorsal, B: fêmea não ingurgitada vista dorsal, C: macho vista ventral, D: fêmea não ingurgitada vista ventral.

4.5 SOROLOGIA DOS ANIMAIS INFESTADOS COM *A.ovale* PARA *Rickettsia parkeri*

No dia da infestação (dia 0) e aos 21 dias após a infestação com carrapatos, amostras de sangue foram coletadas de todos os animais infestados. De *C. callosus,* o sangue foi coletado através de punção intracardíaca, utilizando seringas hipodérmicas de 1ml com agulhas de insulina de 0,38 x 13mm, sendo que os animais estavam sob ação de agentes anestésicos. Em coelhos a venopunção foi

realizada de veias auriculares, utilizando agulhas 24G e seringas de 3 ml. Para este passo os animais foram contidos manualmente. O soro sanguíneo obtido das venopunções foi centrifugado a 13.400 rcf, e logo foi testado pela técnica de Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) frente ao antígeno de *R. parkeri* amostra At 24 (SILVEIRA et al., 2007), conforme técnica previamente descrita (HORTA et al. 2004, 2007). Soros controles positivos e negativos empregados nas reações foram oriundos da soroteca do estudo realizado por Ogrzewalska et al. (2012). Os conjugados utilizados e as diluições foram as seguintes: para o soro dos *C. callosus* foi utilizado Anti-IgG de *Rattus norvergicus* marcada com Isotiocianato de Fluoresceína, SIGMA®, na diluição de 1:400, produzindo a reação de acordo com a figura 6. O conjugado utilizado para a RIFI empregando-se o soro dos coelhos foi Anti-IgG de Coelho doméstico marcada com Isotiocianato de Fluoresceína, SIGMA®, na diluição de 1:600. Quando foi constatada reação positiva na diluição de triagem (1/64) (Figura 6), os soros foram testados para determinação do título final de reação (HORTA et al., 2004, 2007, PENA et al., 2009). Dos animais infestados que morreram antes dos 21 dias após a infestação, foi coletado soro sanguíneo a partir de sangue coletado por punção intracardíaca, e durante a necropsia dos animais, fragmentos de pulmão e baço foram coletados e processados pela PCR para riquétsias, conforme descrito no item 4.9.

Figura 6 - Reação de Imunofluorescência Indireta, utilizando antígeno de *Rickettsia parkeri*



. A: reação positiva, B: reação negativa

4.6 AVALIAÇÃO CLÍNICA DOS ANIMAIS INFESTADOS

Todos os coelhos infestados tiveram sua temperatura retal aferida, através de termômetro clínico digital (G-TECH® Mod: TH-198) do dia zero ao vigésimo primeiro dia após a infestação, sendo que só foi considerado estado febril quando a temperatura atingisse valores superiores a 40°C (HILLYER; QUESENBERRY, 1997). A ocorrência de lesões cutâneas (ex. petéquias, lesões escrotais) foram analisadas diariamente em todos os animais. No caso dos roedores a avaliação clínica baseou-se no estado geral do animal, avaliação de lesões cutâneas, consumo de alimentos sólidos e líquidos e alterações de comportamento (dificuldade de locomoção). Tentativas de aferimento da temperatura corporal através de termômetro infravermelho não se mostrou eficiente e não foi avaliada no decorrer do estudo.

4.7 VERIFICAÇÃO DA TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL

Após a ecdise dos ixodídeos na incubadora B.O.D a 25°C e 95% de UR, foram obtidas amostras de ninfas e adultos de *A. ovale,* oriundas de larvas e ninfas ingurgitadas, respectivamente, dos grupos controle e infectado. Para cada *C. callosus* infestado, amostras de pelo menos 10 ninfas e para cada coelho amostras de pelo menos 10 adultos não alimentados foram testados pela PCR, buscando a verificação da presença de DNA de *Rickettsia,* conforme descrito no item 4.9. A frequência de ninfas e adultos infectados (%) foi determinada para cada grupo experimental.

4.8 VERIFICAÇÃO DA TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA

Após alimentação dos carrapatos adultos nos coelhos, fêmeas ingurgitadas foram alocadas em placas de Petri e deixadas para oviporem na incubadora B.O.D a

25°C e 95% de UR. Ao final da oviposição, duas fêmeas (quenóginas) foram escolhidas aleatoriamente de cada um dos grupos (controles e infectados) e foram testadas individualmente pela PCR, conforme descrito no item 4.9. Para cada postura das quenóginas selecionadas (8 no total), 10 ovos frescos de no máximo 5 dias e escolhidos aleatoriamente, foram testados individualmente pela PCR (item 4.9), buscando a verificação da presença de DNA de riquétsias nos ovos, verificando assim a presença ou ausência da transmissão da bactéria da fêmea infectada para sua prole. Após a eclosão das larvas, destas mesmas posturas, 10 larvas de 20 a 30 dias de idade foram escolhidas aleatoriamente e testadas pela PCR (item 4.9), buscando a verificação da presença de DNA de riquétsias. A necessidade de se testar tanto ovos quanto larvas se faz pela possibilidade de ovos infectados terem menor eclodibilidade que ovos não infectados.

4.9 EXTRAÇÃO DE DNA E PCR

As extrações de DNA dos carrapatos (ovo, larva, ninfa e adulto) foram realizadas pelo protocolo isotiocianato de guanidina, conforme previamente descrito (SANGIONI et al., 2005). Após a necropsia, dentro de capela com fluxo laminar e com material estéril, dos animais que morreram durante as infestações com *A.ovale*, fragmentos de baço e pulmão foram coletados para extração de DNA. Para isto foi utilizado o kit comercial (DNEasy Tissue Kit, Qiagen®, USA). Amostras de 300 ng de DNA foram utilizadas para cada reação de PCR.

Todas as amostras de DNA extraídas neste trabalho foram testadas para detecção de *Rickettsia* através de PCR individual, pelo protocolo de real-time PCR, descrito por Labruna et al. (2004). Este protocolo utiliza um par de primers (CS5 e CS6) que amplificam um fragmento de 147 nucleotídeos do gene citrato sintase de *Rickettsia* spp, associado a uma sonda interna fluorogênica (5´ 6-FAM – BHQ-1 3´) de 23 nucleotídeos (Quadro 1). Este protocolo de PCR mostrou-se sensível o suficiente para detecção de uma única cópia do gene citrato sintase de *R. rickettsii.*

No caso das amostras extraídas dos carrapatos inicialmente colhidos dos cães em Peruíbe (que foram utilizados para começar as colônias de laboratório), e também de amostras extraídas de larvas de segunda geração (F_2) no final do

experimento, aquelas que foram positivas no real-time PCR descrito acima, foram também testadas por um PCR convencional buscando amplificar um fragmento de 532-pb (pares de base) do gene *ompA,* presente somente em riquétsias do grupo da febre maculosa, utilizando-se os primers e condições descritas por Regnery et al. (1991) (Quadro 1). Neste caso, os produtos de PCR amplificados de 2 ovos F_1 e 2 larvas F_2 foram sequenciados, em sequenciador automático de DNA, conforme previamente descrito (GUEDES et al., 2005) e as sequencias obtidas foram analisadas por análise de *Blast* no Genbank (ALTSCHUL et al., 1990).

As amostras dos grupos negativos e todas as que testaram negativas na PCR pertencentes aos grupos infectados foram testadas para uma PCR que visa amplificar um fragmento de aproximadamente 460-pb do gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos (Quadro 1) (BLACK; PIESMAN, 1994). Esta PCR foi realizada com a finalidade de confirmar a presença de DNA viável nas extrações feitas a partir de carrapatos (controle endógeno), confirmando a real negatividade destas amostras frente a *Rickettsia* spp. Todas as extrações de DNA de órgãos de animais que vieram a óbito durante as infestações foram analisadas por espectrofotômetro, NanoDrop 2000 Thermo®, buscando verificar a concentração de DNA na amostra extraída e a razão de absorvância 260/280 nm foi adotada para verificar a pureza do DNA extraído.

Os produtos amplificados das reações de PCR convencional para os genes: *ompA* e 16S rDNA foram visualizados com aparelho de eletroforese em gel de agarose a 1,5% (100 ml TBE 0,5%; 1,5g agarose UltraPure™ Agarose Invitrogen™), em cuba horizontal e tampão TBE 0,5X (0,045 M Tris-borato; 0,001 M EDTA pH 8,0) submetido à voltagem de 1 a 5 V/cm durante 30 a 45 minutos. A revelação foi feita utilizando um corante atóxico, o Sybr safe®, seguindo recomendações do fabricante, foi misturado junto ao gel de agarose após a homogeneização do mesmo. Este corante possui a mesma sensibilidade que o brometo de etídeo ($C_{21}H_2OBrN_3$) e menor toxicidade, o gel foi então posto em uma câmara escura (Alphalmager®) que emite uma luz ultravioleta e um sistema de software capta a imagem e transfere a mesma para um monitor. As amostras que demonstraram bandas na mesma altura do controle positivo empregado na reação foram consideradas positivas de acordo com o anexo A.

Quadro 1 - Pares de primers utilizados nas reações de PCR no presente estudo

Gene alvo e *primers*	**Especificidade da PCR**	**Sequência dos *primers* (5' → 3')**	**Tamanho do produto amplificado (pb)**	**Referência**
gltA CS5 CS6	Gênero *Rickettsia*	GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT AGGGTCTTCGTGCATTTCTT	147	Labruna et al.(2004)
ompA Rr 190.70 Rr 190.602	Riquétsias do Grupo da Febre Maculosa	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	532	Regnery et al. (1991)
16S rDNA 16S +1 16S -1	Carrapatos e outros ácaros	CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT	460	Black; Piesman, (1994)

4.10 ANÁLISE DOS RESULTADOS CONFORME OS OBJETIVOS PROPOSTOS (Item 3)

<u>OBJETIVO 1- Avaliar a competência vetorial de larvas, ninfas e adultos de *Amblyomma ovale* em transmitir *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica para hospedeiros susceptíveis</u>: Foi analisado pela avaliação clínica e principalmente pela sorologia dos hospedeiros infestados com larvas, ninfas e adultos dos grupos experimentais.

<u>OBJETIVO 2- Avaliar e quantificar a transmissão transovariana de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em carrapatos *Amblyomma ovale* naturalmente infectados</u>: foi avaliado através da PCR de ovos e larvas eclodidas dos grupos experimentais, assim como pela sorologia e avaliação clínica dos hospedeiros infestados com larvas oriundas de fêmeas dos grupos experimentais. A quantificação da transmissão ovariana foi determinada da seguinte forma: foram selecionadas aleatoriamente 2 fêmeas por colônia (8 fêmeas total) onde foi determinada a frequência de ovos e larvas infectadas em cada postura, através da PCR individual de 10 ovos e 10 larvas, realizada para cada postura infectada e não infectada.

OBJETIVO 3- Avaliar e quantificar a transmissão transestadial de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em carrapatos *Amblyomma ovale* naturalmente infectados: foi avaliado através da PCR de ninfas não alimentadas, que mudaram de larvas ingurgitadas alimentadas em hospedeiros nos grupos experimentais, e através da avaliação clínica e sorológica de hospedeiros infestados com essas ninfas. A quantificação de ninfas infectadas foi realizada através da PCR, realizada individualmente em cada ninfa não alimentada. O mesmo procedimento de avaliação foi realizado com adultos não alimentados, que mudaram de ninfas ingurgitadas dos grupos experimentais.

OBJETIVO 4- Avaliar efeitos deletérios da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica em carrapatos *Amblyomma ovale* naturalmente infectados: foi analisada através das comparações entre os grupos Controles e Infectados das proporções de larvas e ninfas ingurgitadas que completaram ecdise e os parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas.

4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise estatística dos dados foi usado o teste de Shapiro-Wilk com intuito de verificar a normalidade de todos os dados. Já para realizar a comparação intragrupos, por se tratar de dados independentes, o teste de ANOVA foi aplicado para os dados paramétricos e o teste de Kruskalll-Wallis como alternativa não paramétrica do método de ANOVA. Quando constatado alguma diferença significativa entre os dados, seguindo estes dois últimos testes, o teste de comparações múltiplas de Bonferroni foi empregado, comparando indiscriminadamente todos os indivíduos de cada um dos grupos sem afetar a taxa de erro de tipo I. Para a comparação entre os grupos controle e infectado foi usado o teste de U-Mann Whitney para aqueles dados sem distribuição normal e o teste t-Student para os dados com distribuição normal. A verificação da homocedasticidade dos dados, quando se fez necessária, foi feita mediante o teste de Levene. Para todos os testes foi utilizado um nível crítico de significância menor ou igual que 0,05

para rejeitar as hipóteses nulas. Todas as análises foram feitas utilizando o programa IBM SPSS 20.

RESULTADOS

5 RESULTADOS

Os resultados adquiridos durante o estudo serão descritos ao longo dos itens 5.1 a 5.8

5.1 OBTENÇÃO DE CARRAPATOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS

Foram coletadas 32 fêmeas de *A. ovale* de um canino (*Canis lupus familiaris*), fêmea no município de Peruíbe, 24°19’12”S 46°59’52”O, litoral Sul do estado de São Paulo, local do caso índice da nova riquetsiose brasileira causada por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica. As mesmas foram postas em um coelho (*Oryctolagus cunicullus*) para realizarem a hematofagia, onde se obteve êxito. Logo foram mantidas em uma incubadora até a realização da postura. Ao término da oviposição, através da realização da PCR de um pool de ovos e subsequentemente de um pool das larvas de cada postura, foram detectadas progênies positivas para *Rickettsia* de duas fêmeas (teleóginas 1 e 31), que foram utilizadas para formarem os grupos infectados do presente estudo, totalizando 6,25% de fêmeas encontradas naturalmente infectadas com *R.parkeri* cepa Mata Atlântica. As outras 30 fêmeas tiveram seus ovos negativos na PCR, sendo que todas foram testadas em duplicata. De forma aleatória as fêmeas 15 e 19 foram escolhidas para constituírem as duas colônias negativas (grupo controle) do experimento.

5.2 INFESTAÇÕES COM LARVAS

Foram utilizadas quatro colônias para infestar 12 *C. callosus* (3 roedores por colônia), sendo que as colônias 15 e 19 formaram os grupos negativos para riquétsias e as colônias 1 e 31 constituíram as colônias dos grupos infectados por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Cada roedor foi infestado com aproximadamente 500 larvas. A observação de 100 larvas ingurgitadas por grupo demonstrou 100% de

ecdise larva-ninfa para larvas provenientes das colônias 15 e 19 (grupos controle) e 95% a 99% de ecdise larva-ninfa, para larvas oriundas das colônias 1 e 31, respectivamente (Tabela 1). Na comparação dos valores médios de ecdise entre os grupos controle e infectados, o teste de U Mann Withney revelou que os valores da ecdise são iguais entre os grupos p=0.33.

Através da PCR individual de 10 ninfas por animal foi verificado 100% de transmissão transestadial larva-ninfa de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica somente na colônia 31. Já a colônia 1 apresentou uma transmissão transestadial larva-ninfa com uma variância de 70 a 90% (Tabela 1), onde os valores obtidos aplicados ao teste de t-Student, revelaram diferenças estatísticas entre as colônias 1 e 31 (grupos infectados),sendo maior a transmissão larva-ninfa da riquétsia para o grupo da colônia 31 (p=0.026). Para as colônias 15 e 19 (grupos controle), todas as amostras foram negativas por PCR.

Após 21 dias transcorridos da infestação, a sorologia dos animais demonstrou que todos os animais que foram expostos a larvas oriundas das colônias infectadas com *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica apresentaram soroconversão frente a antígeno de *R. parkeri* (Tabela 1). Os animais infestados com larvas não infectadas com riquétsias não soroconverteram. Os animais 1 e 5 pertencentes aos grupos controles, colônia 15 e 19, respectivamente, vieram a óbito 2 dias após a infestação com os carrapatos, antes de ocorrer o ingurgitamento e posterior queda das larvas.

Tabela 1 - Infestação com larvas F_1 de *A. ovale* em *C. callosus*: avaliação do período parasitário, %ecdise larva-ninfa, % de transmissão transestadial larva-ninfa de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica pela PCR *gltA* e analise da transmissão para hospedeiro, através da sorologia utilizando a técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri*

Animal	**Colônia**	**Período Parasitário Máximo (dias)**	**% ecdise para 100 larvas por colônia**	**Positividade (%) na PCR para *Rickettsia* (10 ninfas)**	**Título na Sorologia nos dias 0/21 após a infestação**
Grupos Controles					
1	♀ 15	-	100*	-	N/-
2		6		0	N/N
3		5		0	N/N
4	♀19	6	100*	0	N/N
5		-		-	N/-
6		6		0	N/N
Média		**6**	**100***	**0**	**-**
Grupos Infectados					
7	♀31	6	95*	100[a]	N/512
8		6		100[a]	N/1024
9		6		100[a]	N/4096
10	♀1	5	99*	70[b]	N/4096
11		6		90[b]	N/4096
12		7		80[b]	N/512
Média	**-**	**6**	**97***	**90**	**-**

N: Negativo
* valores não apresentam diferença estatística (p=0.33) entre os grupos controles e infectados;
[a,b] letras diferentes indicam proporções significativamente diferentes entre as colônias nos grupos infectados (p=0,026)

5.3 INFESTAÇÕES COM NINFAS

Inicialmente foram utilizadas 4 colônias para infestar 12 *C. callosus* (3 roedores por colônia), de acordo com o item 3.3, mas nesta infestação não se obteve êxito utilizando *C. callosus* como hospedeiro para a fase de ninfas de *A.ovale*, uma vez que muitas das ninfas morreram sem se ingurgitarem e outras foram ingeridas pelos próprios roedores. Portanto, novas infestações foram

realizadas em coelhos domésticos (*Oryctolagus cunicullus*), sendo que foram utilizados 2 animais por colônia, com exceção da colônia 1 que foi utilizado somente um coelho, devido a baixa quantidade de estoque destas ninfas para infestação. As 50 ninfas por animal que foram separadas para avaliação da ecdise ninfa-adulto (Tabela 2) demonstram 100% de ecdise ninfa-adulto em todas as colônias utilizadas no estudo, com proporções similares de ecdise macho e fêmea em relação aos grupos controles e infectados. Após a ecdise, 10 adultos por animal foram separados individualmente para realização da PCR, onde foi possível constatar 100% de transmissão transestadial ninfa-adulto de *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica nas colônias 1 e 31 (infectadas). Para as colônias 15 e 19 (controle), todas as amostras foram negativas pela PCR.

Através da sorologia dos lagomorfos, realizada com soro coletado 21 dias transcorridos da infestação, todos os animais que foram expostos a ninfas oriundas das colônias infectadas com *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica soroconverteram frente a RIFI, utilizando antígeno de *R.parkeri* (Tabela 2). Por outro lado, todos os animais infestados com ninfas não infectadas com *Rickettsia* não soroconverteram. Após a mensuração diária da temperatura retal destes coelhos até o vigésimo-primeiro dia pós-infestação, não foi detectado febre ou alterações clínicas nos mesmos.

Tabela 2 -. Parâmetros da infestação com ninfas de *A. ovale* em *Oryctolagus cunicullus* (coelho), avaliação da transmissão transestadial ninfa-adulto de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica utilizando a PCR para *Rickettsia* (gene *gltA*) e análise da transmissão para hospedeiro, através da sorologia pela técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri* e temperatura retal média dos animais aferida durante 21 dias

Animal	Colônia	Período Parasitário Máximo (dias)	Ecdise para adultos M/F e % (50 ninfas por animal)	Positividade (%) na PCR (10 adultos)	Título na Sorologia nos dias 0/21 após a infestação	Temperatura (°C) retal: média de 21 dias (máxima/mínima)
Grupos Controles						
1	♀15	6	25M/ 25F (100%)	0	N/N	39,02 (39,6/38,3)
2		5	18M/32F (100%)	0	N/N	39,37 (39,8/39,1)
3	♀19	7	22M/28F (100%)	0	N/N	39,3 (39,7/38,9)
4		6	29M/21F (100%)	0	N/N	39,5 (39,9/39)
Média	**-**	**6**	**24M/26F**	**0**	**-**	**39,3 (39,9/38,3)**
Grupos Infectados						
5	♀31	6	23M/27F (100%)	100	N/2048	39,5 (39,9/39,2)
6		5	26M/24F (100%)	100	N/2048	39,25 (39,6/38,7)
7	♀1	6	23M/27F (100%)	100	N/4096	39,3 (39,8/38,6)
Média	**-**	**6**	**24M/26F**	**100**	**-**	**39,3 (39,9/38,6)**

N: negativo;M: machos; F: fêmeas

5.4 INFESTAÇÕES COM ADULTOS

Oito coelhos domésticos (*Oryctolagus cunicullus*) foram utilizados como hospedeiros na infestação com adultos de *A. ovale* (2 animais por colônia). Cada coelho foi infestado com 10 casais de *A. ovale* de acordo com o item 3.4. Após a mensuração do peso das teleóginas, peso das posturas e eclodibilidade dos ovos,

foi possível constatar que a eficiência média reprodutiva das fêmeas de *A.ovale* não infectadas com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica foi superior a das fêmeas infectadas com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica (Tabela 3). A análise descritiva dos dados encontra-se no quadro 2. O teste de Kruskall-Wallis mostra que no grupo controle os animais apresentaram a mesma distribuição dos dados (p=0.98) enquanto os animais do grupo infectado mostraram pelo menos uma diferença (p=0.001). Na comparação intergrupos, o teste de U Mann Withney revelou que a eficiência reprodutiva foi maior nos coelhos pertencentes ao grupo controle (p=0.001). Corroborando com o citado anteriormente foi encontrado na comparação intergrupos, através do teste de U Mann Withney que o peso das posturas das teleóginas foi maior nos coelhos infestados com os carrapatos dos grupos controle (p< 0.001). O teste de Kruskall-Wallis mostrou que no grupo dos infectados existe pelo menos uma diferença entre os indivíduos (p=0.002). Esta diferença encontrou-se com o teste de Bonferroni entre os grupos 5 e 6 (p=0.022); 5 e 7 (p=0.030); 8 e 6 (p=0.005); 8 e 7 (p=0.008). Como os dados de peso das posturas do grupo controle apresentou distribuição normal, foi aplicado o teste de ANOVA e foi observado que as médias dos dados apresentam similitude entre os indivíduos (p=0.341).

Após a seleção aleatória de uma teleógina por coelho, foram coletados 10 ovos para a realização da PCR para *Rickettsia* buscando verificar a transmissão ovariana. Desta mesma fêmea, após a eclosão dos ovos, 10 larvas foram selecionadas para realização individual da PCR e foi possível observar: 100% de transmissão transovariana de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para ambas as colônias (1 e 31) infectadas com a riquétsia, tanto para ovos como para larvas F_2. As colônias 15 e 19 apresentaram todas as amostras negativas na PCR (Tabela 4).

Depois de recuperadas todas as teleóginas, os machos também foram coletados e congelados a -80°C. As taxas de recuperação tanto de fêmeas como de machos estão expressas na tabela 3. Passados 21 dias da infestação, a sorologia dos animais demonstrou que somente o coelho 5 (colônia 1) e o coelho 7 (colônia 31), que foram expostos a adultos oriundos das colônias infectadas com *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, apresentaram soroconversão frente a RIFI, utilizando antígeno de *R.parkeri* (Tabela 4). Já os animais infestados com adultos não infectados com riquétsia não demonstraram soroconversão..

A observação clínica e mensuração diária da temperatura retal destes coelhos até o vigésimo-primeiro dia pós-infestação demonstrou que não houve febre ou

alterações clínicas nos mesmos, com exceção do coelho 6 (Tabela 4) que apresentou temperatura superior a 40°C em apenas um dia, entretanto o mesmo não demonstrou nenhum sinal clínico compatível com FM (Febre Maculosa) e nem soroconversão frente a RIFI.

Tabela 3 - Taxa de recuperação de adultos de *A. ovale*, peso das teleóginas, peso das posturas e eficiência reprodutiva (ER) das fêmeas recuperadas a partir de 10 casais de *A. ovale* levados a infestar cada *Oryctolagus cunicullus* (coelho doméstico)

Animal	**Colônia**	**N° de ♀ recuperadas**	**N° de ♂ recuperads**	**Peso médio das Teleóginas (g)**	**Peso médio das posturas (g)**	**ER média das Teleóginas**	**ER média das colônias**
Grupos Controles							
1	♀ 15	8	10	0,8233	0,4262	50,51%	48,28% C
2		10	9	0,9152	0,4075	46,05%	
3	♀19	7	7	0,8491	0,29	33,73%	36,76% C
4		9	10	0,7285	0,3186	39,78%	
Média	**-**	**9**	**9**	**0,8290[a]**	**0,3605**	**42,52%**	**42,52%**
Grupos Infectados							
5	♀1	10	10	0,7892	0,28	36,1%	22,73% I
6		9	9	0,8170	0,0776	9,35%	
7	♀31	7	4	0,7139	0,071	11,28%	26,39% I
8		10	10	0,7595	0,3118	41,5 %	
Média	**-**	**9**	**8**	**0,7698[b]**	**0,1845**	**24,55%**	**24,55%**

ER: eficiência reprodutiva

[a,b]: letras diferentes na tabela, indicam valores significativamente diferentes entre os grupos controles e Infectados ($p < 0.001$)

Tabela 4 - Infestação com 10 casais de *A. ovale* em *Oryctolagus cunicullus* (coelho doméstico): avaliação da transmissão transovariana de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica pela PCR para *Rickettsia* (gene *gltA*) em ovos e larvas F_2, analise da transmissão para hospedeiro através da sorologia pela técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri* e temperatura retal média dos animais aferida durante 21 dias

Animal	Colônia	Período Parasitário Máximo (dias)	Positividade (%) na PCR (10 ovos F_2)	Positividade (%) na PCR (10 larvas F_2)	Título Sorologia Dias:0/21	Temperatura (°C) média de 21 dias (máxima/minima)
Grupos Controles						
1	♀15	23	0	0	N/N	39,6 (40/39)
2		23	0	0	N/N	39,6 (39,9/39,1)
3	♀19	29	0	0	N/N	39,37 (39,7/39,1)
4		25	0	0	N/N	39,47 (40/39,2)
Média	**-**	**25**	**0**	**0**	**-**	**39,51 (40/39,1)**
Grupos Infectados						
5	♀1	27	100	100	N/2048	39,32 (39,8/37)
6		33	100	100	N/N	39,55 (40,8/39,1)
7	♀31	25	100	100	N/64	39,55 (39,8/39,3)
8		21	100	100	N/N	39,5 (39,9/39,2)
Média	**-**	**26**	**100**	**100**	**-**	**39,48 (40,8/37)**

N: negativo

Quadro 2 - Análise descritiva dos valores da eficiência reprodutiva, comparando todas as teleóginas recuperadas dos coelhos (*Oryctolagus cunicullus*) dos grupos controles e infectados

Coelho	Média (Desvio padrão)	Min-Max	Valor p*
Grupos Controles			
1	50,5 % (15)	15,2%-61,3%	0.004
2	46% (16)	1,6%-59,4%	0.001
3	33,7% (14)	13%-53%	0.427
4	39,8% (23)	0- 61,5%	0.019
Total	**42,9% (18)**	**0-61,5%**	**-**
Grupos Infectados			
5	36,1% (17)	0-52,7	0.101
6	9,3% (13)	0-37	0.012
7	11,3% (19)	0-42,1	0.001
8	41,5% (18)	5,5-58,9	0.122
Total	**26% (21)**	**0-58,9**	**-**

*Valor p do teste Shapiro Wilk

Coelhos 1 e 2=colônia 15; Coelhos 3 e 4: colônia 19; Coelhos 5 e 6: colônia 1; Coelhos 7 e 8: colônia 31

5.5 INFESTAÇÕES COM LARVAS F_2

Foram utilizadas as Larvas F_2 das mesmas colônias do item 3.2, para infestar 8 *C. callosus* (2 por colônia). Cada roedor foi infestado com aproximadamente 500 larvas. Após a observação da ecdise de 50 larvas F_{2-}ninfas $F_{2,}$ por animal infestado, observou-se que as larvas coletadas dos roedores 1 e 6, pertencentes as colônias 15 e 31 respectivamente, apresentaram ecdise de 98% o restante das larvas observadas (50 por animal) apresentaram ecdise de 100%, larvas F_{2-} ninfas F_2. Após a realização da PCR *gltA* de 10 ninfas por animal foi possível observar 100% de transmissão transestadial larva-ninfa de *R.parkeri* cepa Mata Atlântica para geração F_2. Depois de 21 dias transcorridos da infestação, a sorologia dos animais, demonstrou que todos os animais que foram expostos a larvas F_2 oriundas das colônias infectadas com *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica apresentaram soroconversão frente a antígeno de *R. parkeri*. Os animais infestados com larvas F_2 não infectadas com *Rickettsia* não soroconverteram (Tabela 5).

Tabela 5 - Infestação com larvas F_2 de *A. ovale* em *C. callosus*: avaliação do período parasitário, % de ecdise larva F_2-ninfa F_2, transmissão transestadial larva-ninfa F_2 de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica pela PCR *gltA* e analise da transmissão para hospedeiro, através da sorologia utilizando a técnica de imunofluorescência indireta com antígeno de *R. parkeri*

Animal	Colônia	Período Parasitário (dias)	% ecdise (50 larvas por animal)	Positividade na PCR (10 ninfas F_2)	Título na sorologia nos 0/21
Grupos Controles					
1	♀15	6	98	0	N/N
2		6	100	0	N/N
3	♀19	7	100	0	N/N
4		6	100	0	N/N
Média	**-**	**6**	**99,5**	**0**	**-**
Grupos Infectados					
5	♀31	6	100	100	N/1024
6		6	98	100	N/1024
7	♀1	6	100	100	N/1024
8		7	100	100	N/2048
Média	**-**	**6**	**99,5**	**100**	**-**

5.6 PCR DO BAÇO E PULMÃO DOS ANIMAIS QUE VIERAM A ÓBITO

A extração de DNA a partir de órgãos internos dos roedores que morreram durante as infestações foi realizada através de kit comercial (DNEasy Tissue Kit, Qiagen, USA). Os órgãos utilizados foram baço e pulmão, coletados logo após o óbito dos animais. Através de PCR, cada amostra de DNA extraído foi testada individualmente pelo protocolo de real-time PCR descrito por Labruna et al. (2004), sendo que todas amostras foram negativas pela PCR. As 4 amostras de DNA extraídas foram submetidas a espectrofotômetro, que demonstrou que todas elas possuíam uma concentração superior a 56 ng/µL de DNA e a relação de absorvância 260/280 nm foi usada para verificar o grau de pureza deste DNA, sendo

que todas amostras tiveram uma relação superior a 1,8. Ressalta-se que os animias que vieram a óbito pertenciam aos grupos controles.

5.7 PCR DO GENE MITOCONDRIAL 16S rDNA DAS AMOSTRAS DE CARRAPATOS DOS GRUPOS CONTROLES E AMOSTRAS NEGATIVAS PARA *Rickettsia* DOS GRUPOS INFECTADOS

Esta PCR foi feita para confirmação da presença de DNA nas extrações (controle endógeno), confirmando a negatividade destas amostras para riquétsias. Todas amostras testaram-se positivas na PCR (Anexo A).

5.8 PCR PARA O GENE *ompA* DE *Rickettsia* EM OVOS F_1 E LARVAS F_2 DOS GRUPOS POSITIVOS E SEQUENCIAMENTO

O DNA de dois ovos F_1 e duas larvas F_2 de cada um dos grupos infectados que foram positivas no real-time PCR, foram também testadas por um PCR convencional amplificando um fragmento de 532 pb do gene *ompA* descrito no item 4.9. Neste caso, os produtos de PCR amplificados dos ovos e larvas F_2 foram sequenciados em sequenciador automático de DNA, conforme previamente descrito (GUEDES et al. 2005). As sequencias obtidas foram analisadas por análise de *Blast* no Genbank (ALTSCHUL et al., 1990) demonstrando 100% de similaridade com a sequencia do Genbank n° 855237 (*Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica).

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

Os resultados adquiridos no transcorrer deste estudo serão discutidos analisando dados presentes na literatura, nos itens abaixo.

6.1 OBTENÇÃO DE CARRAPATOS INFECTADOS E NÃO INFECTADOS

Para começar o estudo foram necessárias colônias de carrapatos *A. ovale* livres de riquétsias e uma colônia de *A. ovale* naturalmente infectada com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Para tal, foi realizada uma coleta de carrapatos em Barra do Una, no município de Peruíbe (Figura 7), cidade do caso índice da nova riquetsiose brasileira causada por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica (SPOLIDORIO et al., 2010), onde 32 fêmeas ingurgitadas de *A. ovale* foram coletadas em janeiro de 2011 de cães (*Canis lupus familiaris*) naturalmente infestados. Em Peruíbe há um intenso turismo ecológico, devido aos vários parques existentes, como a Estação Ecológica Juréia-Itatins e praias como Barra do Una, gerando assim risco à população que fica exposta ao parasitismo por *A. ovale*.

Após a PCR e sequenciamento dos produtos amplificados, obtidos de duas (6,25%) teleóginas, foi possível verificar que estavam naturalmente infectadas com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Num estudo recente nesta mesma Estação Ecológica Juréia-Itatins, Szabó et al. (2012a[6]), obtiveram resultados muito semelhantes com carrapatos *A. ovale*, sendo 12,9% de infecção por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para carrapatos coletados de cães e 6,3% para carrapatos coletados da vegetação. Na região de Cubatão, numa outra área de preservação de Mata Atlântica no estado de São Paulo, Sabatini et al. (2010) obtiveram 13,6 % de infecção com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica de carrapatos *A. ovale* coletados de cães e 8,8% de *A.ovale* de vida livre.

Barbieri (2012) encontrou 7,79% de infecção por *R. parkeri* cepa Mata Atlântica em adultos de *A. ovale* que estavam parasitando cães em área de Mata Atlântica no estado de Santa Catarina, sendo este achado semelhante ao diagnosticado no presente estudo (6,25%). Já, Medeiros et al. (2011) encontraram

3,66% de carrapatos desta mesma espécie, infectados com esta nova cepa de riquétsia, também no estado de Santa Catarina. Como todos esses estudos se basearam em técnicas moleculares semelhantes (PCR seguido de sequenciamento de DNA), estes resultados indicam que existe uma variação considerável na taxa de carrapatos naturalmente infectados com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica na natureza, mas todos eles corroboram para a real importância do *A. ovale* como vetor desta nova riquetsiose brasileira, uma vez que *A. ovale* é uma das principais espécies de carrapatos que parasitam humanos no bioma Mata Atlântica (SZABÓ et al., 2006; SPOLIDORIO et al., 2010; SABATINI et al., 2010).

Bermúdez et al. (2009), em 2007 encontraram através de PCR e sequenciamento, 27,9% de carrapatos *A. ovale* em fase parasitária sobre animais domésticos, no Panamá, infectados com *Rickettsia amblyommii* demonstrando assim que este carrapato pode estar infectado com outras bactérias do Grupo da Febre Maculosa (GFM). Da mesma forma, este carrapato já fora relatado infectado por *Rickettsia bellii,* espécie não patogênica, em diferentes regiões do Brasil (LABRUNA et al. 2011a).

Todos os trabalhos citados anteriormente demonstram altas taxas de infecção natural por riquétsias em carrapatos *A. ovale*, visto que as taxas de infecção pela bactéria *R. rickettsii*, principal agente da FMB, são geralmente abaixo de 1,5% no ixodídeo *A. cajennense*, principal vetor desta enfermidade no Brasil. Corroborando com isto, Guedes et al. (2005) constataram que 1,28% de *A. cajennense* coletados entre 2003 e 2004 em uma área endêmica para FMB no estado de Minas Gerais, estavam infectados com *R. rickettsii.* Transcorridos 3 anos, Guedes et al. (2011) encontraram em 2007, 0,5% de *A. cajennense* infectados com *R. rickettsii*, utilizando PCR e sequenciamento dos amplificados, nesta mesma área. Esses valores estão dentro do esperado para outros vetores da Febre Maculosa por *R. rickettsii* (BURGDORFER, 1988; PINTER; LABRUNA, 2006)

Dados de um trabalho realizado com carrapatos *Amblyomma variegatum* coletados na África são importantes de serem citados neste estudo, pois detectaram através de PCR que 82,5% (33/40), destes carrapatos capturados de gado zebuíno (*Bos primigenius indicus*) estavam naturalmente infectados com *Rickettsia africae* (SOCOLOVSCHI et al., 2009), sendo esta bactéria também pertencente ao GFM e de acordo com Spolidorio et al. (2010) *R. parkeri* cepa Mata Atlântica está filogeneticamente próxima de *R. africae* (Figura 1).

Figura 7 - Localização de Peruíbe, SP, Brasil. Local onde foram coletadas as teleóginas que deram inicio ao estudo. Área de Bioma de Mata Atlântica

Fonte: Wikipédia, 2012

6.2 TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL DE *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica ENTRE LARVA-NINFA EM CARRAPATOS *A. ovale*

Seguidamente à infestação com larvas de *A. ovale* em *C. callosus* (item 4.2), foi verificado através de PCR (item 4.9) que houve uma taxa de transmissão transestadial (larva-ninfa) diferente entre as duas colônias infectadas com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Neste caso, a colônia 31 demonstrou 100% de transmissão e a colônia 1 apresentou uma inconstância entre 70 a 90%, havendo diferença significativa entre a transmissão ocorrida entre as colônias 31 e 1 (p=0,026) (Tabela 1). Nieri (2012) conduziu um estudo semelhante ao presente e detectou 100% de transmissão transestadial de *R. parkeri* cepa At 24 durante 4 gerações para todas as fases do carrapato *Amblyomma triste*. Labruna et al (2011b) também obtiveram resultados de 100% de transmissão transestadial de *R. rickettsii* no carrapato *A. aureolatum* durante 4 gerações consecutivas, provando a importância deste carrapato como vetor de FMB.

Horta et al. (2010) conseguiram detectar que 4,2% de ninfas de *A. cajennense* que haviam realizado repasto sanguíneo na fase de larva em gambá da orelha preta (*Didelphis aurita*), experimentalmente infectados com *R. parkeri* cepa At 24, foram capazes de manter a infecção para fase de ninfa.

Soares et al. (2012), analisando a dinâmica da infecção por *R. rickettsii* em *A. cajennense*, constataram através de RIFI e PCR que existe diferença entre a transmissão transestadial da bactéria, larva-ninfa, dependendo do estágio em que o artrópode foi infectado. Esses autores tiveram os seguintes resultados: a transmissão larva-ninfa, quando a aquisição da infecção ocorreu na fase de larva F_1, foi ≥ 5%; quando a infecção pela bactéria ocorreu na fase de ninfa F_1, a transmissão transestadial larva-ninfa F_2 foi de 3,3%.

A análise da ecdise (larva-ninfa) entre os grupos controle e infectados, também foi observada e foi possível constatar que os grupos infectados apresentaram taxas de ecdise de 1 a 5% a menos do que os grupos controle, que demonstraram 100% de ecdise (larva-ninfa). Porém, na comparação dos valores médios entre os grupos, o teste de U Mann Withney revelou que os valores da ecdise são iguais entre os grupos ($p=0.33$), sugerindo a ausência de patogenicidade significativa da bactéria para esta fase de vida do carrapato. Diferentemente, Soares et al. (2012) notaram que quando *A. cajennense* se infectou na fase de larva com *R. rickettsii,* ocorreu uma diminuição significativa da ecdise larva-ninfa, demonstrando papel patogênico desta riquétsia para o próprio vetor.

A infestação com larvas de *A.ovale* em *C. callosus* demonstrou alta susceptibilidade deste roedor a esta fase do carrapato, como foi demonstrado por Martins, Moura e Labruna (2012).

6.3 TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL DE *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica ENTRE NINFA-ADULTO EM CARRAPATOS *A.ovale*

A primeira tentativa de infestação com ninfas de *A. ovale* foi realizada em *C. callosus*, onde não se obteve êxito. Desta forma, novas infestações dentro de câmaras de pano, coladas ao dorso de coelhos domésticos foram necessárias para o transcorrer da presente perquisição. Num estudo prévio, Martins, Moura e Labruna

(2011) também obtiveram baixas taxas de recuperação de ninfas ingurgitadas de *A. ovale,* quando se usou *C. callosus* como hospedeiros.

Com o auxilio da PCR foi possível demonstrar 100% de transmissão entre os estágios de ninfa-adulto de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, para carrapatos de ambas as colônias infectadas. Nieri (2012) obteve o mesmo resultado do presente trabalho, trabalhando com *R. parkeri* cepa At 24 (SILVEIRA et al., 2007) em *A. triste*. Labruna et al. (2011b) também obtiveram resultados semelhantes para *R. rickettsii* em *A. aureolatum*, durante 4 gerações consecutivas. Da mesma forma, Socolovschi et al. (2009), analisando a transmissão transestadial de *R. africae* em *A. variegatum* detectaram pela PCR 100% de transmissão entre ninfa-adulto durante 3 gerações deste artrópode.

Goddard (2003), utilizando a técnica de hemolinfa observou que 53% (80/150) de ninfas de *Amblyomma americanum* que foram artificialmente infectadas com *R. parkeri*, foram capazes de transmitir a bactéria para o seu estágio adulto, diferindo dos dados obtidos neste estudo e também de outros estudos que avaliaram esta mesma espécie de riquétsia em outras espécies de carrapatos (NIERI, 2012). No entanto, esta técnica de hemolinfa, baseada em microscopia óptica, é bem menos sensível que a PCR (LABRUNA et al., 2004).

Soares et al. (2012), observaram com o amparo de PCR, que 16% a 62,2% de *A. cajennense* infectados com *R. rickettsii* eram capazes de transmitir esta bactéria para o estágio subsequente (ninfa-adulto), sendo que esta grande variação estava diretamente relacionada com a fase em que o artrópode infectou-se com a riquétsia.

Burgdorfer em 1963, utilizando técnicas de microscopia óptica (Imunofluorescência), infestação de cobaios (*Cavia porcellus*) com carrapatos e inoculação de macerado de carrapatos em embriões de galinhas, detectou que ocorre 100% de transmissão de *R. rickettsii* em *Dermacentor andersoni* entre todos os estágios do carrapato. *D. andersoni* é um dos principais vetores da febre maculosa nos Estados Unidos.

A taxa de ecdise observada no presente estudo entre ninfa-adulto foi de 100% para ambas as colônias (Tabela 2), não apresentando efeito deletério de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para estas fases do carrapato *A. ovale*. Contrapondo o verificado, Nieri (2012) demonstrou através de observação de ecdise, durante 4 gerações do artrópode *A. triste*, que as ninfas ingurgitadas, que estavam infectadas

com *R. parkeri* cepa At 24 possuíam taxas de mortalidade superior às ninfas do grupo controle.

6.4 TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA DE *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica PARA OVOS E LARVAS F_2 DE *Amblyomma ovale*

Após as infestações com *A. ovale* em coelhos doméstico (*Oryctolagus cunicullus*) de acordo com item 4.4, onde obteve-se êxito (Figura 8) com alta taxa de recuperação de carrapatos alimentados (Tabela 3), foram analisados todos os dados reprodutivos das fêmeas ingurgitadas e também através de PCR verificou-se a taxa de transmissão transovariana da bactéria, e a perpetuação da mesma para as larvas F_2 (Tabelas 3-4). Com isto foi possível verificar que o peso das posturas e a eficiência reprodutiva (ER) das fêmeas pertencentes aos grupos controles foram superiores aos dos grupos infectados, pois na comparação intergrupos, o teste de U Mann Withney revelou que o peso da postura e a eficiência reprodutiva foram maiores nos coelhos controle, com o mesmo valor de significância para as duas analises (p=0.001). Desta forma, fica demonstrado o efeito deletério da *R. parkeri* cepa Mata Atlântica sobre os parâmetros reprordutivos de fêmeas alimentadas de *A. ovale*. Estes dados entram em concordância com o que foi observado por Nieri (2012) para fêmeas de *A. triste* infectadas por *R. parkeri* cepa At24. Recentemente, *R. rickettsii* também foi apontada como deletéria sob o aspecto reprodutivo de fêmeas alimentadas de *A. cajennense* e *A. aureolatum* (LABRUNA et al., 2011b; SOARES et al., 2012).

Figura 8 - Coelho (*Oryctolagus cunicullus*) infestado com adultos de *Amblyomma ovale*

A transmissão transovariana observada na presente perquisição demonstrou que fêmeas de *A. ovale* mostraram-se capazes de realizar 100% de transmissão de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para sua progênie. A verificação da taxa de infecção pela bactéria nas larvas F_2, oriundas destes ovos infectados também apresentou 100% de infecção, a análise tanto de ovos como de larvas infectadas se fez necessária pois a eclodibilidade de ovos infectados com riquétsias pode ser prejudicada, sendo isto já observado para outras espécies de carrapatos (LABRUNA et al., 2011b; NIERI, 2012; SOARES et al., 2012). No presente estudo também foi observado que a eclosão de ovos originados por fêmeas infectadas com a riquétsia foi inferior ao visto no grupo controle.

Burgdorfer e Brinton (1975) relataram que a infecção dos ovos de fêmeas de *Dermacentor andersoni* por *R.rickettsii* está intimamente ligada à fase em que o carrapato infectou-se com a bactéria, sendo que quando isto ocorre na fase de adulto a transmissão transovariana inexiste ou é muito baixa, pois não haveria tempo hábil para a bactéria colonizar o ovário e penetrar nos ovócitos.

O efeito deletério que as riquétsias exercem sobre as fêmeas de carrapatos, interferindo na sua reprodução, é apontado por vários autores como um fator responsável pelas taxas de infecção abaixo de 50% em carrapatos na natureza,

mesmo quando as transmissões transestadiais atinjam 100% de êxito (BURGDORFER, BRINTON., 1975; GUEDES et al., 2005, 2011; PINTER, LABRUNA., 2006; SABATINI et al., 2010; BARBIERI, 2012; SZABÓ et al., 2012a). Neste cenário, pressupõe-se que a bactéria necessite de hospedeiros vertebrados amplificadores, para que ocorra a sua manutenção na natureza. Neste caso, um hospedeiro amplificador seria aquele que, uma vez parasitado por um carrapato infectado, desenvolveria alguns dias ou semanas de riquetsemia, quando carrapatos não infectados poderiam se infectar durante a hematofagia, e neste caso, resultando em novas linhagens de carrapatos infectados. Sem a participação desses hospedeiros amplificadores, é esperado que a infecção desapareça da população de carrapatos ao longo de sucessivas gerações, em função dos efeitos deletérios de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para *A. ovale.* De toda forma, ainda não são conhecidas espécies de hospedeiros amplificadores de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para *A. ovale.*

6.5 TRANSMISSÃO TRANSESTADIAL DE *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica ENTRE LARVAS F_2-NINFA F_2 EM CARRAPATOS *A.ovale*

Larvas de segunda geração foram levadas a infestar *C. callosus*, obtendo-se excelentes resultados nas infestações com este hospedeiro, como demonstrado por Martins, Moura e Labruna (2012). A transmissão larva-ninfa, geração F_2 de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica foi de 100% para ambas as colônias infectadas (Tabela 5), diferindo do que foi encontrado para a colônia 1 na geração anterior (Tabela 1). Estes dados corroboram com o que foi analisado por Nieri (2012) que verificou a perpetuação de *R. parkeri* cepa At 24 entre larva-ninfa, durante 4 gerações de *A. triste*. Labruna et al. (2011b) também obtiveram o mesmo resultado quando analisaram este fator, trabalhando com *R. rickettsii* no carrapato *A.aureolatum*.

A ecdise do carrapato também não foi prejudicada pela bactéria nesta segunda geração, como pode ser observado na tabela 5.

6.6 COMPETÊNCIA VETORIAL DE: LARVAS, NINFAS, ADULTOS E LARVAS F_2 DE *Amblyomma ovale* PARA *R. parkeri* cepa Mata Atlântica

Foram utilizados no estudo 30 espécimes de *C. callosus* e 15 espécimes de coelho doméstico (*Oryctolagus cunicullus*). Para a infestação com a fase de larvas os roedores mostraram-se hospedeiros eficientes, mas quando os mesmos foram infestados com ninfas a infestação foi incapaz de dar continuidade ao experimento. Neste contexto os lagomorfos foram empregados como hospedeiros para as fases de ninfas e adultos de *A. ovale*, apresentando susceptibilidade a estas fases do carrapato, entrando em concordância com o que foi verificado por Martins, Moura e Labruna (2012). Nenhum animal infestado com os ixodídeos, durante o experimento, manifestou sinal clínico compatível com rickettsiose. Apesar do coelho 6 (infestado com carrapatos adultos) ter manifestado em uma única aferição, temperatura retal de 40,8°C, acredita-se que o fato não foi causado pela riquétsia, mas sim por outro fator desconhecido, pois o animal não soroconverteu para *R. parkeri* através da RIFI.

Através da RIFI foi possível observar que tanto as larvas como as ninfas de *A. ovale* foram altamente eficientes na transmissão de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para vertebrados, pois todos os roedores e lagomorfos que foram infestados com carrapatos infectados soroconverteram, apresentando títulos ≥64. Já o estágio adulto de *A. ovale* mostrou-se parcialmente competente como vetor de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, uma vez que apenas dois (50%) dos quatro coelhos expostos a carrapatos adultos infectados soroconverteram aos 21 dias após a infestação. A hipótese de interferência de fatores intrínsecos do coelho (imunidade, refratariedade e tolerância imunológica), são hipóteses a serem consideradas, e mais estudos analisando estas variáveis devem ser realizados. Como esperado, todos os animais que foram infestados com carrapatos oriundos das colônias controle, foram negativos na RIFI, utilizando antígeno de *R.parkeri* na diluição do soro de 1:64.

Nieri (2012) observou através de RIFI, que *A.triste* foi competente na transmissão de *R. parkeri* cepa At 24 (SILVEIRA et al., 2007) em todas suas fases de vida parasitária, utilizando como hospedeiro coelhos, durante 4 gerações. Soares et al. (2012) verificaram pela RIFI que todos os estágios parasitários de *A. cajennense* foram capazes de transmitir *R. rickettsii* para os seus respectivos

hospedeiros, mas os autores observaram que larvas apresentaram menor competência, quando comparadas com ninfas e adultos do carrapato.

Goddard (2003) demonstrou através da avaliação de alterações clínicas de cobaios (*Cavia porcellus*), que *A. americanum* artificialmente infectado com *R. parkeri* foi capaz de transmitir em baixos níveis a bactéria para os cobaios infestados com carrapatos infectados.

Os dados adquiridos no presente estudo, associados a antecedentes epidemiológicos (SZABÓ et al. 2006, 2012; SABATINI et al 2010; SPOLIDORIO et al 2010), indicam que *A. ovale* seja o provável vetor de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para humanos. Uma vez que larvas e ninfas de *A. ovale* não parasitam humanos, é possível que nem todas as pessoas parasitadas por adultos infectados de *A. ovale* venham a contrair a infecção, pois a competência vetorial deste estágio do carrapato para esta riquétsia parece ser apenas parcial.

6.7 IMPORTÂNCIA DO *Amblyomma ovale* NA EPIDEMIOLOGIA DA NOVA RIQUETSIOSE BRASILEIRA CAUSADA POR *R. parkeri* cepa Mata Atlântica

Com ampla distribuição desde o México até a Argentina (GUGLIELMONE et al., 2003), o ixodídeo *A. ovale*, possui pouca especificidade parasitária, apesar de sua maior afinidade na fase adulta estar voltada as famílias de carnívoros existentes na região neotropical (LABRUNA et al., 2005a), onde o cão doméstico (*Canis lupus familiares*) aparece como a espécie de carnívoro com o maior número de relatos sofrido por este ectoparasita (GUGLIELMONE et al., 2003). Labruna et al. (2010) também reforçam que *Tapirus terrestris* (Anta) pode ser um hospedeiro importante para esta fase do carrapato, em áreas menos antropizadas. As fases juvenis do carrapato; larvas e ninfas, como a grande maioria dos carrapatos pertencentes a este gênero (*Amblyomma*), possuem ainda menor restringência de hospedeiros, sendo relatadas em uma grande diversidade de espécies de mamíferos, que vão desde: pequenos roedores a marsupiais, aves e carnívoros (GUGLIELMONE, et al., 2003; OGRZEWALSKA et al., 2009b; MARTINS; MOURA; LABRUNA., 2012; SARAIVA et al., 2012).

Sabatini et al. (2010) sugeriram que *A. ovale* seja o vetor da *R. parkeri* cepa Mata Atlântica para humanos, que tendem a sofrer uma febre maculosa mais branda (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011) na região de Mata Atlântica do Brasil. Szabó et al (2012a[6]), além de verificarem alto grau de parasitismo em cães com adultos *A.ovale* na área do caso índice desta nova riquetsiose no município de Peruíbe, conseguiram também pela primeira vez isolar este novo genótipo de *R. parkeri* em células Vero. Os autores também observaram, utilizando PCR e sequenciamento dos amplificados, que 12,9% (30/232) dos carrapatos *A. ovale* capturados de cães nesta área endêmica, estavam infectados com o novo genótipo de riquétsia. Outro fator de extrema importância, citado pelos mesmos autores, foi a notável predileção dos estágios imaturos (principalmente ninfas) de *A. ovale* para parasitarem o roedor *Euryoryzomys russatus,* nos quais foi relatada uma frequência de 35,3% (6/17) de animais soropositivos a *R. parkeri.* Desses roedores soropositivos, pelo menos 17,6% (3/17) apresentaram reação considerada homóloga a antígenos de *R.parkeri,* pois apresentaram títulos no mínimo quatro vezes maior para esta espécie de riquétsia, do que para as outras espécies de ocorrência confirmada no Brasil. Desta forma, torna-se extremamente oportuno que novos estudos avaliem um possível papel de hospedeiro amplificador de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica que roedores *Euryoryzomys russatus* possam apresentar para carrapatos *A. ovale*.

Medeiros et al. (2011), depois de terem capturado 260 carrapatos de animais domésticos e silvestres entre 2006-2008, detectaram com o auxílio da PCR, amplificando e sequenciando um fragmento do gene *ompA* (REGNERY et al., 1991) que *R. parkeri* cepa Mata Atlântica estava infectando 3 exemplares de *A. aureolatum*, 3 *A. ovale* e 1 *R. sanguineus* coletados de cães no estado de Santa Catarina. Barbieri (2012) utilizando as mesmas técnicas empregadas por Medeiros et al. (2011), detectou que 10% de *A.aureolatum* e 7,79% de *A.ovale* coletados de cães, oriundos de Blumenau, Santa Catarina (área de Mata Atlântica), estavam infectados com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica. Este autor também consegui o isolamento da bactéria em cultivo celular e ressaltou que os exemplares de *A. aureolatum* infectados com a riquétsia coparasitavam cães infestados com *A. ovale*.

---

[6] SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. In print, 2012a

Estes trabalhos reforçam a distribuição desta nova cepa de *R. parkeri* descrita por Spolidorio et al. (2010) ao longo do bioma de Mata Atlântica no Brasil e apontam a importância de *A. ovale* como vetor desta riquetsiose humana. Por outro lado, a infecção de outras espécies de carrapatos que parasitam cães, juntamente com *A. ovale* nessas áreas de ocorrência de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, sugerem que essas outras espécies possam também ter um papel secundário na transmissão desta nova riquetsiose. Neste caso, vale ressaltar que um dos isolados em cultivo celular de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica obtidos por Barbieri (2012) foi oriundo de um carrapato *A. aureolatum,* o qual também tem antropofilia significante (PINTER; LABRUNA, 2006).

Pela primeira vez em 2005 o estado do Rio Grande do Sul (RS) notificou um caso de FMB. Posteriormente, no intervalo de 2005 a 2009, foram confirmados 7 casos da doença no estado (DADOS MINISTÉRIO DA SAÚDE). Sangioni et al. (2011), através de uma perquisição sorológica pela RIFI, realizada com soro de cães, equinos e humanos alocados no município de Cerro Largo-RS (bioma Mata Atlântica), região endêmica para enfermidade no estado, observaram que 51,6% dos equinos, 22,3% dos cães e 29,6% dos humanos haviam entrado em contato em algum momento com riquétsias do GFM, mas sem conseguir determinar qual foi o antígeno provável. No período de 2006 a 2007, vinte exemplares de carrapatos que se encontravam fixados ou caminhando sobre a pele de humanos da cidade de Cerro Largo, foram encaminhados ao Laboratório Central do RS (LACEN) para identificação taxonômica, sendo todos identificados como *Amblyomma ovale*. Saito et al. (2008), também empregando a RIFI, utilizando amostras de 389 cães, amostrados em 8 cidades do RS, todas localizadas no Bioma de Pampa, conseguiram uma soroprevalência de 42,4% de soropositividade nas amostras. Os mesmos autores apresentam um dado de extrema relevância para esta discussão, que foi a identificação de 25,7% destes cães apresentando reação 4 vezes superior frente ao antígeno de *R. parkeri* em relação as outras riquétsias testadas, apresentando homologia com infecção causada por *R.parkeri* (HORTA et al., 2004).

Os dados citados anteriormente, relacionados ao RS, sugerem que o possível agente etiológico dos casos de riquetsioses no RS esteja correlacionado com *R. parkeri* cepa Mata Atlântica, pois na revisão bibliográfica de Evans, Martins e Guglielmone (2000) foram apresentados vários relatos de *A. ovale* no RS. Entretanto, até o presente momento, inexiste isolado de riquétsias do GFM oriundas

do RS e nenhuma detecção de riquétsias através de PCR de carrapatos foi demonstrada para este estado.

No Uruguai primeiramente Conti-Díaz et al. (1990), afirmaram a partir de métodos sorológicos (RIFI) que o agente causador da febre manchada (nomenclatura usada para Febre Maculosa no Uruguai), neste país era *Rickettsia conorii*. Recentemente, Venzal et al. (2012), demonstram de forma incontestável que os casos de febre maculosa em regiões endêmicas para enfermidade no país, apresentavam como agente *R. parkeri*. Para isto os autores coletaram entre 2000 e 2005, 245 exemplares de *A. triste* e 180 de *R. sanguinues.* Através de amplificação e sequenciamento de um fragmento dos genes *gltA* e *ompA*, foram encontrados 11.8 a 37.5% dos carrapatos *A. triste* infectados com *R.parkeri.* Nenhum *R. sanguineus* apresentou DNA de riquétsias. Somado a isto, Venzal et al. (2003) apontaram que *A. triste* é o carrapato mais antropofílico no Uruguai, com maior número de casos parasitando humanos. Portanto *R. parkeri* irrefutavelmente é o agente da febre maculosa no Uruguai e possui como vetor *A. triste*. No Brasil Silveira et al. (2007) isolaram pela primeira vez *R. parkeri* desta espécie de carrapato, mas até o momento, nenhum caso de FMB tem sugerido como vetor *A. triste*, pois por motivos ainda desconhecidos esta espécie de carrapato no Brasil apresenta-se pouco antropofílica. É importante ressaltar que o bioma predominante no Uruguai é o Pampa, com características ecológicas bem distintas da Mata Atlântica.

R.parkeri também é apontada como agente causal de febre maculosa na Argentina (ROMER et al., 2011), sendo que em 2008, 9.7% de *A. triste* analisados por PCR, neste país, apontaram infecção por *R.parkeri* (NAVA et al., 2008). Esses achados também apontam que esta enfermidade na Argentina seja transmitida por *A.triste,* semelhantemente ao Uruguai.

Somente carrapatos são incriminados como vetores de *R.parkeri* até o momento (PARKER et al.,1939; VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; SABATINI et al., 2010; SILVA et al., 2011; MEDEIROS et al., 2011; VENZAL et al., 2012; BARBIERI, 2012; SZABÓ et al., 2012a[7]). Goddard et al. (2012) tentaram a infecção experimental por *R. parkeri* em hemípteras do gênero *Cimex*, e analisaram se estes eram capazes de transferir ou manter a bactéria, mas não obtiveram êxito

[7]SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. In print, 2012a

algum. Esses resultados reforçam que os carrapatos são os verdadeiros vetores desta espécie de riquétsia, recentemente descoberta como patogênica para humanos (PADDOCK et al., 2004).

A riquetsiose causada por *R. parkeri* apresenta uma sintomatologia mais branda, sem relatos de óbitos, ao contrário dos casos frequentemente severos que têm como agente causal a espécie *R. rickettsii*. Os sinais clínicos mais comuns são: dor de cabeça, erupções cutâneas (mais brando que *R. rickettsii*), mialgia, artralgia, linfadenopatia regional, escara de inoculação “tache noire”, febre com temperatura geralmente inferior a 40°C, mal estar, diarréia, náuseas e/ou vômitos (PADDOCK et al., 2004; ROMER et al., 2011), sendo que os casos que apontam esta riquétsia como agente etiológico de febre maculosa no Brasil descrevem sintomatologia semelhante às descritas anteriormente (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 20011; SANGIONI et al., 2011).

Analisando tudo que foi citado acima pelos autores e a todos os dados adquiridos no presente estudo, doravante pode-se inferir que o ixodídeo *A. ovale* é o vetor da nova riquetsiose brasileira, causada por *R.parkeri* cepa Mata Atlântica, no bioma de Mata Atlântica. Esta nova cepa de riquétsia consegue perpetuar muito bem entre os estágios imaturos do carrapato (100% transmissão transestadial) e possui uma taxa de 100% de transmissão ovariana no artrópode *A.ovale*. Entretanto, foi possível verificar efeito deletério da bactéria sobre as fêmeas infectadas, o que explica as frequências relativamente baixas de *A. ovale* naturalmente infectados na natureza (SABATINI et al 2010; MEDEIROS et al., 2011; BARBIERI, 2012; SZABÓ et al., 2012a[8]), apesar da taxa de transmissão transestadial e transovariana serem elevadas (100%). Desta forma, em áreas endêmicas as populações de *A. ovale* podem ser ineficientes na manutenção desta riquétsia na natureza, sendo necessária a participação de hospedeiros amplificadores da bactéria, favorecendo assim a manutenção do agente na população de *A. ovale*. Outro fator importante de ser mencionado é a importância de pesquisas que busquem pela presença desta nova cepa de *R.parkeri* em outros biomas do Brasil, já que *A.ovale* é também prevalente nos biomas de Cerrado e Amazônia (LABRUNA et al., 2005b; SZABÓ et al.,2007).

---

[8] SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. In print, 2012a

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

1- *R.parkeri* cepa Mata Atlântica é mantida por transmissão transestadial entre larva ninfa de *A. ovale* em um nível de 100%, sem observação de efeito deletério da bactéria para o carrapato.

2- *R. parkeri* cepa Mata Atlântica consegue perpetuar pela transmissão transestadial entre ninfa-adulto de *A.ovale* em uma taxa de 100%, não manifestando efeito patogênico sobre o ixodídeo.

3- *R. parkeri* cepa Mata Atlântica possui 100% de transmissão transovariana para ovos e larvas. Contudo, a bactéria afeta a reprodutibilidade das fêmeas infectadas, diminuindo a eficiência reprodutiva das mesmas.

4- Todas as fases parasitárias do carrapato *A. ovale* são capazes de transmitir *R. parkeri* cepa Mata Atlântica a hospedeiros susceptíveis, no entanto, larvas e ninfas foram mais competentes que adultos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E. W.; LIPMAN, D. J.. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular. Biology**,v.215, p.403-410, 1990.

BARBIERI, A, R, M. **Aspectos epidemiológicos da febre maculosa da Mata Atlântica em um foco endêmico no município de Blumenau, Santa Catarina**. 2012. 91 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

BENNET G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarini: Ixodidae). **Acarologia,** v 16, p 1652-1661, 1974.

BERMÚDEZ, S. E.; EREMEEVA, M. E.; KARPATHY, S. E.; SAMUDIO, F. E.; ZAMBRANO, M. L.; ZALDÍVAR, Y. L.; MOTTA, J. A.; DASCH, G. A. Detection and identification of Rickettsial agents in ticks from domestic mammals in Eastern Panama. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 4, p. 856–861, 2009.

BLACK, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 10034-10038, 1994.

BURGDORFER, W. Investigation of 'Transovarial Transmission' of Rickettsia rickettsii in the Wood Tick Dermacentor andersoni. **Experimental Parasitology**, v. 14, p. 152-159, 1963.

BURGDORFER, W.; BRINTON, L. P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 266, p. 61–72, 1975.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D. H. (Ed.). **Biology of rickettsial diseases**. Boca Raton: CRC Inc., 1988. p. 33-50.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribuicion de las rickettsiasis en Mexico. **Revista Instituto. Salub. y Enfoque. Trops**, v. 8, p. 3-14, 1947.

CONTI-DÍAZ, I.A.; RUBIO, I.; SOMMA MOREIRA, R.E.; PÉREZ BÓRMIDA, G. Rickettsiosis cutáneo ganglionar por Rickettsia conorii en el Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo,** v. 32, p. 313-318, 1990.

CONTI-DÍAZ, I. A.; MORALES FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B. Sero-logical evidence of Rickettsia parkeri as the eiological agent of rick- ettsiosis in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 337–339, 2009.

CUPP, E. W. Biology of ticks. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 21, n. 1, p.1-25, 1991.

DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. **American Journal Tropical Medicine**, v. 19, p. 103-108, 1939.

EVANS, D. E.; MARTINS, J. R.; GUGLIELMONE, A A. A review of the ticks (Acari, ixodida) of Brazil, their hosts and geographic distribution - 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 4, p. 453-470, 2000.

FORLANO, M.; SCOFIELD, A.; ELISEI, C.; FERNANDES, K. R.; EWING, S. A.; MASSARD, C. L. Diagnosis of Hepatozoon spp. in Amblyomma ovale and its experimental transmission in domestic dogs in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 134, p. 1-7, 2005.

FOURNIER, P. E. ; RAOULT, D. Bacteriology, Taxonomy and Phylogeny of Rickettsia. In: RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial diseases**. New York: Healthcare, 2009. p.379.

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.

GALVÃO, M. A. M.; DA SILVA, L. J.; NASCIMENTO, E. M. M.; CALIC, S. B.; DE SOUZA, R.; BACELLAR, F. Rickettsial diseases in Brazil and Portugal: occurence, distribution and diagnosis. **Revista Saúde Pública**, v. 39, n. 5, p. 1-6, 2005.

GODDARD, J. Experimental Infection of Lone Star Ticks , Amblyomma americanum (L .), with Rickettsia parkeri and Exposure of Guinea Pigs to the Agent Experimental Infection of Lone Star Ticks , Amblyomma americanum (L .), with Rickettsia parkeri and Exposure of Guin. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 686-689, 2003.

GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A.; SMITH, W.; KRISTINE, T. Artificial Infection of the Bed Bug with Rickettsia parkeri Artificial Infection of the Bed Bug With Rickettsia parkeri. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 922-926, 2012.

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.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PACHECO, R. C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B. Rickettsia species infecting Amblyomma ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 308-11, 2011

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; MANGOLD, A. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R.; VENZAL, J. M.; ARZUA, M.; KEIRANS, J. E. Amblyomma aureolatum (Pallas, 1772) and Amblyomma ovale Koch,

1844: hosts, distribution and 16S rDNA sequences. **Veterinary Parasitology**, v. 113, n. 3-4, p. 273–288, 2003.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M.B.; NAVA, S.; VENZAL, J.M.; MANGOLD, A.J.; SZABÓ, M.P.J.; MARTINS, J.R.; ACUÑA-GONZÁLEZ, D.; PEÑA, A.E. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & Applied Acarology**, v. 40, n. 2, p. 83-100, 2006.

GUGLIELMONE, A. A.; ROBBINS, R. G.; APANESKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I. G.; SHAO, R.; BARKER, S. A. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1–28, 2010.

GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Rodents of the subfamily Caviinae (Hystricognathi, Caviidae) as hosts for hard ticks (Acari: Ixodidae). **Mastozoologia Tropical**, v. 17, n. 2, p. 279-286, 2011.

HILLYER, E. V.; QUESENBERRY, K. E. **Ferrets, rabbits and rodents. clinical medicine and surgery**. Philadelphia: Saunders, 1997.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C. B.; GENNARIA, S.M.; GALVÃO, M. A. M.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, 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: serologic evidence for infection by Rickettsia rickettsii and another spotted fever group *Rickettsia*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

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

HORTA, M.; SABATINI, G. Experimental Infection of the Opossum Didelphis aurita by Rickettsia felis, Rickettsia bellii, and Rickettsia parkeri and Evaluation of the Transmission of the Infection to. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 959-967, 2010.

HOSKINS, J. D.; CUPP, E. W. Ticks of veterinary importance. PartI. The ixodidae family: identification, behavior and associated diseases. Comp. Cont. Educ. **Practice. Veterinary**., v. 10, n. 5, p. 564-580, 1988.

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

KOLONIN, G. V. **Fauna of ixodid ticks of the world (Acari, Ixodidae)**. Moscow 2009. Disponível em: <http://www.kolonin.org/1.html>. Acesso em: 27 nov. 2012.

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, J. W.; McBRIDE, J. W.; PINTER,A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. Rickettsia Species Infecting *Amblyomma cooperi* Ticks from an Area in the State of São Paulo , Brazil ,

Where Brazilian Spotted Fever Is. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004.

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

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M. A.; TERRASSINI, F. A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T. T.; CAMARGO, E. P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic and Applied Acarology,** v. 10, p. 17-32, 2005b.

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

LABRUNA, M. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A. Notes on population dynamics of Amblyomma ticks (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Journal Parasitology**, v. 95, p. 1016–1018, 2009b.

LABRUNA, M. B.; ROMERO, M.; MARTINS, T. F.; TOBLER, M.; FERREIRA, F. Ticks of the genus Amblyomma (Acari: Ixodidae) infesting tapirs (Tapirus terrestris) and peccaries (Tayassu pecari) in Peru. **Systematic and Applied Acarology**, v. 15, p.109–112, 2010.

LABRUNA, M. B.; MATTAR, S.; NAVA, S.; BERMUDEZ, S.; VENZAL, J. M.; DOLZ, G.; ABARCA, K.; ROMERO, L.; DE SOUSA, 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, F. A. B.; 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.

LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. **Parasitology**, v.129, p. 221-245, 2004.

LACKMAN, D. B.; BELL, E. J.; STOENNER, H. G.; PICKENS, E. G**.** The Rocky Mountain spotted fever group rickettsias. **Health Lab**, v. 2, p. 135-141, 1965.

MARTINS, T. F.; MOURA, M. M.; LABRUNA, M. B. Life-cycle and host preference of Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental & Applied Acarology**, v. 56, n. 2, p. 151-8, 2012.

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

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; DE MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group Rickettsia infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

MERHEJ, V.; RAOULT, D.. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biology Review**, v. 86, p. 379-405, 2011.

NAVA, S.; ELSHENAWY, Y.; EREMEEVA, M. E.; SUMNER, J. W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK C. D. Rickettsia parkeri in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v.14, p.1894-1897, 2008.

NIERI, F.A.B**. Avaliação da Infecção por *Rickettsia* spp. em *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae)** .2012.66 f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in Amblyomma nodosum ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals Tropical Medicine Parasitology,** v. 103, n. 5, p. 413-425, 2009a.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.*;* RICHTZENHAIN, L. J.; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari : Ixodidae) Infesting Birds in an Atlantic Rain Forest Region of Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 46, n. 5, p. 1225-1229, 2009b.

OGRZEWALSKA, M.; UEZU, A.; JENKINS, C. N.; LABRUNA, M. B. Effect of forest fragmentation on tick infestations of birds and tick infection rates by rickettsia in the Atlantic forest of Brazil. **EcoHealth**, v. 8, n. 3, p. 320-331, 2011.

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, n. 10, p. 1283-300, 2012.

PACHECO, R. C.; ARZUA, M.; NIERI-BASTOS, F. A.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Rickettsial Infection in Ticks (Acari : Ixodidae) Collected on Birds in Southern Brazil Rickettsial Infection in Ticks (Acari : Ixodidae) Collected on Birds in. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 3, p. 710-716, 2012.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A; ZAKI, S.R.; GOLDSMITH, S. C.; GODDARD, J.; McLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. Rickettsia parkeri: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 38, n. 6, p. 805-11, 2004.

PADDOCK, C. D. The science and fiction of emerging rickettsioses. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1166, p. 133-143, 2009.

PARKER, R. R.; KOHLS, G. M.; COX, G. W.; DAVIS, G. E. Observations on an infectious agent from Amblyomma maculatum. **Public Health Reports**, v. 54, n. 32, p. 1482-1484, 1939.

PATINO, L.; AFAFANADOR, A.; PAUL, J. H. A spotted fever in Tobia, Colombia. Preliminary report. **American Journal Tropical of Medicine**, v. 17, p. 639-653, 1937.

PENA, D. C.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; LABRUNA, M. B.; MILAGRES, B. S.; WALKER, D. H.; GALVÃO, M. A. Serologic survey for antibodies to *Rickettsia* among domestic and wild animal populations in Brazil. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 243-244, 2009. Supplement, 2.

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

PINTER, A.; LABRUNA, M.B.; FACCINI, J. L. H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Veterinary Parasitology,** v. 105, n.1, p. 79-88, 2002.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of Rickettsia rickettsii and Rickettsia bellii in cell culture from the tick Amblyomma aureolatum in Brazil. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1078, n. 1, p. 523-529, 2006. http://dx.doi.org/10.1196/ annals.1374.103

PIZA, J. T. O carrapato como transmissor do Typho exanthemático de São Paulo?. **Boletim da Sociedade e Cirúrgica de São Paulo**, v. 15, n. 12, p. 350, 1932.

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

RAOULT, D.; PAROLA, P. **Rickettsial diseases**.In: RAOULT, D.; PAROLA, P. New York: Informa Healthcare, 2009. P. 379.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology***,* v. 173, p. 1576-1589, 1991

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. **American Journal Of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 2, p. 696-699, 1953.

ROMER, Y.; SEIJO, A. C.; CRUDO, F.; NICHOLSON, W. L.; STOKES, A. V.; LASH, R. R.; PADDOCK, C. D. Rickettsia parkeri Rickettsiosis, Argentina. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 7, p. 1169-1173, 2011.

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

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

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. S.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases,** v. 11, p. 265-270, 2005.

SANGIONI, L. A.; VOGEL, F. F. S.; CADORE, G. C.; HILGER, R. B.; TONIM, R.; PACHECO, R. C.; OGRZEWALSKA, M.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in Cerro Largo , State of Rio Grande do Sul , Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 2, p. 511-514, 2011.

SARAIVA, D. G.; FOURNIER, G. F. S. R.; MARTINS, T. F.; LEAL, K. P.G.; VIEIRA, F.N.; CÂMARA, E. M. V. C.; COSTA, C. G.; ONOFRIO, V. C.; BATTESTI, D. M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; LABRUNA, M. B*.* Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 58, n. 2, p. 159-166, 2012.

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

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. P.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, n 7, p.1111-1113, 2007.

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, n. 2, p. 139-51, 2012.

SOCOLOVSCHI, C.; HUYNH, T. P.; DAVOUST, B.; GOMEZ, J.; RAOULT, D.; PAROLA, P.Transovarial and trans-stadial transmission of *Rickettsiae africae* in *Amblyomma variegatum* ticks. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 317-318, 2009.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010.

SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B.; CASTAGNOLLI, K. C.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; CASTRO, M. B.; VOGLIOTTI, A. Ticks (Acari: Ixodidae) parasitizing humans in an Atlantic rainforest reserve of Southeastern Brazil with notes on host suitability. **Experimental & Applied Acarology**, v. 39, n. 3-4, p. 339-346, 2006.

SZABÓ, M. P. J.; OLEGÁRIO, M. M. M.; SANTOS, A. L. Q. Tick fauna from two locations in the Brazilian savannah. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 1 p. 73-84, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PACHECO, R. C.; CASTRO, M. B.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Ecological aspects of free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails in an Atlantic rainforest of southeastern Brazil**. Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, p. 57–72, 2009.

SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, T. F.; NIERI-BASTOS, F. A; SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B. A surrogate life cycle of Amblyomma ovale Koch, 1844. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 262-4, 2012b.

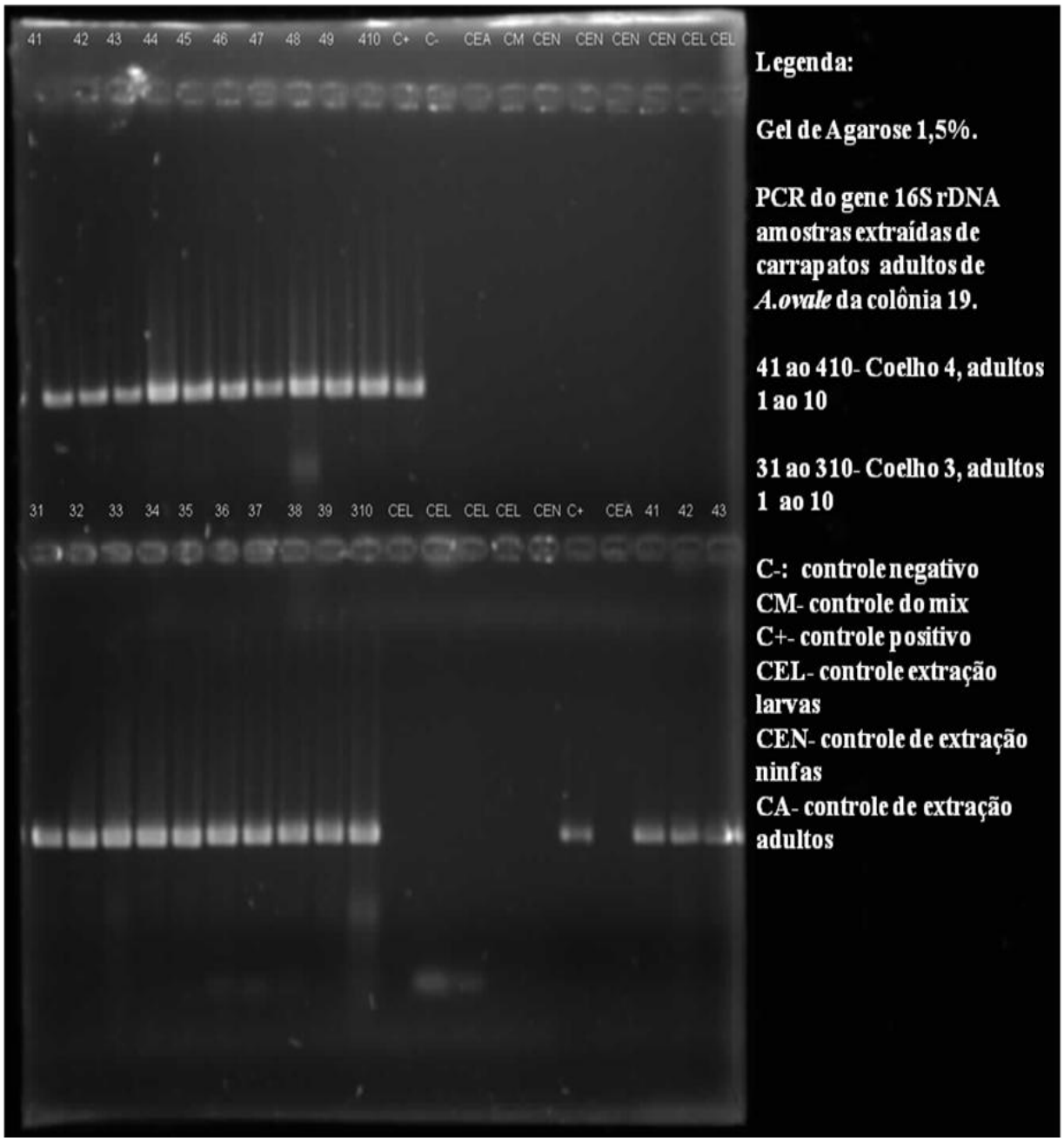
TELFORD III, S. R.; GOETHERT, H. K. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly “new”? **Parasitology**, v. 129, p. 301-327, 2004.

VENZAL, J. M.; GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABRERA, P. A.; CASTRO, O. Ticks (Ixodida: Ixodidae) parasitising humans in Uruguay. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 97, p. 769-772, 2003.

VENZAL, J. M.; PORTILLO, A.; ESTRADA PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P. A.; OTEO, J. A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 8, p. 1493-1495, 2004.

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A.; PORTILLO, A.; MANGOLD, A. J.; CASTRO, O.; SOUZA, C. G.; FÉLIX, M. L.; MARTÍNEZ, L. P.; SANTIBÁNEZ, S.; OTEO, J. A. Rickettsia parkeri: a Rickettsial pathogen transmitted by ticks in endemic areas for spotted fever rickettsiosis in southern Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 54, n. 3, p. 131-134, 2012.

WEINERT, L. A.; WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. **BMC Biology**, v. 7, n. 6, p. 1-15, 2009.

ANEXO

Anexo A- Foto de gel de agarose a 1,5%, demonstrando amplificação de produtos de PCR de um fragmento de aproximadamente 460 pb do gene mitocondrial 16S rDNA de carrapatos negativos na PCR para *Rickettsia* spp.