FERNANDA APARECIDA NIERI BASTOS

Avaliação da infecção por *Rickettsia* spp. em *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae)

São Paulo

2012

FERNANDA APARECIDA NIERI BASTOS

Avaliação da infecção por *Rickettsia* spp. em *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae)

Tese 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 Doutor 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.

BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP
14/2/12

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2552
FMVZ

Bastos, Fernanda Aparecida Nieri

Avaliação da infecção por *Rickettsia* spp. em *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae) / Fernanda Aparecida Nieri Bastos. -- 2012.
66 p.

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

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Amblyomma triste*. 2. *Rickettsia parkeri*. 3. *Ornithonyssus*. 4. Ácaros.
5. Carrapatos. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Isolamento de *Rickettsia spp.* e infecção e transmissão experimental de *Rickettsia* do grupo da febre maculosa de ácaros do gênero *Ornithonyssus* de pequenos mamíferos terrestres do Brasil”, protocolado sob o nº1579/2008, utilizando número indeterminado de camundongos, ratos, gambás e cuícas, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 11/02/09.

(We certify that the Research “Isolation of *Rickettsia spp* and experimental infection and transmission of spotted fever group *Rickettsia* by mites of the genus *Ornithonyssus* on wild mammals from Brazil”, protocol number 1579/2008, under the responsibility Prof. Dr. Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and in the meeting of day 02/11/09).

São Paulo, 12 de fevereiro de 2009

Prof. Dr. José Luis Bernardino Merusse
Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: NIERI-BASTOS, Fernanda Aparecida

Título: **Avaliação da infecção por *Rickettsia* spp. em *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae)**

Tese 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 Doutor em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

A minha amada mãe por tudo que sou hoje

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao professor Marcelo Bahia Labruna, grande mentor, pela confiança, paciência, amizade, “labrunadas”, momentos de descontração e pela orientação desse trabalho.

À Dra. Darci Barros-Battesti eterna orientadora, pela sua amizade, seu estímulo, confiança, sapiência e paciência. Você é muito importante para mim, Darci.

Ao professor Matias Szabó pela amizade, ensinamentos e o ano de convivência que me serviu como lição de vida. Quando eu crescer gostaria de ser como o Matias.

Ao Prof. Ricardo Dias pelas análises estatísticas e a agradável companhia sempre.

Ao meu amor, esposo, colega de laboratório Arlei Marcili por todos esses anos juntos e por todos que ainda vamos viver.

Ao meu filho Gustavo, que é o sentido da minha vida, a grande razão para continuar sempre em frente.

À minha tia Neusa por ter ajudado a me criar e também cuidar do meu filho todos esses anos em que me dediquei ao trabalho e estive ausente na maioria das vezes. Obrigada, tia, eu te amo muito.

À minha médica Erika e todas as coisinhas maravilhosas que ela me receita para eu não enlouquecer de ansiedade.

Aos meus grandes amigos do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan: Betão, Valeria, Leo, Janio e Gigi pelas risadas e amizade nesses anos todos.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Carrapatos: Jonas, João, Herbert, Iara, Thiago, Felipe, Chico, Andrea, Maria, Carlos, Mariana, Diego, Amália, Tati, Danilo, Ruivão, muito obrigada.

Aos queridos funcionários do Laboratório de Doenças Parasitárias: Hilda, Renato e Marcos.

Ao queridíssimo Pedrinho, que hoje já não se preocupa tanto com a minha saúde, pois parou de fumar e já não subtrai mais cigarros do meu maço.

A todos os funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), especialmente nas figuras do Danival e Alexandre (Fininho), por nossos almoços agradabilíssimos.

À Tânia por estar sempre disposta a resolver meus problemas com a pós-graduação. Muito obrigada, Tanioca.

Ao tricolor paulista, pois tenho certeza que ainda vai me dar muitas alegrias.

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Desculpe se por descuido ou esquecimento, eu deixei de mencionar alguém.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida, sem a qual seria impossível a realização deste trabalho.

Muito Obrigada

*“Muita gente pensa que está pensando quando está meramente
rearranjando os seus preconceitos”.*

(William James)

RESUMO

NIERI-BASTOS, F. A. **Avaliação da infecção por *Rickettsia* spp. em *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae).** [Evaluation of Rickettsial infection in *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) and in some species *Ornithonyssus* spp. Sambon (Acari: Macronyssidae)]. 2012. 66p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

O gênero *Rickettsia* compreende bactérias intracelulares obrigatórias e há por enquanto 22 espécies que, comprovadamente, são patogênicas ao homem. A transmissão da maioria das espécies de riquetsias está associada a carrapatos, mas também podem ser veiculadas por pulgas, piolhos e ácaros. O presente estudo teve por objetivos avaliar a infecção de *Rickettsia parkeri* em carrapatos da espécie *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) e também avaliar a infecção de *Rickettsia* spp. em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae). Foram obtidas fêmeas de *A. triste* de um cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) atropelado e as posturas testadas por PCR para o estabelecimento de uma colônia naturalmente infectada com *R. parkeri* (grupo infectado) e outra livre de infecção (grupo controle). Para avaliar a infecção de *Rickettsia* spp. em ácaros foram realizadas 15 campanhas de capturas de pequenos mamíferos terrestres nos estados de São Paulo e Paraná. Após anestesia e escovação, os ácaros foram removidos dos hospedeiros e mantidos em nitrogênio líquido para a tentativa de isolamento através da técnica de “shell vial”. Foram estudadas quatro gerações de *A. triste* infectada e não infectada com *R. parkeri*. Os resultados revelaram que *R. parkeri* é moderadamente patogênica para *A. triste* e a fase do ciclo biológico do carrapato mais suscetível ao efeito deletério da bactéria é o estágio ninfal. Foram capturados 165 mamíferos silvestres das seguintes espécies: *Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Didephis aurita*, *Euryzoryzomys russatus*, *Metachirus nudicaudatus*, *Monodelphis* sp., *Nectomys squamipes*, *Oecomys* sp., *Oligoryzomys* sp, *Oxymycterus* sp., *Sciurus aestuans* and *Thaptomys nigrita*. Destes, somente 13 estavam infestados com três espécies de *Ornithonyssus* spp. Foi obtido um isolado de *O. vitzthumi* que

parasitavam *Oxymycterus* sp., contudo não foi possível sua caracterização, pela não amplificação pelos marcadores clássicos para o gênero *Rickettsia*.

Palavras-chave: *Amblyomma triste*. *Rickettsia parkeri*. *Ornithonyssus*. Ácaros. Carrapatos.

ABSTRACT

NIERI-BASTOS, F. A. **Evaluation of Rickettsial infection in *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) and in some species *Ornithonyssus* spp. Sambon (Acari: Macronyssidae).** [Avaliação da infecção por *Rickettsia* spp. em *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae)]. 2012. 66p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

The genus *Rickettsia* comprises obligate intracellular bacteria and there are so far 22 species that are proven to be pathogenic to humans. The transmission of most species of rickettsiae is associated with ticks, but also can be transmitted by fleas, lice and mites. The present study aimed to evaluate the infection of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) and also to evaluate the infection of *Rickettsia* spp. in some species of *Ornithonyssus* spp. Sambon (Acari: Macronyssidae). *A. triste* females were obtained from a marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). Through PCR on their offspring, it was established of a colony naturally infected with *R. parkeri* (infected group) and another colony uninfected (control group). To assess the infection of the *Rickettsia* spp. in mites, 15 capture campaigns of small terrestrial mammals were performed in the states of São Paulo and Paraná. After anesthesia and brushing, the mites were removed from hosts and kept in liquid nitrogen for isolation of rickettsiae using the “shell vial” technique. Four consecutive generations of *A. triste* were studied in the laboratory. The results showed that *R. parkeri* is moderately pathogenic to *A. triste*, especially to the nymphal stage. A total of 165 wild small mammals of the following species were captured: *Akodon cursor*, *Akodon montensis*, *Didephis aurita*, *Euryzoryzomys russatus*, *Metachirus nudicaudatus*, *Monodelphis* sp., *Nectomys squamipes*, *Oecomys* sp., *Oligoryzomys* sp., *Oxymycterus* sp., *Sciurus aestuans* and *Thaptomys nigrita*. Of these, only 13 were infested with three species of *Ornithonyssus* spp. A bacterial isolate was obtained from mites removed from a *Oxymycterus* sp. However, it was not possible the molecular characterization by classical markers for the genus *Rickettsia*.

Key words: *Amblyomma triste*. *Rickettsia parkeri*. *Ornithonyssus*. Mites. Ticks.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
Capítulo 1 Avaliação da Infecção de <i>Rickettsia parkeri</i> em carrapatos da espécie <i>Amblyomma triste</i>	20
2 INTRODUÇÃO	21
2.1 <i>Rickettsia parkeri</i>	24
2.2 Justificativa	28
3 OBJETIVOS	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Obtenção da Colônia	30
4.2 Sorologia dos animais para <i>R. parkeri</i>	31
4.3 Avaliação clínica dos animais infestados	31
4.4 Verificação da infecção por <i>R. parkeri</i> no estágio de larva (sobrevivência transovariana)	31
4.5 Verificação da infecção por <i>R. parkeri</i> no estágio de ninfa (sobrevivência transtadial)	31
4.6 Verificação da infecção de <i>R. parkeri</i> no estágio adulto	32
4.7 Avaliação dos parâmetros biológicos	32
4.8 Isolamento de riquetsia	32
4.9 Manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado	33
4.10 Análise dos Dados	34
5 RESULTADOS	36
5.1 Estabelecimento das colônias	36
5.2 Sorologia	36
5.3 Verificação transovariana e transtadial	36
5.4 Parâmetros biológicos	37
5.5 Obtenção e manutenção dos isolados	40
6 DISCUSSÃO	41

Capítulo 2 Avaliação da infecção de <i>Rickettsia</i> spp. em algumas espécies de ácaros do gênero <i>Ornithonyssus</i> Sambon nos Estados de São Paulo e Paraná	45
7 INTRODUÇÃO	46
7.1 Justificativa	48
8 OBJETIVOS	50
9 MATERIAL E MÉTODOS	51
9.1 Origem do Material e Identificação	51
9.2 Isolamento de riquetsias de ácaros	51
9.3 Extração de DNA	52
9.4 Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)	52
9.5 Manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado	52
10 RESULTADOS	54
10.1 Origem do material e identificação	54
10.2 Isolamento de riquetsias de ácaros e manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado	56
10.3 Extração de DNA e Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)	57
11 DISCUSSÃO	58
REFERÊNCIAS	60

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* compreende organismos intracelulares obrigatórios pertencentes à família Rickettsiaceae e ordem Rickettsiales (RAOULT; ROUX, 1997). Com base nos padrões antigênicos, moléculares e ecológicos essas bactérias foram divididas classicamente em três grupos: 1) grupo do tifo (GT), representado pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, cujos vetores principais são insetos (piochos e pulgas, respectivamente); 2) grupo da febre maculosa (GFM), composto por mais de 23 espécies válidas, e a transmissão da maioria está associada a carrapatos, com exceção da *Rickettsia felis* e *Rickettsia akari*, transmitidas por pulgas e ácaros, respectivamente. Outras espécies de riquetsias, tais como, *Rickettsia bellii* e *Rickettsia canadensis* não estão inseridas em nenhum destes dois grupos, sendo considerado um grupo ancestral (GA) (YU; WALKER, 2003).

Em uma classificação mais recente, Weinert et al. (2009), propuseram uma nova filogenia para o gênero *Rickettsia*, baseada numa abordagem multigênica. Esses autores sugeriram cinco novos grupos: 1) grupo do tifo (GT), composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; 2) 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, elencado pela espécie *R. canadensis* e ; 5) grupo Bellii, representado pela espécie *R. bellii* e vários outros genótipos encontrados em insetos.

Há por enquanto 22 espécies de riquetsias que, comprovadamente, causam infecções no homem (*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. heilongjiangensis*, *R. slovacae*, *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).

Sem dúvida *R. rickettsii* é a mais conhecida e letal das riquetsioses, sobretudo no Brasil. Sua distribuição está restrita às Américas, com registros de casos confirmados no Canadá, Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia,

Brasil e Argentina. Diferentes espécies de carrapatos estão implicadas como vetor nas diferentes localidades geográficas. Nos EUA as espécies responsáveis pela transmissão são *Dermacentor andersoni* (Stiles) e *Dermacentor variabilis* (Say). Na América do Sul, o principal vetor é a espécie de carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius). Enquanto no México e em algumas localidades dos EUA a espécie envolvida na transmissão da bactéria causadora da doença é *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (LABRUNA et al., 2011a).

No Brasil, além de *A. cajennense*, a espécie de carrapato *Amblyomma aureolatum* (Pallas) é reconhecida como vetor de *R. rickettsii* na região metropolitana da cidade de São Paulo, onde *R. sanguineus* também é suspeito como vetor (LABRUNA, 2009).

As manifestações clínicas iniciais da riquetsiose causada por *R. rickettsii*, mais conhecida como febre maculosa, são gerais e inespecíficas como febre, mialgia, calafrios e dores de cabeça. Com a evolução da doença aparecem erupções cutâneas (máculas) e hemorragias devido ao quadro de vasculite, pois ocorre a invasão das células endoteliais pelas bactérias. A taxa de mortalidade, em casos não tratados, ultrapassa 30%. Em estudo retrospectivo, Angerami et al. (2006), avaliaram os principais sinais clínicos de pacientes atendidos no Hospital das Clínicas da UNICAMP com diagnóstico confirmado de febre maculosa brasileira. Esses autores observaram que 100% dos pacientes apresentaram febre. Sintomas gerais como: mialgia, dores de cabeça, vômito e dor abdominal foram observados em 80%, 60%, 42% e 32% dos pacientes, respectivamente. Sintomatologia mais severa estava associada com casos fatais e incluía icterícia (52%), acometimento do sistema nervoso central (43%), dificuldades respiratórias (37%) e insuficiência renal (35,3%). Ainda foram observados diferentes graus de hemorragia em 69,5% dos pacientes.

As espécies *R. africae*, *R. conorii* e *R. sibirica* são primariamente do Velho Mundo. Contudo, *R. africae* foi introduzida nas Ilhas do Caribe (Índias Ocidentais), enquanto *R. parkeri* só pode ser encontrada no Novo Mundo nas regiões central e sul dos EUA, bem como em algumas porções da América do Sul. As manifestações clínicas das quatro espécies de *Rickettsia* são semelhantes e incluem formação de lesão papular típica ("tache noir"). Entretanto, a doença produzida por *R. conorii* geralmente resulta em quadros clínicos mais severos. Com relação aos vetores, na

Europa, África e Ásia, *R. conorii* e *R. sibirica* têm sua transmissão relacionada principalmente a *Rhipicephalus* spp. e *Dermacentor* spp., respectivamente, enquanto que *R. africae* é transmitida por carrapatos do gênero *Amblyomma*. Nas Américas a transmissão de *R. parkeri* também está restrita ao gênero *Amblyomma* (GODDARD, 2009).

A segunda espécie mais letal de *Rickettsia* é o agente causador do tifo epidêmico: *R. prowazekii*. O único vetor conhecido dessa riquetsiose é o piolho do corpo, *Pediculus humanus corporis* e a bactéria é altamente letal para o hospedeiro invertebrado. O único registro dessa doença na América do Sul durante as últimas décadas foi no Peru (LABRUNA, 2009). Já o tifo transmitido por pulgas, mais especificamente da espécie *Xenopsylla cheops*, é causado por *R. typhi*; a doença é amplamente distribuída no mundo e tem sido negligenciada na América do Sul nas últimas décadas. Outra riquetsiose veiculada por insetos, especialmente pulgas, tem sido citada desde o final do século passado e o agente etiológico incriminado é a bactéria *R. felis*. O patógeno foi isolado de um gênero cosmopolita de pulgas, *Ctenocephalides* spp. e na América Latina já foi mencionada infectando pulgas na Argentina, Brasil, Chile, Costa Rica, México, Panamá, Peru e Uruguai (LABRUNA et al., 2011a).

Várias outras espécies de *Rickettsia* foram relatadas infectando carrapatos na América Latina nos últimos anos (Quadro 1) e a maioria delas pertence ao grupo da febre maculosa, com exceção de *R. bellii*.

O presente estudo foi dividido em dois capítulos que correspondem à investigação da presença de riquetsia em dois grupos de Acari:

Capítulo 1: Avaliação da infecção de *Rickettsia parkeri* em carrapatos da espécie *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae).

Capítulo 2: Avaliação da infecção de *Rickettsia* spp. em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae).

Quadro1. Outras espécies de *Rickettsia* encontradas infectando carrapatos na América Latina

Rickettsia	Espécie de Carrapato	País	Referência
<i>R. rhipicephali</i>	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i> Cooley	Brasil	Labruna et al., 2007
<i>R. bellii</i>	<i>Amblyomma dubitatum</i> Neumann, <i>A. aureolatum</i> , <i>Amblyomma incisum</i> Neumann, <i>Amblyomma ovale</i> Koch, <i>Amblyomma oblongoguttatum</i> Koch, <i>Amblyomma rotundatum</i> Koch, <i>Amblyomma humerale</i> Koch, <i>Amblyomma scalpturatum</i> Neumann, <i>Amblyomma neumanni</i> Ribaga, <i>Amblyomma nodosum</i> Neumann, <i>H. juxtakochi</i> , <i>Ixodes loricatus</i> Neumann	Argentina, Brasil	Labruna et al, 2011a
<i>R. massiliae</i>	<i>R. sanguineus</i>	Argentina	Labruna, 2009
<i>R. amblyommii</i>	<i>A. cajennense</i> , <i>Amblyomma coelebs</i> Neumann, <i>Amblyomma longirostre</i> (Koch), <i>A. neumanni</i>	Argentina, Brasil, Panamá, Guiana Francesa, Costa Rica	Labruna et al., 2011a
<i>Candidatus "R. andeanae"</i>	<i>Ixodes boliviensis</i> Neumann, <i>Amblyomma maculatum</i> Koch, <i>Amblyomma parvum</i> Aragão, <i>Amblyomma triste</i> Koch	Peru, Chile, Brasil, Argentina	Blair et al., 2004; Pacheco et al., 2006; Nieri-Bastos et al., 2011; Abarca et al., 2012
<i>R. monteiroi</i>	<i>A. incisum</i>	Brasil	Pacheco et al., 2011

**Capítulo 1 Avaliação da Infecção de *Rickettsia parkeri* em carrapatos da espécie
*Amblyomma triste***

2 INTRODUÇÃO

Os carrapatos estão inseridos na ordem Acari, subordem Ixodida e representados por três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. As famílias Argasidae e Ixodidae são amplamente distribuídas, enquanto que Nuttalliellidae está restrita à África do Sul e Tanzânia (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Em Argasidae há cerca de 200 espécies descritas para as duas subfamílias, Argasinae e Ornithodorinae (GUGLIELMONE et al., 2010). Os argasídeos, conhecidos como “carrapatos-moles”, são abundantes em tetos de habitações, grutas e cavernas, ninhos e tocas dos hospedeiros, nos quais se alimentam múltiplas vezes. Seu ciclo biológico envolve: ovos, larva, vários instares ninfais e adultos. A partenogênese pode ocorrer esporadicamente. Na maioria das espécies as ninfas e adultos alimentam-se rapidamente (cerca de 30 a 40 minutos em média), enquanto as larvas fixam-se aos hospedeiros por 3 a 10 dias (com exceções, em que as larvas não se alimentam ou ainda se alimentam em poucas horas) (BARROS-BATTESTI et al., 2012). Há repasto sanguíneo antes de cada ecdise, salvo raras exceções com dois repastos sanguíneos em ninfas antes da muda, ou ainda muda sem alimentação em algum instar (LANDULFO et al., 2011). Em geral, os carrapatos adultos alimentam-se múltiplas vezes antes das cópulas e oviposição (HOOGSTRAAL, 1985; WOOLLEY, 1988).

A família Ixodidae está representada por 14 gêneros e 702 espécies em dois grupos: Prostriata com 242 espécies, todas do gênero *Ixodes* Latreille e Metastriata com 458 espécies acomodadas em 13 gêneros, a saber: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Compluriscutula*, *Cornupalpatum*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus*, (GUGLIELMONE et al., 2010; GUGLIELMONE; NAVA, 2011). Os ixodídeos, conhecidos como “carrapatos-duros”, são parasitos de vertebrados em geral, mas alimentam-se preferencialmente em mamíferos, dos quais Rodentia é o táxon mais parasitado (WOOLLEY, 1988; OLIVER, 1989). Quando em fase não-parasitária (entre mudas), são encontrados nos mais variados ambientes. Diferentemente dos argasídeos, o ciclo biológico dos ixodídeos compreende ovo, larva, apenas um estágio ninfal e adultos, com dimorfismo sexual acentuado. Cada

estágio requer apenas uma única alimentação, com longos repastos sangüíneos que duram vários dias nos hospedeiros. As fêmeas sugam de uma única vez grande quantidade de sangue para a produção de milhares de ovos colocados numa única oviposição, morrendo em seguida. Geralmente, os machos alimentam-se intermitentemente, permanecendo no hospedeiro por semanas ou meses (OLIVER, 1989).

Devido às particularidades de seus hábitos alimentares, os carrapatos constituem o principal grupo em importância de vetores em saúde pública. Eles podem transmitir uma grande variedade de agentes patogênicos e ainda causar paralisias, dermatites e alergias (JONGEJAN; UILENBERG, 2004)

São conhecidas, até o presente momento, 59 espécies do gênero *Amblyomma* para a região Neotropical, das quais 47 são exclusivas para esta região, 11 ocorrem também na região Neártica e apenas uma não é autóctone das Américas (ONOFRIO et al., 2006; NAVA et al., 2009). A distribuição geográfica do gênero *Amblyomma* é extensa, abrangendo quase todos os continentes. As únicas exceções são a Europa e a Antártida (ONOFRIO et al., 2006). Aproximadamente 130 espécies já foram descritas para este gênero em todo o Mundo (GUGLIELMONE et al., 2010).

Segundo Dantas-Torres et al. (2009) o gênero *Amblyomma* é o mais numeroso do Brasil com 29 espécies estabelecidas. O gênero é o de maior importância médica, já que inclui as principais espécies que parasitam humanos neste país. Dentre elas, destacam-se *A. aureolatum*, *A. cajennense* e *A. ovale*, que são incriminados na transmissão da febre maculosa e outras riquetsioses para humanos (LABRUNA et al., 2004; GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006; LABRUNA, 2009; SABATINI et al., 2010; SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011).

A espécie de carrapato *A. triste* está amplamente distribuída na região Neotropical, ocorrendo desde o Sul do México até a Argentina (VENZAL et al., 2008). Existem também evidências que esta espécie possa ocorrer no Sul dos EUA (MERTINS et al., 2010). Morfologicamente é muito próxima de *A. maculatum* e *Amblyomma tigrinum* Koch (VENZAL et al., 2008).

No estágio adulto os hospedeiros primários de *A. triste* são cervídeos, mas também podem ser encontrados em carnívoros, cabras, gado e cavalos, enquanto

os estágios imaturos são encontrados em roedores e marsupiais (SZABÓ et al., 2007; NAVA et al., 2011).

Recentemente, Nava et al. (2011) avaliaram a dinâmica sazonal de *A. triste* colhidos em hospedeiros silvestres e de vida livre na localidade de Campana, Província de Buenos Aires Argentina, na divisa com o Uruguai onde situa-se o delta do Rio Paraná. Estes autores sugerem que esta espécie faz uma geração por ano e tem o pico de abundância de adultos no começo do inverno até a metade da primavera, enquanto os estágios imaturos são mais ativos no verão. O mesmo estudo revela que os estágios imaturos foram encontrados principalmente em roedores das famílias Cricetidae e Caviidae. Recentemente na Argentina foram confirmados dois casos humanos de febre maculosa causada por *R. parkeri* e acredita-se que o agente possa ter sido veiculado por *A. triste* (ROMER et al., 2011).

No Uruguai Venzal et al. (2008) encontraram resultados semelhantes estudando variação sazonal da espécie *A. triste* em mamíferos silvestres. O hospedeiro natural, *Blastocerus dichotomus* (Illiger), está extinto nesse país, porém, adultos de *A. triste* têm sido registrados com muita frequência em cães, que são hospedeiros alternativos, mas que exercem o papel de hospedeiro primário na ausência de cervídeos (VENZAL et al., 2008).

No Brasil, em condições de laboratório, Labruna et al. (2003) estudaram o ciclo biológico de *A. triste* em diferentes hospedeiros. Esses autores observaram que esta espécie leva 155 dias para completar seu ciclo em laboratório. Os hospedeiros mais eficientes para as fases imaturas foram porquinhos-da-índia, *Cavia porcellus* L., e para adultos, capivaras, *Hidrochaeris hidrochaeris* (Mingoe).

A espécie *A. triste* é muito agressiva aos animais domésticos e aos humanos no Uruguai, onde é também responsável pela transmissão de *Rickettsia parkeri* (VENZAL et al., 2008). O primeiro caso de febre maculosa causado por *R. parkeri* nesse país foi relatado por Conti-Diaz et al. (1991) e confundida com *R. conorii*, a bactéria causadora da febre do Mediterrâneo. Venzal et al. (2004) encontraram pela primeira vez *R. parkeri* em *A. triste* suspeitando que essa espécie de carrapato era o possível vetor da doença no país. Somente em 2009, por diagnóstico sorológico através de técnica de absorção cruzada, Conti-Diaz et al. (2009) constataram a presença de *R. parkeri* em humanos. Entretanto, no Brasil, *A. triste* não é comum em humanos e a razão para este comportamento é desconhecida (SZABÓ et al., 2007;

VENZAL et al., 2008). Além disso, *R. parkeri* foi isolada de *A. triste* de vida livre no Estado de São Paulo (SILVEIRA et al., 2007), mas não há relatos da doença, causada por *R. parkeri* transmitida por este carrapato no Brasil.

2.1 *Rickettsia parkeri*

A bactéria *R. parkeri* foi descrita por R. R. Parker na década de 1930 e por mais de sessenta anos foi considerada não patogênica. Somente no início deste século, Paddock et al. (2004) registraram o primeiro caso clínico em humanos, causado por *R. parkeri*, transmitido pela espécie de carrapato *A. maculatum* nos EUA, principal vetor dessa riquetsiose na América do Norte. Já foram detectados espécimes positivos em nove Estados americanos (Alabama, Arkansas, Florida, Georgia, Kentucky, Mississippi, Oklahoma, Carolina do Sul e Texas) e mais recentemente na Virginia (FORNADEI et al., 2011).

A infecção por *R. parkeri* causa uma riquetsiose com sintomatologia branda, associada a linfadenopatia regional e lesão típica de escara de inoculação (“tache noire”) nos sítios de fixação do carrapato (CONTI-DIAZ, 2001; PADDOCK et al. 2004; WHITMAN et al. 2007), características estas, descritas em raros casos de riquetsiose por *R. rickettsii*, associado a sintomatologia mais severa e alta letalidade. Neste contexto, relatos de riquetsiose com sintomatologia branda e, associadas à “tache noire” podem ser considerados potenciais casos de riquetsiose por *R. parkeri*. Na América do Sul os casos desta doença estão registrados principalmente no Uruguai (CONTI-DIAZ et al., 2009) e os dois casos que ocorreram recentemente na Argentina, no Delta do Paraná, não reportaram a identificação do vetor envolvido na transmissão (ROMER et al., 2011).

No Brasil, diferentes cepas de *R. parkeri* foram descritas: a amostra COOPERI foi isolada de carrapatos da espécie *A. dubitatum* de Pedreira, estado de São Paulo (LABRUNA et al. 2004); a amostra NOD foi isolada de carrapatos *Amblyomma nodosum* da região do Pontal do Paranapanema, estado de São Paulo (OGRZEWALSKA et al. 2009); uma cepa, até então, idêntica à cepa Maculatum foi isolada de carrapatos *A. triste* (amostra at24) de vida livre de Paulicéia, estado de

São Paulo (SILVEIRA et al., 2007); e mais recentemente, uma nova cepa de *R. parkeri* denominada de amostra Mata Atlântica foi descrita causando doença em humanos nos estados de São Paulo e Bahia (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011). Posteriormente a mesma cepa foi detectada em carrapatos *A. ovale* no estado de São Paulo por Sabatini et al. (2010) e em *A. aureolatum*, *A. ovale* e *R. sanguineus* em Santa Catarina (MEDEIROS et al., 2011).

Em estudo comparativo das notificações compulsórias no período de 2003-2006 nos estados de São Paulo e Santa Catarina foi observada a ausência de casos fatais (ANGERAMI et al., 2009). Esses autores verificaram sintomatologia sugestiva de outra riquetsiose com maior porcentagem de dores de cabeça e linfadenopatia no Sul do país do que aquelas encontradas no Estado paulista. Ainda sugeriram que os casos podem ter sido causados por *R. parkeri*, uma vez que a única forma de diagnóstico utilizada pelas autoridades de saúde competentes nesses casos foi a detecção de anticorpos reativos a antígenos de *R. rickettsii*, sem a identificação precisa da espécie do agente relacionado ao caso. Uma vez que Medeiros et al. (2011) encontraram prevalências ao redor de 10% de infecção por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) em áreas de casos humanos de febre maculosa em Santa Catarina, é muito provável que pelo menos parte desses casos confirmados sorologicamente tenham sido fruto de infecção pela cepa Mata Atlântica.

Até o presente, os únicos casos humanos comprovados de riquetsiose causado por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) no Brasil são de São Paulo (SPOLIDORIO et al., 2010) e da Bahia (SILVA et al., 2011). Ambos os casos foram clinicamente similares, embora o paciente da Bahia tenha apresentado sintomas mais severos da riquetsiose. Acredita-se que essa nova cepa de *R. parkeri* esteja amplamente distribuída por toda a Mata Atlântica e a espécie de carrapato envolvida na transmissão possivelmente seja, primariamente, *A. ovale* (SZABÓ et al., 2011), com alguma participação secundária de *A. aureolatum* (MEDEIROS et al. 2011).

Dentre as riquetsioses, as causadas por *R. parkeri*, vem ganhando uma grande importância devido ao aumento do número de casos diagnosticados e também pela alta taxa de infecção (cerca de 10%) nos carrapatos na natureza quando comparada a *R. rickettsii* cujas taxas de infecção em carrapatos das espécies *A. cajennense* e *A. aureolatum* estão, no máximo, na casa de 1%

(PADDOCK et al., 2004; PINTER; LABRUNA, 2006; PACHECO et al., 2006; SILVEIRA et al., 2007, LABRUNA, 2009).

Como a infecção humana por *R. parkeri* tem sido descrita como uma Febre Maculosa mais branda, sem letalidade, quando comparada a infecção por *R. rickettsii*, é possível que muitos casos de riquetsioses por *R. parkeri* possam estar ocorrendo no Brasil. Os casos humanos de Febre Maculosa têm sido diagnosticados por meio de detecção de anticorpos reagentes a *R. rickettsii* pela RIFI ou pelo isolamento de riquetsias de tecidos de doentes em cultura de células. Esse diagnóstico “inespecífico” ocorre porque as riquetsias do GFM apresentam alguma reação sorológica cruzada entre si (PHILIP et al., 1978) e o isolamento do agente em cultura de células também impossibilita a identificação da espécie, dada às semelhanças morfológicas entre as espécies de riquetsias (YU; WALKER, 2003).

Sem dúvida a bactéria *R. rickettsii* é a mais conhecida e letal das riquetsioses. No Brasil há claramente dois contextos ecológicos e epidemiológicos distintos para esta doença. Na região sudeste, especialmente na área metropolitana de São Paulo *A. aureolatum* é um vetor competente, mas epidemiologicamente apresenta pouca capacidade de transmissão por sua baixa antropofilia. A espécie *A. cajennense*, no entanto, possui baixa competência, mas por outro lado é altamente capaz de transmitir a bactéria, por ser abundante e antropofílica, principalmente nos estágios imaturos (LABRUNA et al., 2011; SOARES et al., 2011).

Da mesma forma, dois contextos ecológicos podem ser aplicados para *R. parkeri* na América do Sul. Um deles diz respeito à presença de *A. triste* e *A. maculatum* em áreas alagadas em diversas regiões. Outro diz respeito à presença *A. ovale* na Mata Atlântica (SABATINI et al., 2010). Cepas distintas de *R. parkeri* circulam nas duas situações mencionadas. Em *A. triste* circula a cepa At5URG no Uruguai e a cepa At24 que foi isolada no Brasil, ambas semelhantes à cepa Maculatum 20, da América do Norte. Em *A. ovale* circula a cepa “Mata Atlântica” de *R. parkeri*. Apesar de conhecida há mais tempo pouco se sabe sobre a cepa At24 de *R. parkeri*. No caso de *A. maculatum*, até o momento só se conhece a cepa norte americana “Maculatum 20”.

Em relação à transmissão de *R. parkeri*, há poucos estudos disponíveis sobre seu ciclo natural ou da interferência da infecção pela bactéria no ciclo de vida dos carrapatos, sendo que muitos aspectos da epidemiologia e história natural precisam

ser esclarecidos. Goddard (2003) demonstrou a transmissão transovariana e a sobrevivência transestadial de *R. parkeri* em *Amblyomma americanum* (L.). Esta é uma das espécies de carrapato mais abundante e agressiva no centro sul dos EUA. Esse autor estudou *A. americanum* por pelo menos duas gerações e acompanhou a infecção em cobaias.

Já em *R. rickettsii*, o mecanismo de transmissão foi bastante estudado em algumas espécies de carrapatos, sobretudo as norteamericanas, como *D. andersoni* e *D. variabilis*. Burgdorfer (1963), investigou a transmissão transovariana de *R. rickettsii* em carrapatos *D. andersoni* e observou que 100% das progênes analisadas, provenientes de fêmeas naturalmente infectadas, recebia o patógeno e o perpetuava ao próximo estágio do ciclo biológico. Apesar disso, em outro estudo, Burgdorfer e Brinton (1975), constataram alta taxa de mortalidade de fêmeas naturalmente infectadas por *R. rickettsii* a partir da quinta geração e observaram também a diminuição, pela metade, dos ovos depositados por fêmeas infectadas. Nesse mesmo estudo, de modo similar, carrapatos da espécie *A. americanum* foram alimentados em cobaios infectados experimentalmente com uma cepa de *R. rickettsii*. Após a segunda geração, a maior parte das fêmeas morreu, e aquelas que realizaram a ovipostura geraram ovos inférteis.

O efeito letal de *R. rickettsii* em carrapatos foi avaliado por Niebylski et al. (1999) na espécie *D. andersoni*. Esses autores infectaram experimentalmente carrapatos com diferentes cepas de *R. rickettsii* e observaram os parâmetros biológicos do ciclo de *D. andersoni*. Os resultados obtidos foram semelhantes aos de Burgdorfer (1963), que levaram à redução na sobrevivência das fêmeas e sua progênie com conseqüente impacto na capacidade vetorial. Além disso, Niebylski et al. (1999) observaram grande mortalidade de ninfas experimentalmente infectadas no estágio de larva com cepas altamente patogênicas de *R. rickettsii* americanas. Em infecções de carrapatos com *R. parkeri* esses efeitos não são conhecidos.

2.2 Justificativa

Desde a descrição do primeiro caso clínico no início do século XXI, houve um crescente aumento de casos diagnosticados por *R. parkeri*, tanto na diversidade de cepas detectadas e/ou isoladas como também nas diferentes espécies de vetores envolvidos na transmissão deste patógeno. O conhecimento sobre a ecologia da rickettsiose causada por *R. parkeri* ainda é incipiente. Os fatores que ocasionam ou modulam a taxa de infecção em condições naturais baseiam-se em estudos com carrapatos de vida livre. Além disso, é desconhecido o efeito patogênico que a *R. parkeri* pode exercer sobre a espécie vetora, mais especificamente *A. triste*.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a infecção por *R. parkeri* em carrapatos da espécie *A. triste*.

3.2 Objetivos Específicos

- Verificar a patogenicidade de *R. parkeri* para *A. triste* em todas as fases do ciclo biológico;
- Avaliar a sobrevivência transestadial e a transmissão transovariana de *R. parkeri* em *A. triste*;
- Observar a capacidade de transmissão de *R. parkeri* por todos os estágios parasitários de *A. triste* para animais de laboratório.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da Colônia

A obtenção de colônias naturalmente infectadas e outra não infectada (grupo controle) por *R. parkeri* para o presente estudo se deu a partir de 14 fêmeas de *A. triste* colhidas de um cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) naturalmente infestado, encontrado atropelado numa estrada do Pantanal Sul Mato-Grossense, município de Água Clara, Estado de Mato Grosso do Sul (20°24'32,3"S; 53°12'27"W). Os carrapatos foram trazidos vivos ao laboratório de Doenças Parasitárias, do VPS, da FMZV da USP, onde as fêmeas parcialmente ingurgitadas completaram o repasto sanguíneo em coelhos domésticos (*O. cuniculus*). As teleóginas obtidas foram mantidas em estufa B.O.D. à temperatura de 25°C e UR entre 90-95%, para oviposição e eclosão das larvas.

Pequenas amostras de ovos e/ou larvas (n=20) de cada fêmea ingurgitada foram submetidas à extração de DNA, e posteriormente testadas pela PCR para presença de *Rickettsia* (protocolo descrito abaixo). Desta forma, puderam ser obtidas larvas F₁ infectadas e não infectadas, oriundas de posturas de fêmeas naturalmente infectadas e não infectadas, respectivamente. Essas larvas foram usadas para formar duas colônias de laboratório, uma infectada e outra não infectada, as quais foram estudadas paralelamente, sob as mesmas condições de laboratório, conforme descrito a seguir. Assim, todas as infestações com larvas, ninfas e adultos das duas colônias foram sempre realizadas em coelhos domésticos brancos (*O. cuniculus*), raça Nova Zelândia, sem infestação prévia por carrapatos e sorologicamente negativos para antígeno de *R. parkeri* no dia zero da infestação.

A produção do antígeno e o desenvolvimento da RIFI foram realizadas no Laboratório de Doenças Parasitárias do VPS, da FMVZ da USP, utilizando lâminas confeccionadas com antígeno bruto de *R. parkeri* provenientes do isolado At-24-SP (SILVEIRA et al. 2007), conforme descrito por Horta et al. (2004). Todas as fases de vida livre das duas colônias foram mantidas na mesma incubadora BOD, à temperatura de 25°C e UR entre 90-95%.

4.2 Sorologia dos animais para *R. parkeri*

Tanto no dia zero (dia da infestação) como no vigésimo-primeiro dia após a infestação, em todas as fases parasitárias estudadas das gerações F₁ e F₂, foi realizada a punção auricular dos coelhos para obtenção de sangue para ser testado quanto a presença de anticorpos contra *R. parkeri* através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), considerando-se positivos os animais sororeagentes com títulos ≥ 64 .

4.3 Avaliação clínica dos animais infestados

Todos os coelhos tiveram a temperatura retal aferida do dia zero ao vigésimo primeiro dia após a infestação. Foi considerado estado febril para coelhos temperatura superior a 40,0°C segundo Hillyer e Quesenberry (1997).

4.4 Verificação da infecção por *R. parkeri* no estágio de larva (sobrevivência transovariana)

Após a ecdise na estufa B.O.D., foi realizada a verificação da porcentagem de indivíduos infectados dos grupos de fêmeas alimentadas em coelhos, avaliada pela PCR em 30 larvas de cada grupo (controle e infectado) de *A. triste*, testadas individualmente após extração de DNA pela técnica de fervura proposta por Horta et al. (2005).

4.5 Verificação da infecção por *R. parkeri* no estágio de ninfa (sobrevivência transestadial)

Após a ecdise em estufa B.O.D., foi realizada a verificação da porcentagem de ninfas infectadas dos grupos de larvas alimentadas em coelhos. Foi realizada extração de DNA pela técnica de isotiocianato de guanidina (SANGIONI et al., 2005) de vinte ninfas de cada grupo (controle e infectado), as quais testadas individualmente pela PCR. O protocolo da PCR utilizou um par de primers (CS-78 e CS-323) que amplifica um fragmento de 401 nucleotídeos do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de riquétsias.

4.6 Verificação da infecção de *R. parkeri* no estágio adulto

Após muda na estufa B.O.D foi realizada a verificação da porcentagem de adultos infectados dos grupos de ninfas alimentadas em coelhos, avaliada em dez espécimes de cada grupo (controle e infectado) testados individualmente como descrito acima.

4.7 Avaliação dos parâmetros biológicos

Foram avaliados parâmetros biológicos para as fases de larva, ninfas e adultos. Para as ninfas foi observada a taxa de recuperação e o sucesso de ecdise para a fase adulta, nos dois grupos estudados (controle e infectado). Nas fêmeas foi observada a taxa de recuperação e mortalidade, peso de cada fêmea recuperada, peso da massa de ovos e eficiência reprodutiva nos grupos estudados (controle e infectado).

4.8 Isolamento de riquétsia

Carrapatos adultos da colônia infectada (N=10) foram escolhidos de forma aleatória e submetidos à técnica de isolamento de riquetsias em cultura de células Vero, utilizando-se o método de “shell vial”, conforme descrito por Marrero e Raoult (1989) e adaptado por Labruna et al (2004). Para tal, cada carrapato foi triturado em meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion) estéril e inoculado em monocamadas de células Vero presentes no fundo raso de tubos do tipo “shell vial”. Esses tubos foram centrifugados a 700 g por 1 h a 22°C e posteriormente acrescidos de 1 ml de meio de cultivo MEM (Gibco), sendo incubados em estufa a 28°C. A cada três dias, uma pequena parte do meio contendo células em suspensão foi vistoriada para a presença de estruturas compatíveis com *Rickettsia* spp., através da coloração de Gimenez (GIMENEZ, 1964). Se detectadas estruturas compatíveis com riquetsias, as células do tubo eram raspadas com a ponta de uma pipeta e inoculadas em uma garrafa de 25cm² contendo uma monocamada de células Vero, para tentativa de estabelecer o isolado em laboratório. Se negativos, os tubos continuavam incubados na mesma temperatura, e examinados a cada três dias, até que a monocamada fosse naturalmente destruída. Uma vez estabelecido o isolado em células Vero, este era submetido ao PCR, para confirmação da espécie de riquetsia, conforme descrito por Labruna et al. (2004).

Paralelamente, uma alíquota do triturado de carrapato utilizado para inocular a cultura de células, foi submetida à extração de DNA e PCR com os primers CS-78 e CS-323 (Quadro 2), conforme Labruna et al. (2004).

4.9 Manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado

O isolado de riquetsia foi submetido a passagens seriadas em monocamadas de células Vero em garrafa de 75cm³. Monocamadas que demonstraram nível de infecção próximo de 100% das células (determinado visualmente através de coloração de Gimenez) foram raspadas, e a suspensão de células foi centrifugada. O sedimento de células foi ressuspensionado em tampão sucrose-fosfato-glutamato (SPG), pH 7.0, estéril, sendo então congelado a -80°C (LABRUNA et al., 2004), formando-se amostras de referência para o isolado obtido. Parte deste material foi

submetida à extração de DNA pelo “Tissue Kit®” (Quiagen®) para ser usado na PCR com a finalidade de amplificar fragmentos dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* de riquetsias, essencial para uso em classificação taxonômica de riquetsias (FOURNIER et al., 2003). Os fragmentos amplificados pela PCR foram seqüenciados em seqüenciador automático, e as seqüências obtidas analisadas, juntamente com as correspondentes de outras espécies de riquetsias disponíveis no GenBank.

4.10 Análise dos Dados

Os resultados dos parâmetros biológicos das fêmeas, tais como taxa de eclosão, período parasitário, período de incubação e eficiência reprodutiva nos grupos controle e infectado nas quatro gerações estudadas foram analisados estatisticamente pelo programa SPSS versão 9.0. Foi realizado o Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov e posteriormente aplicado o teste *t* de Student para duas amostras independentes, para comparação dos parâmetros biológicos entre os grupos controle e infectado nas quatro gerações estudadas. Para a comparação no mesmo grupo (controle e infectado) nas quatro gerações (F1-F4) foi utilizado Anova Paramétrica de Uma Via. Para avaliar a mortalidade de ninfas foi realizado o teste de qui-quadrado (χ^2). O nível de significância (*p*) para todas as análises foi de 5%.

Quadro 2. Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados na amplificação de genes de *R. parkeri*

Gene	Primer	Sequência do Primer	Referência
<i>gltA</i>	CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	Labruna et al., 2004
	CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	
<i>gltA</i>	CS-239	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	Labruna et al., 2004
	CS-1069	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	
<i>ompA</i>	190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	Regnery et al., 1991
	190.701	GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	
<i>ompB</i>	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	Roux e Raoult, 2003
	120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA	

5 RESULTADOS

5.1 Estabelecimento das colônias

Foram estudadas quatro gerações de *A. triste* completas (F₁ a F₄). Antes do início da alimentação dos carrapatos, todos os coelhos foram negativos (dia zero) para reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com antígeno de *R. parkeri*. Os coelhos negativos foram infestados com larvas naturalmente infectadas com *R. parkeri* e com larvas não infectadas, comprovadas por PCR, provenientes de posturas de fêmeas trazidas do campo, iniciando-se assim o estabelecimento das colônias.

5.2 Sorologia

Em todas as infestações, os coelhos foram soronegativos para *R. parkeri* no dia zero. No vigésimo primeiro dia após a infestação com carrapatos infectados, os coelhos foram sororeagentes na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com títulos que variavam entre 256 a 1024. Os coelhos infestados com carrapatos do grupo controle se mativeram sorologicamente negativos no dia 21 pós-infestação (Tabela 1).

Dos coelhos infestados com carrapatos do grupo infectado e do grupo controle, nas quatro gerações estudadas, nenhum apresentou febre.

5.3 Verificação transovariana e transestadial

Nas quatro gerações estudadas do grupo de *A. triste* infectado houve 100% de transmissão transovariana e 100% de sobrevivência transestadial de *R. parkeri*

testados através da técnica da PCR para o fragmento do gene *gltA*. Todos os carrapatos da colônia controle testados sempre foram negativos em todas as gerações avaliadas (Tabela 1).

Tabela 1 Dados dos hospedeiros infestados com a colônia de *A. triste* naturalmente infectada com *R. parkeri* e resultados da PCR de quatro gerações consecutivas (F₁-F₄)

Estágio de A. triste/ Geração	Hospedeiro	Nº carrapatos/hospedeiro	Imunofluorescência Indireta (RIFI) aos 21 dias pós- infestação	PCR de carrapatos não alimentados
Larva F ₁	coelhos	3000-4000	Positivo (1024)	30/30 (100%)
Ninfa F ₁	coelhos	500-600	Positivo(256)	20/20 (100%)
Adulto F ₁	coelhos	15-20 casais	Positivo(512)	10/10 (100%)
Larva F ₂	coelhos	3000-4000	Positivo(256)	30/30 (100%)
Ninfa F ₂	coelhos	500-600	Positivo(256)	20/20 (100%)
Adulto F ₂	coelhos	15-20 casais	Positivo(256)	10/10 (100%)
Larva F ₃	coelhos	3000-4000	Positivo(512)	30/30 (100%)
Ninfa F ₃	coelhos	500-600	Positivo(512)	20/20 (100%)
Adulto F ₃	coelhos	15-20 casais	Positivo(1024)	10/10 (100%)
Larva F ₄	coelhos	3000-4000	Positivo(256)	30/30 (100%)
Ninfa F ₄	coelhos	500-600	Positivo(1024)	20/20 (100%)
Adulto F ₄	coelhos	15-20 casais	Positivo(256)	10/10 (100%)

5.4 Parâmetros biológicos

Os valores para o teste de normalidade de kolmogorov-smirnov podem ser observados na Tabela 2.

Os períodos parasitários e parâmetros reprodutivos de fêmeas ingurgitadas dos grupos controle e infectado podem ser observados nas Tabelas 3, 4 e 5. De modo geral, não houve diferenças significativas nos parâmetros reprodutivos das

fêmeas infectadas e não infectadas ao longo das quatro gerações, exceto para o período parasitário de fêmeas F_3 e do total de fêmeas das quatro gerações; neste caso, fêmeas infectadas apresentaram períodos parasitários significativamente ($P<0,05$) mais curtos que fêmeas não infectadas (Tabela 3). Também houve diferenças significantes entre as porcentagens de eclosão das posturas de fêmeas infectadas e não infectadas das gerações F_1 , F_2 e F_3 , sempre em favor da colônia controle. Quando as quatro gerações foram agrupadas, a diferença dos valores de porcentagens de eclosão esteve no limite da significância estatística ($P=0,05$), indicando uma maior sobrevivência de ovos não infectados do que infectados por *R. parkeri*.

Tabela 2 Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov dos Parâmetros Estudados de *A. triste* infectados com *R. parkeri* (grupo infectado) e não infectado (grupo controle) de quatro gerações consecutivas (F_1 - F_4)*

Geração	Grupo	%Eclosão	Eficiência Reprodutiva	Período Parasitário	Período de Incubação dos ovos
F_1	Controle	0,993	0,101	0,565	0,249
F_1	Infectado	0,364	0,366	0,766	0,504
F_2	Controle	0,925	0,982	0,810	0,713
F_2	Infectado	0,456	0,154	0,576	0,012
F_3	Controle	0,925	0,957	0,810	0,739
F_3	Infectado	0,950	0,422	0,019	0,606
F_4	Controle	0,902	0,622	1,000	0,964
F_4	Infectado	0,580	0,527	0,818	0,818

*Valores $<0,05$ indicam que as variáveis não apresentaram distribuição normal.

Tabela 3 Parâmetros biológicos de fêmeas de *A. triste* infectadas com *R. parkeri* (grupo infectado) e não infectadas (grupo controle) de quatro gerações consecutivas F_1 - F_4 *

Geração	Nº fêmeas		Peso médio das Fêmeas (mg)		Peso médio do Ovos (mg)		Média do Período Parasitário (dias)		Média do Período de Incubação dos ovos (dias)	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
F_1	9	19	0,4791	0,4274	0,2314	0,2092	12,33	13,79	28,56	28,28
F_2	7	18	0,3283	0,3233	0,1686	0,1646	12,43	11,81	30,57	30,72
F_3	7	10	0,3031	0,4129	0,1580	0,2265	12,43	10,20*	27,14	27,90
F_4	5	10	0,3530	0,4070	0,1630	0,2187	12,20	11,40	33,00	34,60
TOTAL	28	60	0,3750	0,3851	0,1851	0,1997	12,36	12,10*	29,37	30,13

*valores estatisticamente diferentes ($P<0,05$) entre grupos infectado (I) e controle (C) para este parâmetro.

Tabela 4 Eficiência reprodutiva (%) das fêmeas de *A. triste* infectadas com *R. parkeri* (grupo infectado) e não infectado (grupo controle) de quatro gerações consecutivas F₁-F₄

	F ₁		F ₂		F ₃		F ₄		Total	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
Média	45,04	44,90	48,53	44,21	50,04	54,17	44,29	51,55	47,02	47,50
Desvio	15,93	11,48	8,99	11,75	10,10	4,42	13,13	8,60	12,12	10,75
Padrão										
Nº	9	18	7	18	7	10	5	10	28	60
Carrapatos										

C = controle; I = infectadas.

Foi também estatisticamente significativo o sucesso de muda de ninfa para adultos entre os grupos infectado e controle, nas quatro gerações estudadas (Tabela 6). Foi observada maior mortalidade de ninfas ingurgitadas no grupo infectado quando comparado ao grupo controle. O teste de Qui-quadrado (χ^2) revelou que há diferença significativa no sucesso de muda e na mortalidade de ninfas entre os grupos e os valores para as quatro gerações foram: $\chi^2=144,41$; $\chi^2=358,34$; $\chi^2=174,70$; $\chi^2=37,77$, respectivamente.

Tabela 5. Porcentagem de eclosão dos ovos de *A. triste* infectados com *R. parkeri* (grupo infectado) e não infectado (grupo controle) de quatro gerações consecutivas F₁-F₄

	F ₁		F ₂		F ₃		F ₄		Total	
	C	I	C	I	C	I	C	I	C	I
Média	72,2	51,1*	73,6	48,7*	73,6	71,5	40,0	71,0*	68,15	57,57
Desvio Padrão	10,0	29,8	10,3	27,4	10,3	11,8	38,1	27,8	19,76	27,60
Nº Fêmeas	9	18	7	18	7	10	4	10	28	60

*valores estatisticamente diferentes ($P<0,05$) entre grupos infectado (I) e controle (C)Tabela 6. Muda e sucesso de ovipostura de fêmeas de *A. triste* infectadas com *R. parkeri* (grupo infectado) e não infectadas (grupo controle) de quatro gerações consecutivas F₁-F₄.

Geração	No. Ninfas que mudaram para adultos / No. Ninfas ingurgitadas (% sucesso de muda)		No. Fêmeas que fizeram ovipostura / No. fêmeas ingurgitadas (% sucesso de oviposição)	
	Infectado	Controle	Infectado	Controle
F ₁	274/558 (49,10)	537/656 (81,86)*	18/19 (94,73)	9/9 (100)
F ₂	1154/1580 (73,03)	1089/1093 (99,63)*	18/21 (85,71)	7/7 (100)
F ₃	100/240 (41,66)	299/321 (93,14)*	10/10 (100)	7/7 (100)
F ₄	404/552 (73,18)	411/457 (89,93)	10/10 (100)	5/5 (100)
Total	1932/2930 (65,94)	2336/2527 (92,44)*	46/60 (76,66)	28/28 (100)

*valores estatisticamente diferentes ($P<0,05$) entre grupos infectado e controle.

Embora o sucesso de alimentação e muda das larvas eclodidas de ambos os grupos das gerações 1 a 4 não tenha sido avaliados, sempre houve boa recuperação de larvas ingurgitadas. Porém na 5ª geração, as larvas das duas colônias que foram alimentadas, puderam ser acompanhadas para avaliação do sucesso de ecdise para o estágio ninfal. No grupo controle o sucesso de muda foi de 77,27% (153/198), enquanto que no grupo infectado com *R. parkeri* 71,72% (345/481) das larvas mudaram para o estágio subsequente. Essas proporções não foram estatisticamente diferentes (Qui-quadrado=1,93; G.L.=1; $P=0,165$).

5.5 Obtenção e manutenção dos isolados

Foram obtidos dois isolados de *R. parkeri* provenientes de carrapatos adultos da colônia naturalmente infectada. Esses isolados foram caracterizados na terceira passagem em células Vero e estão depositados na Coleção de Rickettsias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. Os genes *gltA*, *ompA* e *ompB* revelaram 100% de identidade ao isolado de *R. parkeri* de *A. triste* de Paulicéia, São Paulo (At24). Esse isolado foi designado "*R. parkeri* Água Clara".

6 DISCUSSÃO

As colônias de *A. triste* (infectada e não infectada) foram facilmente estabelecidas em condições de laboratório utilizando coelhos como hospedeiros. Este fato já era esperado e havia sido constatado por Labruna et al. (2003) quando estudaram o ciclo biológico desta espécie em condições experimentais.

No presente estudo, os hospedeiros utilizados para alimentação de *A. triste* do grupo infectado com *R. parkeri*, não adoeceram e nem apresentaram sintomas clínicos sugestivos de riquetsiose. Parker (1939), na ocasião da descrição de *R. parkeri*, fez o isolamento do agente em passagens sucessivas do patógeno em cobaios (porquinhos-da-índia) e observou um ligeiro aumento da temperatura e sutil edema escrotal. Goddard (2003) também utilizou porquinhos-da-índia para alimentar carrapatos da espécie *A. americanum*, experimentalmente infectados, com *R. parkeri* em hospedeiros inoculados com cultura em células Vero dessa bactéria. O autor verificou manifestações clínicas brandas (febre baixa) e reação escrotal. Essa resposta, possivelmente induzida pela grande quantidade de agente inoculado, demonstra maior suscetibilidade desse hospedeiro à *R. parkeri*.

Em infecção experimental de *Didelphis aurita* Lund por três espécies de *Rickettsia* (*R. felis*, *R. bellii* e *R. parkeri*), para avaliar a transmissão da infecção para duas espécies de carrapatos, *A. cajennense* e *A. dubitatum*, Horta et al. (2010) paralelamente também inocularam porquinhos-da-índia com *R. parkeri*. Enquanto nenhum gambá adoeceu, apenas um porquinho-da-índia apresentou febre, sem nenhum outro tipo de manifestação clínica. Os autores atribuíram a febre a fatores desconhecidos, uma vez que o título apresentado por esse único cobaio foi de 64, enquanto os outros porquinhos-da-índia inoculados soroconverteram com títulos iguais ou superiores a 2048.

Por outro lado, outras espécies de riquetsia causam sintomas evidentes e podem ser letais. Em estudos conduzidos com *A. aureolatum* e *A. cajennense*, utilizando cobaios e coelhos inoculados com *R. rickettsii*, além da soroconversão, os animais apresentaram manifestações clínicas severas que muitas vezes resultaram em óbito (LABRUNA et al., 2011b; SOARES et al., 2011).

Todas as fases do ciclo biológico testadas por PCR do grupo infectado continham DNA riquetsial. Adicionalmente, as infestações em coelhos com larvas, ninfas e adultos do grupo infectado, confirmaram a infecção por soroconversão através da reação de imunofluorescência (RIFI), suportando os dados revelados pela análise molecular dos espécimes avaliados em cada geração. Também demonstraram que larvas, ninfas e adultos de *A. triste* foram vetores competentes de *R. parkeri*.

Os dados sugerem fortemente que *A. triste* é um bom vetor para *R. parkeri* nas áreas de ocorrência dessa espécie de carrapato. Contudo, no Brasil, *A. triste* é pouco agressiva a humanos, diferentemente do que acontece em outras regiões como Uruguai e Argentina. Venzal et al. (2008) verificaram a presença de hospedeiros alternativos como o cão doméstico para *A. triste* no Uruguai, onde o hospedeiro primário (*B. dicotomus*) está extinto. Esses autores ainda demonstraram que a proximidade entre humanos e cães aumenta a chance de parasitismo, com a consequente transmissão de patógenos, especialmente porque *A. triste* é extremamente agressiva neste país. Na Argentina, Nava et al. (2008) encontraram *A. triste* infectados com *R. parkeri*, onde essa espécie de carrapato é também relatada picando humanos. Ainda na Argentina, Romer et al. (2011) identificaram casos clínicos humano causados por *R. parkeri*, sem a identificação do vetor, mas as evidências apontam para *A. triste*.

Os pesos médios das fêmeas das quatro gerações, após o ingurgitamento foram similares, sendo pouco maiores na geração F1 para as ambas as colônias (infectadas e não infectadas). Comparando aos dados previamente obtidos por Labruna et al. (2003), que estudaram a biologia de *A. triste* em condições laboratoriais, o grupo controle do presente estudo teve média de peso superior. Curiosamente as fêmeas de *A. triste* da colônia infectada foram mais pesadas que as do controle, apesar dos pesos médios não apresentarem diferença estatística significativa, demonstrando que *R. parkeri* não interferiu no ingurgitamento dessas fêmeas. Porém houve interferência deletéria da infecção na postura dos ovos e na porcentagem de eclosão das larvas. Soares et al. (2011) observaram que a colônia de *A. cajennense* experimentalmente infectada com *R. rickettsii* tiveram um desempenho reprodutivo menor, tanto para o peso das fêmeas ingurgitadas quanto para o peso das massas de ovos. Igualmente, a espécie *A. aureolatum* infectada

experimentalmente por *R. rickettsii*, teve comprometimento reprodutivo quando comparada à colônia não infectada (LABRUNA et al., 2011b).

Houve manutenção transestadial e transovariana de *R. parkeri* na população naturalmente infectada de *A. triste* estudada durante as quatro gerações consecutivas, sem nenhuma perda da infectividade durante o período avaliado. Burgdorfer e Brington (1975) demonstraram que a eficiência da infecção transovariana depende primariamente do desenvolvimento do tecido ovariano. Esses autores verificaram que quando a fêmea de *D. andersoni* se infecta nessa fase com *R. rickettsii*, ela não consegue infectar os ovários e consequentemente não infecta a prole ou se a infecção ocorre, a frequência é muito baixa. Os mesmos autores demonstraram que passagens transovarianas sucessivas são responsáveis pela mortalidade entre as fêmeas ingurgitadas e também levam a falha no desenvolvimento dos ovos, com conseqüente diminuição na população de carrapatos infectados na natureza. Os autores afirmam ainda que isso possa ser um dos fatores para a frequência de infecção por *R. rickettsii* em carrapatos ser menor que 1% em condições naturais nas áreas estudadas.

Da mesma forma, Labruna et al. (2011b) encontraram resultados semelhantes no desempenho reprodutivo de fêmeas de *A. aureolatum* experimentalmente infectadas com *R. rickettsii* durante quatro gerações consecutivas, explicando assim, a baixa prevalência (<1%) de carrapatos naturalmente infectados nas áreas endêmicas para Febre Maculosa Brasileira na região metropolitana de São Paulo. Por outro lado, esses autores não observaram frequências de mortalidade estatisticamente significativas nas fases imaturas do ciclo de vida do carrapato quando os grupos, controle e infectado, foram comparados. Os autores ainda ressaltam que todas as fases do ciclo foram 100% eficientes em manter-se infectadas e capazes de fazer transmissão transovariana e transestadial.

Em relação ao sucesso de muda de ninfa para adultos de *A. triste*, houve grande mortalidade antes do início da ecdise, demonstrando a interferência negativa da infecção por *R. parkeri* nessa fase do ciclo biológico quando ambos os grupos, controle e infectado, foram comparados. Na literatura as taxas de prevalência de *R. parkeri* na natureza, quando comparadas com outras Rickettsias, é alta, variando entre 3% a 40% nas áreas estudadas (PADDOCK et al., 2004; PACHECO et al., 2006; SILVEIRA et al., 2007; NAVA et al., 2008; PADDOCK et al., 2010; FORNADEI

et al., 2011). Dessa forma, o efeito deletério de *R. parkeri* sobre *A. triste* é moderado. Diferentemente, do que Labruna et al. (2011b) constataram em seu estudo com *A. aureolatum* infectado com *R. rickettsii*, que quando há uma grande mortalidade de fêmeas ingurgitadas infectadas, o impacto na manutenção da população naturalmente infectada é maior, uma vez que, uma única fêmea ingurgitada dá origem a milhões de ovos para a próxima geração.

Os casos clínicos registrados no Brasil para riquetsioses causadas por *R. parkeri* se referem a uma cepa distinta daquela encontrada em *A. triste* (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011). A cepa isolada no presente estudo é idêntica à cepa “At24” que foi previamente isolada por Silveira et al. (2007) e também é similar à cepa americana de *A. maculatum* “strain maculatum 20”. Na América do Sul, onde a espécie *A. triste* é encontrada parasitando humanos já foram registrados casos clínicos causados por cepa similar à encontrada no Brasil (ROMER et al., 2011).

Finalmente, o presente estudo sugere que a bactéria *R. parkeri* é moderadamente patogênica para a espécie de carrapato *Amblyomma triste* e evidências estatísticas mostram que a fase do ciclo mais suscetível ao efeito deletério da riquetsia é o estágio de ninfa ingurgitada.

Capítulo 2 Avaliação da infecção de *Rickettsia* spp. em algumas espécies de ácaros do gênero *Ornithonyssus* Sambon nos Estados de São Paulo e Paraná

7 INTRODUÇÃO

Os principais grupos de ectoparasitos que infestam mamíferos pertencem, essencialmente, às classes Insecta e Arachnida, sendo a primeira representada principalmente pelas ordens Siphonaptera, Phthiraptera, Diptera e Coleoptera; e a segunda classe pela ordem Acari, representada principalmente pelas subordens Astigmata, Gamasida e Ixodida. Esses artrópodes estabelecem com as espécies hospedeiras relações que vão desde o parasitismo ao mutualismo, sendo denominados, ectoparasitos (MARTINS-HATANO et al., 2004).

Alguns ectoparasitos utilizam o hospedeiro apenas para a dispersão (RADOVSKY, 1985). Embora esses grupos sejam considerados ectoparasitos por serem encontrados ainda que temporariamente no corpo dos animais, os parasitos verdadeiros seriam aqueles que exibem algum grau de dependência metabólica com os hospedeiros lhes causando gastos energéticos e danos físicos, como é o caso dos hematófagos.

Os representantes da família Macronyssidae são obrigatoriamente hematófagos nos estágios de protoninfa e adultos, porém larvas e deutoninfas não se alimentam. Os ovos são depositados pelas fêmeas nos ninhos dos hospedeiros, em camas ou frestas. Em geral, a postura leva uma semana e em média 100 ovos são colocados por dia. Durante esse período a fêmea alimenta-se duas vezes. As larvas eclodem em aproximadamente dois dias, realizando ecdise sem repasto sanguíneo dentro de quatro a seis horas. A protoninfa realiza ecdise dentro de 5 a 14 dias após alimentação. O ciclo biológico desses ácaros é altamente dependente das condições ambientais como temperatura e umidade. Todo o ciclo pode ser completado, em média, em dez dias (OVAZZA, 1950).

O gênero *Ornithonyssus* Sambon, 1928 (Acari: Macronyssidae) é representado por aproximadamente 34 espécies conhecidas no mundo (RADOVSKY, 2010). Fonseca (1948) listou 11 espécies de Macronyssidae para o Brasil em diferentes gêneros, a seguir (em ordem cronológica): *Ornithonyssus sylviarum* (Canestrini & Fanzago, 1877) (= *Leioognathus*); *Ornithonyssus bursa* Berlese, 1888 (= *Bdellonyssus*); *Ornithonyssus wernecki* (Fonseca, 1935) (= *Neoichoronyssus*); *Ornithonyssus eruditus* (Fonseca, 1935) (= *Bdellonyssus*);

Ornithonyssus iheringi (Fonseca, 1935) (= *Bdellonyssus*); *Ornithonyssus pereirai* (Fonseca, 1935) (= *Lepronyssoides*); *Ornithonyssus haematophagous* (Fonseca, 1936) (= *Bdellonyssus*); *Ornithonyssus brasiliensis* (Fonseca, 1939) (= *Bdellonyssus*); *Ornithonyssus lutzi* (Fonseca, 1941) (= *Bdellonyssus*); *Ornithonyssus monteiroi* (Fonseca, 1941) (= *Bdellonyssus*); and *Ornithonyssus vitzthumi* (Fonseca, 1941) (= *Bdellonyssus*). A décima segunda espécie, *Ornithonyssus matogrosso* (Fonseca, 1954) (= *Neoichoronyssus*), foi a última espécie descrita para o Brasil.

É característica do gênero um espinho na face ventral do trocanter do palpo e a placa esternal com três pares de cerdas (exceto em *O. sylviarum*) e parasitam exclusivamente aves e mamíferos (STRANDDTAMANN; WHARTON, 1958).

Das sete espécies descritas parasitando pequenos mamíferos terrestres no Brasil, seis são válidas: *O. brasiliensis*, *O. matogrosso*, *O. monteiroi*, *O. pereirai*, *O. vitzthumi* e *O. wernecki* (NIERI-BASTOS et al., 2011).

De forma geral, os ácaros têm sido ignorados como vetores de patógenos causadores de doenças a humanos e animais, com exceção de *Liponyssoides sanguineus* Hirst, 1914 (Acari: Liponyssidae) e ácaros trombiculídeos, que são vetores primários de *R. akari* e *Orientia tsutsugamushi* ("scrub typhus), respectivamente, (Reeves et al., 2006).

Ácaros macronissídeos já foram apontados como vetores de riquetsias no início do século passado (Dove e Shelmire, 1931). Esses autores induziram tifo endêmico experimentalmente em cobaias, inoculando uma solução de macerado de ácaros da espécie *O. bacoti*. Ainda conseguiram infectar ácaros alimentados em cobaias doentes, com subsequente alimentação em cobaia não-infectada. Neste mesmo experimento, Dove e Shelmire (1931), observaram que pode ocorrer a transmissão transovariana da *Rickettsia* causadora de tifo endêmico em *O. bacoti*.

Na China, foi isolada, por Liu (1947), uma riquetsia causadora de tifo endêmico em *O. bacoti*. O autor conseguiu isolar o agente, após sucessivas inoculações em animais de laboratório, de macerado de ácaros coletados em roedores.

Philip e Hughes (1948) testaram a potencialidade de *O. bacoti* se infectar e transmitir *R. akari* em cobaios de laboratório. Além da capacidade de adquirir e transmitir o agente, foi demonstrada transmissão transestadial e transovariana.

Contudo, as observações indicaram que *O. bacoti* não foi um vetor eficiente, quando analisaram a alta porcentagem de cobaios infestados sem adquirir a infecção.

No Egito, Reeves et al. (2007) detectaram a presença de dois genótipos de *Rickettsia* (similar a *R. akari*), em “pool” de ácaros da espécie *O. bacoti*, através de métodos moleculares. Esses autores encontraram frequências relativamente altas de espécimes infectados, destacando a importância desses ácaros na epidemiologia das riquetsioses.

Em estudo recente, Nieri-Bastos (2008) avaliou a presença de *Rickettsia* spp., em “pools” de ácaros, colhidos sobre pequenos mamíferos (roedores e marsupiais), de espécies brasileiras do gênero *Ornithonyssus*, através de métodos moleculares, relatando frequências de infecção surpreendentemente altas (superiores a 50%). A maior parte das seqüências obtidas foram similares a *R. rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa Brasileira.

7.1 Justificativa

Trabalhos conduzidos nas décadas de 30 e 40 do século passado já apontavam a participação de *O. bacoti* no ciclo epidemiológico de riquetsioses do grupo da febre maculosa (GFM) e do grupo do tifo (GT) (Shelmire e Dove, 1931; Dove e Shelmire, 1931; Fonseca, 1932; Philip e Hughes, 1948). Porém, o conhecimento ainda é incipiente, pois, praticamente todos os estudos são dirigidos aos carrapatos, considerados os principais vetores. Atualmente, trabalhos sugerem a associação de riquetsias com hospedeiros invertebrados não hematófagos, podendo estes ser possíveis reservatórios na natureza (Merhej e Raout, 2011). Contudo, ácaros hematófagos, exceto trombiculídeos, vêm sendo amplamente ignorados como vetores de patógenos em animais ou humanos (Reeves et al., 2006). Por outro lado, as altas taxas de infecção encontradas nas espécies de *Ornithonyssus* (Quadros 1 e 2) estudadas por Nieri-Bastos (2008), abrem um novo leque de hipóteses na epidemiologia da transmissão e na manutenção do ciclo das riquetsias.

Portanto, existe a necessidade de estudos mais abrangentes, como a tentativa de isolamento das bactérias do gênero *Rickettsia*, encontradas nas espécies de *Ornithonyssus* brasileiras, bem como, estudos de biologia, infecção e transmissão experimental, para esclarecer o papel desempenhado por esses ácaros no ciclo enzoótico das riquetsioses.

8 OBJETIVOS

- Isolamento de *Rickettsia* spp. de ácaros do gênero *Ornithonyssus* spp. colhidos de pequenos mamíferos silvestres nos Estados de São Paulo e Paraná.

9 MATERIAL E MÉTODOS

9.1 Origem do Material e Identificação

Foram realizadas campanhas de capturas de pequenos mamíferos terrestres nos estados de São Paulo e Paraná. **Paraná: Vale do Ribeira (Alto Ribeira)** - A área de estudo está inserida em uma propriedade rural (24°42'47"S e 49°08'34"O), na localidade de João Surá, Município de Adrianópolis, região sudeste do Paraná. **São Paulo: Parque Estadual da Serra da Cantareira (SP)** - A área de estudo se concentrou no Núcleo Pedra Grande (23°32'52"S e 46°38'09"O). **Fazenda Butantan (Araçariguama/SP)** – a área está localizada na Fazenda São Joaquim de propriedade do Instituto Butantan (23°31'46"S e 47°08'06"O) e na **Reserva Ecológica de Juréia-Itatins**, no município de Peruíbe (24°25'23,6"S e 47°03'06,6"O). Para a captura dos pequenos mamíferos foram utilizadas 70 armadilhas do tipo "live trap" (modelos Sherman e Tomahawk) por cinco noites consecutivas, iscadas com embutido defumado e frutas da época, em cada uma das áreas amostradas.

Após anestesia e escovação, os ectoparasitos obtidos dos hospedeiros, foram separados no campo e criopreservados em nitrogênio líquido, para serem posteriormente testados pela técnica de "shell vial", conforme descrito abaixo.

Os pequenos mamíferos foram identificados através de morfometria e cariotipagem e os ácaros, quando possível, pela chave proposta por Nieri-Bastos et al. (2011).

9.2 Isolamento de riquétsias de ácaros

Os espécimes colhidos dos hospedeiros e criopreservados foram processados para o isolamento de riquétsias em cultivo celular, pela técnica de "shell vial" conforme descrito por Marrero e Raoult (1989) e adaptada por Labruna et al (2004).

Para tal, uma amostra de cerca de 10 a 30 ácaros foi desinfetada por três minutos em cloreto de benzalcônio (5%) e posteriormente lavados em água estéril em abundância. Os ácaros foram triturados em meio de cultura líquido BHI (Brain Heart Infusion) e cerca de 0,200 ml da suspensão de ácaros em BHI foi inoculada em frascos tipo “shell vial” contendo uma monocamada de células Vero. Os frascos foram centrifugados a 700 g por 1 hora a 22°C e posteriormente acrescidos 1 ml de meio de cultivo MEM (Gibco), quando os frascos foram incubados em estufa a 28°C. A cada três dias, uma pequena parte do meio contendo células em suspensão foi checada pela presença de estruturas compatíveis com *Rickettsia* spp, através da coloração de Gimenez (GIMÉNEZ, 1964).

9.3 Extração de DNA

O material restante da inoculação da técnica de “shell vial” foi submetido à extração de DNA utilizando o kit “DNEasy Tissue Kit” (Qiagen®), seguindo o protocolo do fabricante com as modificações propostas por Desloire et al. (2006).

9.4 Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

A presença de *Rickettsia* spp. nas amostras colhidas foi avaliada através da amplificação de um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*) (Quadro 4), presente em todas as espécies de *Rickettsia*.

9.5 Manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado

Uma vez obtido, o isolado foi submetido a passagens seriadas em monocamadas de células Vero em garrafa de 75cm³. Monocamadas que

demonstrarem nível de infecção próximo de 100% das células (determinado visualmente através de coloração de Gimenez) serão raspadas, e a suspensão de células será centrifugada. O sedimento de células será ressuspendido em tampão sucrose-fosfato-glutamato (SPG), pH 7.0, estéril, sendo então congelado a -80°C (LABRUNA et al., 2004), formando-se amostras de referência para o isolado obtido. Parte deste material será submetida à extração de DNA pelo “Tissue Kit®” (Quiagen®) para ser usado na PCR com o objetivo de amplificar fragmentos dos genes *gltA*, *ompA* e *ompB* (Quadro 4) de riquetsias, essencial para uso em classificação taxonômica de riquetsias (FOURNIER et al., 2003). Os fragmentos amplificados pela PCR serão seqüenciados em seqüenciador automático, e as seqüências obtidas analisadas, juntamente com as correspondentes de outras espécies de riquetsias disponíveis no GenBank. As distâncias filogenéticas entre o isolado e as espécies válidas serão analisadas, para verificar se o isolado poderá ser considerado uma espécie nova, ou simplesmente uma nova amostra de alguma espécie válida de riquetsia.

Quadro 4. Oligonucleotídeos iniciadores (primers) utilizados na detecção de *Rickettsia*

Gene	Primer	Sequência do Primer	Referência
<i>gltA</i>	CS-78	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	Labruna et al., 2004
	CS-323	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT	
<i>gltA</i>	CS-239	CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT	Labruna et al., 2004
	CS-1069	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	
<i>ompA</i>	190.70p	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	Regnery et al., 1991
	190.701	GTTCCGTTAATGGCAGCATCT	
<i>ompB</i>	120-M59	CCGCAGGGTTGGTAACTGC	Roux e Raoult, 2003
	120-807	CCTTTTAGATTACCGCCTAA	

10 RESULTADOS

10.1 Origem do material e identificação

Foram realizadas 15 campanhas de capturas nas diferentes áreas amostradas, sendo: São Paulo – Araçariguama (quatro fases de campo); Parque Estadual da Cantareira (duas fases de campo); Peruíbe (seis fases de campo); Paraná – Adrianópolis (três fases de campo). Foram capturados, pequenos mamíferos das seguintes espécies: São Paulo (Parque Estadual da Serra da Cantareira) – *Akodon cursor* Winge, *Euryzoryzomys russatus* (Wagner), e *Didelphis aurita* Wied-Neuwied; Araçariguama – *A. cursor*, *Nectomys squamipes* Brants e *D. aurita*; Peruíbe – *A. cursor*, *D. aurita*, *E. russatus*, *Metachirus nudicaudatus* (Desmarest), *Monodelphis* sp. Burnett, *Oecomys* sp. Thomas, *Oxymycterus* sp. Waterhouse, *Sciurus aestuans* L.; Paraná – *A. montensis* Thomas), *D. aurita*, *E. russatus*, *Oligoryzomys* sp. Bangs e *Thaptomys nigrita* Thomas (Tabela 7).

Tabela 7 Número e Espécies de pequenos mamíferos capturados por localidade nos estados de São Paulo e Paraná

Espécie	Localidade				Total
	Araçariguama, SP	P. E. Cantareira, SP	Peruíbe, SP	Adrianópolis, PR	
<i>A.cursor</i>	15	6	8	-	29
<i>A. montensis</i>	-	-	-	34	34
<i>D. aurita</i>	26	5	20	1	52
<i>E. russatus</i>	-	6	17	4	27
<i>M. nudicaudatus</i>	-	-	3	-	3
<i>M. demererae</i>	-	-	2	-	2
<i>Monodelphis</i> sp.	-	-	7	-	7
<i>N. squamipes</i>	3	-	-	1	4
<i>Oecomys</i> sp.	-	-	1	-	1
<i>Oligoryzomys</i> sp.	-	-	-	1	1
<i>Oxymycterus</i> sp.	-	-	2	-	2
<i>Sciurus aestuans</i>	-	-	1	-	1
<i>T. nigrita</i>	-	1	-	1	2
Total	44	18	61	42	165

De todos os pequenos mamíferos capturados nas áreas estudadas, apenas 13 estavam infestados com ácaros do gênero *Ornithonyssus* spp. representando 7,88% do total. As prevalências de infestação por espécie hospedeira podem ser observadas na Tabela 8.

Tabela 8 Prevalência de infestação por espécie hospedeira (%) de ácaros *Ornithonyssus* spp. colhidos de pequenos mamíferos

Ectoparasito	Hospedeiro				
	<i>A. cursor</i>	<i>A. montensis</i>	<i>D. aurita</i>	<i>Oxymycterus</i> sp.	<i>T. nigrita</i>
<i>O. brasiliensis</i>	-	4/34 (11,76%)*	-	-	1/1 (100%)*
<i>O. vitzthumi</i>	2/29 (6,89%)*	-	-	2/2 (100%)*	-
<i>O. wernecki</i>	-	-	4/52 (7,69%)*	-	-

*nº de hospedeiros infestados/nº total hospedeiros X 100

O. brasiliensis foi encontrada nos locais exclusivamente em Adrianópolis, PR; *O. vitzthumi* foi encontrada nos locais no Parque Estadual da Cantareira e Peruíbe de captura de São Paulo; e *O. wernecki* foi encontrada nos locais foi encontrado somente em Araçariguama

10.2 Isolamento de riquetsias de ácaros e manutenção em laboratório e definição taxonômica do isolado

Todos os lotes foram testados pela técnica de “shell vial” para o isolamento de riquetsias. Pela coloração de Gimenez, estruturas compatíveis com bactérias foram visualizadas em monocamada de células Vero e foi obtido um isolado de um lote colhido parasitando *Oxymycterus* sp. de Peruíbe, São Paulo. O isolado foi mantido até a segunda passagem em células e está depositado na Coleção de Rickettsias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, mas não foi possível sua caracterização. Como este isolado não gerou produtos de PCR para os primers descritos na Tabela 4, é indicativo que trata-se de uma bactéria pertencente a um gênero diferente de *Rickettsia*.

10.3 Extração de DNA e Reação de Cadeia de Polimerase (PCR)

Foi extraído DNA de todas as amostras submetidas ao isolamento e realizada a reação de cadeia de polimerase para um fragmento de aproximadamente 400pb do gene da citrato sintase (*gltA*), contudo não houve amplificação.

11 DISCUSSÃO

As campanhas para a captura de animais silvestres realizadas nos estados do Paraná e São Paulo foram concentradas em áreas de Mata Atlântica com diferentes graus de ação antrópica. Foram identificadas nove espécies de roedores e três de marsupiais com a maior riqueza de espécies para a área de Peruíbe que esta inserida na Estação Ecológica Juréia-Itatins. Apesar da dificuldade de comparação com outros inventários de roedores, devido às diferenças na metodologia de coleta, é possível afirmar, que as doze espécies capturadas em todas as áreas amostradas, por ocasião deste levantamento, representam uma alta riqueza comparável ao número de espécies encontradas em outros biomas brasileiros (MARES; ERNEST, 1995; MARES et al 1986; MARES et al 1989; FONSECA; REDFORD, 1984). Essa riqueza pode estar relacionada, principalmente, a complexidade estrutural das matas secundárias e é considerada um dos fatores que propiciam uma maior diversidade de espécies de pequenos mamíferos terrestres (VIEIRA, 1999; TALAMONI, 1996; FONSECA, 1989).

Os ácaros macronissídeos infestam preferencialmente espécies de roedores e marsupiais com hábitos fossoriais ou semi-fossoriais. Das 13 espécies de roedores capturadas somente três (*Akodon* sp., *T. nigrita* e *Oxymycterus* sp.) possuem esse tipo de comportamento. A baixa abundância de espécies não fossoriais levou a baixa prevalência de infestação por *Ornithonyssus* spp. encontrada nos roedores capturados, nas diferentes áreas estudadas. Dessa forma, os altos índices de positividade apresentados por Nieri-Bastos (2008) refletem a utilização de um grande número de amostras colhidas de hospedeiros primários para ácaros macronissídeos.

Para ácaros hematófagos são descritas bactérias das espécies *R. akari* e *O. tsutsugamushi* (AZAD; BEARD; 1998) causando “rickettsialpox” e a febre tsutsugamushi, respectivamente. Embora *R. akari* nunca tenha sido descrita para o Brasil, existem relatos para a América Latina na Costa Rica e no México, com casos clínicos confirmados (LABRUNA et al., 2011a). Esses autores ainda, também relatam *O. tsutsugamushi* no Chile infectando sanguessugas, com presença de caso clínico. No lote de *O. vitzthumi* proveniente de *Oxymycterus* sp. foi isolada uma

bactéria Gram-negativa, que se cora pela técnica de Gimenez, porém não foi possível sua caracterização molecular, pois os marcadores clássicos para o grupo não amplificaram. Tal fato, atenta para o isolamento de bactérias nunca descritas em ácaros macronissídeos ou ainda a presença de novas espécies de bactérias com potencial patogênico ou ainda endossimbiontes.

REFERÊNCIAS

- ANGERAMI, R. N.; RESENDE, M. R.; FELTRIN, A. F. C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E. M.; STUCCHI, R. S. B.; SILVA, L. J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from a Endemic Area in Southeastern Brazil – Clinical Aspects. **Annals New York Academy Sciences**, v. 1078, p. 252-254, 2006. DOI: 10.1196/annals.1374.044
- ABARCA, K.; LÓPEZ, J.; ACOSTA-JAMETT, G.; LEPE, P.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. A Third *Amblyomma* Species and the First Tick-Borne Rickettsia in Chile. **Journal Medical Entomology**, v. 49, n. 1, p. 219-222, 2012.
- AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial Pathogens and their Arthropod Vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 179-186, 1998.
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOARES, J. F.; MARCILI, A.; FAMADAS, K. M.; FACCINI, J. L. H.; RAMIREZ, D. G.; DOYLE, R. L.; MARTINS, J. R.; JUNIOR, J. R.; GUGLIELMONE, A. A.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae); description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation. **Zootaxa**, v. 3178, p. 22-32, 2012.
- BLAIR, P. J.; SCHOELER, G. B.; MORON, C.; ANAYA, E.; CACEDA, R.; CESPEDES, M.; CRUZ, C.; FELICES, V.; GUEVARA, C.; HUAMAN, A.; LUCKETT, R.; MENDOZA, L.; RICHARDS, A. L.; RIOS, Z.; SUMNER, J. W.; VILLASECA, P.; OLSON, J. G. Evidence of Rickettsial and Leptospira Infections in Andean Northern Peru. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 4, p. 357-363, 2004.
- 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 New York Academy of Sciences**, v. 266, p. 61-72, 1975.
- CONTI-DIAZ, I. A.; RUBIO, I.; SOMMA, M.; PEREZ, G. Lymphatic cutaneous rickettsiosis caused by *Rickettsia conorii* in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 32, p. 313-318, 1991.
- CONTI-DÍAZ, I. A., MORAES-FILHO, J., PACHECO, R. C., LABRUNA, M. B. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as the etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p. 337-339, 2009.
- DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic Applied Acarology**, v. 14, p. 30-49, 2009.
- DESLOIRE, S.; VALIENTE-MORO, C.; CHAUVE, C.; ZENNER, L. Comparison of four methods of extracting DNA from *D. gallinae* (Acari: Dermatyssidae). **Veterinary Research**, v. 37, p. 725-732, 2006.
- DOVE, W. E.; SHELMIER, B. Tropical rat mites, *Liponyssus bacoti* Hirst, vectors of endemic typhus. **The Journal of the American Medical Association**, v. 97, p. 1506-1510, 1931.
- FONSECA, F. Notas de Acarologia III. Parasitismo do homem e de *Cavia aperea* por *Liponissus bacoti* (Hirst, 1913) (Acari: Dermatyssidae). **Memórias do Instituto Butantan** v. 7, p. 139-143. 1932.
- FONSECA, F. Notas de Acarologia XIII. Novas espécies sul-americanas de parasitos do gênero *Liponissus* Kolenati, 1958 (Acarina: Liponissidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 9, p. 43. 1935.

FONSECA, F. Notas de Acarologia XXVII. *Liponissus brasiliensis* sp. n., parasita habitual de roedores e acidental do homem. **Memórias do Instituto Butantan**, v.12, p. 1-8, 1939.

FONSECA, F. Notas de Acarologia XXXII. Novas espécies brasileiras do gênero *Liponissus* Kolenati (Acari: Liponissidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 15, p. 103-118, 1941.

FONSECA, F. Notas de Acarologia XXXIV. Posição do gênero *Liponissus* Kolenati em face das espécies tropicais; seu desdobramento em novos gêneros (Acari: Liponissidae). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 16, p. 149, 1943.

FONSECA, F. A monograph of the genera and species of Macronyssidae Oudemans, 1936 (synom.: Liponyssidae Vitzthum, 1931) (Acari). **Proceedings Zoological Society of London**, v. 118, n. 2, p. 249-334, 1948.

FONSECA, F. Notas de Acarologia XXXVI. Aquisições novas para a fauna brasileira de ácaros hematófagos (Acari: Macronyssidae). **Memórias do Instituto Butantan** v. 1, p. 79-92, 1954.

FONSECA, G. A. B.; REDFORD, K. H. The mammals of the ecological IBGE's reserve, Brasília, and an analysis of the role of gallery forests in increasing diversity. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 44, p. 518-523, 1984.

FONSECA, G. A. B. Efeito da Estrutura e do Tamanho de Fragmentos Florestais Sobre Comunidades de Pequenos Mamíferos. **In: XVI Congresso Brasileiro de Zoologia**, João Pessoa, p. 105, 1989.

FOURNIER, P. E.; DUMLER, J. S.; GREUB, G.; ZHANG, J.; WU, Y.; RAOULT, D. Gene sequence-based criteria for identification of new *Rickettsia* isolates and description of *Rickettsia heilongjiangensis* sp. nov. **Journal Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5456-5465, 2003.

GODDARD, J. Experimental infection of lone star ticks, *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and exposure of guinea pigs to the agent. **Journal Medical Entomology**, v. 40, p. 686-689, 2003.

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

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

GUGLIELMONE, A. A.; ESTRADA-PEÑA, A.; KEIRANS, J. E.; ROBBINS, R. G. **Ticks (Acari: Ixodida) of the neotropical zoogeographic region**. Atlanta Houten: International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases, 2003. 173 p.

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.

GUIMARÃES J. H.; TUCCI, E. C.; Barros-Battesti, D. M.. 2001. **Ectoparasitos de importância veterinária**. Plêiade, São Paulo, Brasil, 213 p.

HILLYER, E. V.; QUESENBERY, K. E. 1997. **Ferrets, rabbits and rodents**. clinical medicine and surgery, 1st ed. Philadelphia: Saunders.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology**, v. 24, p. 135-238. 1985

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

HORTA, M. C.; PINTER, A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, p. 321-325, 2005.

HORTA, M. C.; SABATINI, G. S.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWSKA, M.; CANAL, R. B.; PACHECO, R. C.; MARTINS, T. F.; MATUSHIMA, E. R.; LABRUNA, M. B. Experimental Infection of the Opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, n. 1 p. 109-118, 2010.

JONES, E. K.; CLIFFORD, C. M.; KEIRANS, J. E.; KOHLS, G. M. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to the species of *Amblyomma* in the **Western Hemisphere**. **Brigham Young University Sciences Bulletin Biological Services**, v. 17, p. 1-40, 1972.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G.. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. S3-S14, 2004.

KEIRANS, J. E.. 1992. Systematics of the Ixodida (Argasidae, Ixodidae, Nuttalliellidae): an overview and some problems. In: Fivaz, B.; Petney, T. & Horak, I. [Ed.], **Tick vector biology medical and veterinary aspects**, Springer, Berlin, p.1-21

LABRUNA, M. B.; FUGISAKI, E. Y. M.; PINTER, A.; DUARTE, J. M. B.; SZABÓ, M. J. P. Life cycle and host specificity of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 30, p. 305-316, 2003.

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

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

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

LABRUNA, M. B.; OGRZEWSKA, M.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; ALMEIDA, A. P.; PINTER, A. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 829-834, 2011b. DOI: 10.3201/eid1705.101524

LANDULFO, G. A.; PEVIDOR, L. V.; SAMPAIO, J. F.; LUZ, H. R.; ONOFRIO, V. C.; FACINNI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. M.. Parâmetros biológicos do estágio adulto de *Carios mimon* (Acari: Argasidae) em condições de laboratório. **III Simpósio Brasileiro de Acarologia (SIBAC)**. 2011. Campinas. <http://www.sibac.net.br/resumosarea.html>

LIU, W. T. Isolation of typhus rickettsiae from rat mites, *Liponyssus bacoti*, in Peiping. **American Journal Tropical Medicine Hygiene**, v. 45, p. 58-66. 1947.

MARES, M. A.; ERNEST, K. A. Population and community ecology of small mammals in a gallery forest of central Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 76, p. 750-768, 1995.

MARES, M. A.; ERNEST, H. A.; GETTINGER, D. D. Small mammal community structure and composition in the Cerrado Province of central Brasil. **Journal of Tropical Ecology**, v. 2, n. 4, p. 289-300, 1986.

MARES, M. A.; BRAUN, J. K.; GETTINGER, D., Observations on the distribution and ecology of the mammals of the Cerrado grasslands of Central Brazil. **Annals of Carnegie Museum**, v. 58, p. 1-60. 1989.

MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. **American Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 40, n. 2, p. 197-199, 1989.

MARTINS-HATANO, F.; GETTINGER, D. E BERGALLO, H. G. Ectoparasitas de pequenos mamíferos na Restinga de Jurubatiba. In: Rocha, C. F. D.; Esteves, F. A. and SCARANO, F. R. **Pesquisas de Longa Duração na Restinga de Jurubatiba: ecologia, história natural e conservação**. São Carlos: RiMa, 2004. p. 231-241.

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. 2011. 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.. 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biology Review** v. 86, p. 379-405. DOI:10.1111/j.1469-185.2010.00151.x

MERTINS, J. W.; MOORHOUSE, A. S.; ALFRED, J. T.; HUTCHESON, H. J. *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae): new North American collection records, including the first from the United States. **Journal Medical Entomology**, v. 47, p. 536–542, 2010.

MICHERDZINSKI, W. **Eine Taxonomische Analyse Der Familie Macronyssidae Oudemans, 1936**. Polska Akademia Nauk. 1980, 263p.

NAVA, S.; MANGOLD, A. J.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; OSCHEROV, E. B.; GUGLIELMONE, A. A. *Amblyomma boeroi* n. sp. (Acari: Ixodidae), a parasite of the Chacoan peccary *Catagonus wagneri* (Rusconi) (Artiodactyla: Tayassuidae) in Argentina. **Systematic Parasitology**, v. 73, p. 161-174, 2009.

NAVA, S.; MANGOLDI, A. J.; MASTROPAOLO, M.; VENZAL, J. M.; FRACASSI, N.; GUGLIELMONI, A. A. Seasonal dynamics and hosts of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Veterinary Parasitology**, 2011. DOI:10.1016/j.vetpar.2011.03.054.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G... Lethal Effect of *Rickettsia rickettsii* on its Tick Vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 773-778, 1999

NIERI-BASTOS, F. 2008. **Revisão taxonômica das espécies do gênero *Ornithonyssus* (Acari: Macronyssidae) parasitos de pequenos mamíferos terrestres no Brasil e avaliação da infecção desses ácaros por *Rickettsia* spp.** Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 63p.

NIERI-BASTOS, F. A.; LABRUNA, M. B.; MARCILI, A.; DURDEN, L. A.; MENDOZA-URIBE, L.; BARROS-BATTESTI, D. M. Morphological and molecular analysis of *Ornithonyssus* spp. (Acari: Macronyssidae) from small terrestrial mammals in Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v.55, p. 305-327, 2011.

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, 2009.

ONOFRIO, V. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F. G.; BARROS-BATTESTI, D. M. Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma*. p. 53-113. In Barros-Battesti, D. M.; Arzua M.; Bechara, G. H. (ed.). **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223p.

OLIVER JR., J. H. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). **Annual Review of Ecology and Systematic**, v. 20, p. 397-430, 1989.

OVAZZA, M. Quelques observations sur la biologie et plus particulièrement le cycle de *Liponyssus bacoti* Hirst, 1913. **Annals of Parasitology** v. XXV, n. 3: p. 178-187, 1950.

PACHECO, R. C.; VENZAL, J. M.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B... *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, p. 1804–1805, 2006.

PACHECO, R. C.; MORAES-FILHO, J.; MARCILI, A.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J.; CATROXO, M. H. B.; BOUYER, D. H.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia monteiroi* sp. nov. infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. **Applied Environmental Microbiology**, v. 77, n. 15, p. 5207-5211, 2011.

PADDOCK, C. D.; SUMMER, J. W.; COMER, J. A.; ZAKI, S. R.; GOLDSMITH, C. S.; 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**, v. 38, p. 805-811, 2004.

PADDOCK, C. D.; FINLEY, R. W.; WRIGHT, C. S.; ROBINSON, H. N.; SCHRODT, B. J.; LANE, C. C.; EKENNA, O.; BLASS, M. A.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A.; MCLELLAN, S. L. F.; GODDARD, J.; HOLMAN, R. C.; OPENSHAW, J. J.; SUMNER, J. W.; ZAKI, S. R.; EREMEEVA, M. E. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis and Its Clinical Distinction from Rocky Mountain Spotted Fever. **Clinical Infectious Diseases**, v. 47, p. 1188-1196, 2008.

PARKER, R. R. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Report**, v. 54, 1482-1484, 1939.

PHILIP, C. B.; HUGHES, L. E. The tropical rat mite, *Liponyssus bacoti*, as an experimental vector of rickettsialpox. **The American Journal of Tropical Medicine**, v. 28, n. 5, p. 697-705, 1948.

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 New York Academy Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

RADOVSKY, F. J. Evolution of mammalian mesostigmatid mites. **Coevolution of parasitic arthropods and mammals** (ed. By K.C. Kim, p. 441–504. John Wiley, New York.). 1985.

RADOVSKY, F. J. **Revision of Genera of the Parasitic Mite Family Macronyssidae Mesostigmata: Dermanyssidae of the World**. Indira Publishing House, 2010. 170p.

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

REEVES, W. K.; DOWLING, A. P. G.; DASCH, G. A. Rickettsial agents from parasitic Dermanyssoidea (Acari: Mesostigmata). **Experimental and Applied Acarology** v. 38, p. 181-188. 2006.

REEVES, W. K.; LOFTIS, A. D.; SZUMLAS, D. E.; ABBASSY, M. M.; HELMY, I. M.; HANAFI, H. A.; DASCH, G. A. Rickettsial pathogens in the tropical rat mite *Ornithonyssus bacoti* (Acari: Macronyssidae) from Egyptian rats (*Rattus* spp.). **Experimental and Applied Acarology**, v. 41 n. 1-2 p.101-107. 2007.

ROMER, Y.; SEIJO, A. C.; CRUDO, F.; NICHOLSON, W. L.; VARELA-STOKES, A.; LASH, R. R.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 1169-1173. 2011. DOI:10.3201/eid1707.101857

ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*ompB*). **International Journal Systematic Evolutionary Microbiology**, v. 50, p. 1449–1455, 2003.

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

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 Medical Entomology**, v. 47, p. 913–916. 2010. DOI: 10.1603/ME10073

SHELMIRE, B.; DOVE, W. E. The tropical rat mite *Liponyssus bacoti* Hirst, 1914. **The Journal . American. Medicine. Association**. v. 96, p. 579-584, 1931.

SILVEIRA I, PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. First report of *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infection Diseases** v. 13, p. 1111–1113, 2007.

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense* with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain Spotted Fever. *Med. Vet. Entomol.* (no prelo). 2011.

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

STRANDTMANN, R. W.; WHARTON, G. W. **Manual of Mesostigmatid mites parasitic on vetebrates**. The Institute of Acarology, University of Maryland, College Park, USA. 1958. 330p

SZABÓ, M. P. J.; CASTRO, M. B.; RAMOS, H. G. C.; GARCIA, M. V.; CASTAGNOLLI, K. C.; PINTER, A.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G. M.; DUARTE, J. M. B.; LABRUNA, M. B. Species diversity and seasonality of free-living ticks (Acari: Ixodidae) in the natural habitat of wild Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) in Southeastern Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 143, n. 2, p. 147-154, 2007.

TALAMONI, S. A. **Ecologia de Uma Comunidade de Pequenos Mamíferos da Estação Ecológica de Jataí**, Município de Luís Antônio, SP. Tese (Doutorado), Universidade Federal de São Carlos, 179p, 1996.

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

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

VIEIRA, E. M. **Estudo Comparativo de Comunidades de Pequenos Mamíferos em Duas Áreas de Mata Atlântica Situadas no Sudeste do Brasil**. Tese (Doutorado), Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 126p, 1999.

WEINERT, L. A., WERREN, J. H.; AEBI, A.; STONE, G. N.; JIGGINS, F. M.. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. **BMC Biology**, doi:10.1186/1741-7007-7-6

WOOLLEY, T.A. 1988. **Acarology. Mites and human welfare**. Fort Collins, Library of Congress, 484 p.

YU, X. J.; WALKER, D. H.. 2003. The Order Rickettsiales. In: DWORKIN, M. (Ed.) **The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology community** 3rd ed. New York: Springer-Verlag, disponível em: <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>.