JOÃO FABIO SOARES

Infecção experimental do carrapato *Amblyomma cajennense* pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira: avaliação das transmissões transovariana e transestadial, efeito da infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados

São Paulo

2011

JOÃO FABIO SOARES

Infecção experimental do carrapato *Amblyomma cajennense* pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira: avaliação das transmissões transovariana e transestadial, efeito da infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2011

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

14.01.2011
BIBLIOTECA VIRGINIE BUFF D'ÁPICE
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
E ZOOTECNIA DA USP

Conferido Somente Ficha
Bibliográfica

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

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

T.2415
FMVZ

Soares, João Fabio

Infecção experimental do carrapato *Amblyomma cajennense* pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira: avaliação das transmissões transovariana e transtadial, efeito na infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados / João Fabio Soares. -- 2011.

62 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2011.

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 cajennense*. 2. *Rickettsia rickettsii*. 3. Efeito letal.
4. Transmissão transtadial e transovariana. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Infecção experimental de carrapatos pela bactéria *Rickettsia rickettsii*: avaliação das transmissões transovariana e transtadial, efeito na infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos de transmitirem a bactéria para vertebrados”, utilizando 142 (cento e quarenta e dois) cobaias, protocolado sob o nº1644/2009, não utilizando animais, 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 22/04/09.

We certify that the Research “Experimental infection of ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*: evaluation of transovarial and transtadial transmissions, effect of the infection on tick biological parameters, and the ability to larvae, nymphs and adults to transmit the bacterium to vertebrates”, protocol number 1644/2009, utilizing 142 (one hundred forty) cobaias, under the responsibility Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 04/22/09.

São Paulo, 23 de abril de 2009

Profa Dra Denise Tabacchi Fantoni
Vice-Presidente da Comissão de Bioética
FMVZ/USP

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Soares, João Fabio

Título: Infecção experimental do carrapato *Amblyomma cajennense* pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira: avaliação das transmissões transovariana e transtadial, efeito da infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados.

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Primeiramente aos meus pais: Jeremias e Elba.

Aos meus irmãos: Jozi e Junior.

À minha linda namorada Aline.

Aos demais familiares: tios, tias, primos, primas, meu sobrinho Miguel, Meus grandes amigos e compadres Marcos e Katia e ao meu querido afiliado Mateus.

Aos que considero como irmãos: Bia, Fernando, Andre, Deise, Roberto e Luciano.

Aos colegas, amigos e professores dos tempos da graduação e dos estágios em Santa Maria.

Ao amigo Salomão e a todos os outros amigos que ficaram no Rio Grande do Sul.

Aos amigos do CTG (Centro de Tradições Gaúchas).

Aos amigos e colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias da USP

A todos que não citei de forma distinta, mas que com certeza estavam em meus pensamentos.

A todos a quem minha distância trouxe saudades, mas mesmo assim continuaram a incentivar-me.

AGRADECIMENTOS

Ao Marcelo, pela amizade, pela orientação e pela oportunidade de trabalhar e aprender com ele.

Aos meus pais, Elba e Jeremias, que mesmo saudosos, aceitavam minha ausência e me incentivavam.

À minha namorada Aline pelo carinho, pela ajuda, pela compreensão e companheirismo.

Aos meus irmãos pela compreensão e pelo apoio sempre presente.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias Jonas, Fernanda, Maria, Mariana, Aline, Herbert, Amália, Iara, Arlei, Matias, Carlos, Thiago, Vanessa, Diego, Bruno, Luiz e em especial aos que me ajudaram de forma mais direta.

Aos professores e aos amigos do departamento (VPS) pela amizade e pela ajuda.

Aos funcionários e amigos Pedrinho, Renatinho, Bispo, Fininho, Cristina, Virginia, Washington, Tânia e Danival.

À Biovet em especial à Alexandra pelo apoio logístico.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

Aos amigos, que hoje, estão distantes, mas continuam a ser amigos.

A todos a quem não citei de forma distinta, mas que sem dúvida sou grato.

E finalmente a quem tornou tudo possível, Deus.

RESUMO

SOARES, J. F. **Infecção experimental do carrapato *Amblyomma cajennense* pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira:** avaliação das transmissões transovariana e transestadial, efeito da infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados. [Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense* with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, the etiological agent of Brazilian spotted fever: evaluation of the transovarial and transstadial transmissions, effect of the infection on the biological parameters of the tick, and the capacity of larvae, nymphs, and adults to transmit the bacterium to vertebrates]. 2011. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Amblyomma cajennense é a principal espécie de carrapato incriminada na transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB), no Brasil e outros países da América do Sul. O presente trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar e quantificar a ocorrência das transmissões transovariana e transestadial de *R. rickettsii* em *A. cajennense*, verificando o efeito da infecção nos parâmetros biológicos do carrapato, e finalmente, a capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados. Para tal, cobaias (*Cavia porcellus*) infectadas experimentalmente com *R. rickettsii* foram infestadas com larvas e ninfas, para alimentação dos adultos de *A. cajennense* foram utilizados coelhos infectados. A biologia desses carrapatos expostos à *R. rickettsii* foi acompanhada até a geração seguinte de ninfa. Amostras de cada estágio evolutivo (larva, ninfa, adulto, ovo, larva, ninfa) foram testadas por PCR em tempo real para determinar a frequência de carrapatos infectados por *Rickettsia*. Também foram quantificadas as transmissões transovariana e transestadial de *R. rickettsii* no carrapato *A. cajennense*. Cobaias e coelhos não infectados, utilizadas para infestação de cada um dos estágios parasitários do carrapato, foram avaliadas clinicamente e por sorologia, a fim de verificar a ocorrência da transmissão de *R. rickettsii* para esses animais. Em todas as infestações com carrapatos expostos previamente a *R. rickettsii* dentro de uma mesma

geração, os animais adoeceram com febre alta (temperatura retal $>40^{\circ}\text{C}$), lesão escrotal e alta letalidade, indicando a transmissão transestadial de *R. rickettsii* nos carrapatos, sendo esta confirmada por PCR e sorologia dos animais. Quanto à transmissão transovariana, esta ocorre em baixa quantidade nos grupos GL (infectado na fase de larva) e GN (infectado na fase de ninfa), pois das 12 cobaias (seis do grupo GL e seis do grupo GN), apenas três apresentaram sinais clínicos, e somente uma veio a óbito. Um total de oito animais foram positivos à RIFI (reação de imunofluorescência indireta), porém destes, seis apresentaram títulos baixos, entre 128 e 512, provavelmente devido a um pequeno desafio imunológico. As cobaias infestadas com larvas oriundas de fêmeas pertencentes ao grupo GA (infectado na fase adulta) não se apresentaram clinicamente alteradas nem sorologicamente reativas. Sugerindo que transmissão transovariana no grupo GA seja algo raro, pois apesar da progênie de uma das fêmeas ter sido positiva à PCR, nenhuma das cobaias infestadas com larvas ou ninfas de segunda geração manifestou quaisquer evidências do contato com *R. rickettsii*. Paralelamente, carrapatos não expostos a *R. rickettsii* (grupo controle GC) foram mantidos nas mesmas condições dos carrapatos infectados, para avaliar a existência de um possível efeito deletério da infecção por *R. rickettsii* na biologia do carrapato, os quais foram evidenciados com a maior mortalidade de larvas infectadas do grupo GL na primeira e na segunda gerações, além de alterações nos parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas dos grupos expostos a *R. rickettsii*. Os resultados encontrados comprovam que a *R. rickettsii* é maléfica ao *A. cajennense*, bem como a existência de transmissão transestadial e transmissão transovariana, porém esta última em baixa quantidade. Isto ressalta a importância de hospedeiros amplificadores e de outros carrapatos na epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira.

Palavras-chave:

Amblyomma cajennense. *Rickettsia rickettsii*. Efeito Letal. Transmissão transestadial e transovariana.

ABSTRACT

SOARES, J. F. **Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense* with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, the etiological agent of Brazilian spotted fever: evaluation of the transovarial and transstadial transmissions, effect of the infection on the biological parameters of the tick, and the capacity of larvae, nymphs, and adults to transmit the bacterium to vertebrates.** [Infecção experimental do carrapato *Amblyomma cajennense* pela bactéria *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da febre maculosa brasileira: avaliação das transmissões transovariana e transestadial, efeito da infecção nos parâmetros biológicos do carrapato e capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados]. 2011. 62f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Amblyomma cajennense is the main tick species incriminated in the transmission of *Rickettsia rickettsii*, the etiological agent of Brazilian spotted fever, in Brazil and in other South American countries. The present work aimed to evaluate and quantify the transovarial and transstadial of *R. rickettsii* in *A. cajennense*, verifying the effect of the infection on biological parameters of the tick, and finally, to evaluate the capacity of larvae, nymphs, and adults to transmit the bacterium to vertebrates. For these purposes, guinea pigs (*Cavia porcellus*), experimentally infected with *R. rickettsii*, were artificially infested with uninfected larvae and nymphs, while adult ticks were allowed to infest experimentally-infected rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). The biology of these *R. rickettsii*-exposed ticks was accomplished until the next generation of nymphs, always having samples of each developmental stage (F₁ larva, nymph, and adult, and F₂ egg, larva, and nymph) tested by real-time PCR to determine the frequency of infected ticks. In parallel, uninfected control ticks were exposed simultaneous to the same protocols. Infested guinea pigs and rabbits were evaluated clinically and for serology, to verify the occurrence of transmission of *R. rickettsii* to these animals. In all infestations with ticks previously exposed to *R. rickettsii*, within the same generation, there were infested animals that presented high fever (rectal temperature >40°C), scrotal lesion, and high lethality, indicating transstadial transmission of *R. rickettsii* in the ticks, confirmed by PCR on ticks and serology of the animals. Regarding transovarial transmission, it occurred at low levels in females that had been exposed to *R. rickettsii* during the larval stage (GL) and during the nymphal stage (GN),

since only 3 out of 12 guinea pigs (six from GL, and six from GN) infested with F₂ larvae presented clinical alterations, with a single lethality. However, eight animals became seropositive by IFA (immunofluorescence assay), from which six had low titers anti-*R. rickettsii*, between 128 and 512, possibly due to weaker immunological challenges. Guinea pigs exposed to larvae derived from GA females (exposed to *R. rickettsii* during the adult stage) did not present any clinical alteration nor became serologically positive, indication that transovarial transmission is rare in this group. Despite of a single progeny that became PCR-positive, out of others that were all negative, no guinea pig infested with F₂ larvae or nymphs from GA females showed evidence that they were in contact with *R. rickettsii*, similarly to the control group. In relation to a possible effect of *R. rickettsii* in the tick survival and developmental, there were a higher mortality of infected larvae from the GL group in both first and second laboratory generations, and lower reproductive performance of engorged females from the infected groups. The results show that *R. rickettsii* has deleterious effects to *A. cajennense*. There are both transstadial and transovarial transmissions of *R. rickettsii* in *A. cajennense*, however transovarial transmission is at low rates, highlighting the importance that amplifier hosts and other tick species should have in the epidemiology Brazilian spotted fever.

Key-words:

Amblyomma cajennense. *Rickettsia rickettsii*. Lethal effect. Transstadial and transovarial transmission.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Cobaia com câmara de algodão aderida ao dorso.....	24
Figura 2: Fluxograma ilustrando os procedimentos experimentais de infestações com os quatro grupos experimentais (GL, GN, GA, GC) de <i>Amblyomma cajennense</i>	27
Figura 3: Necrose escrotal em cobaia infectada com <i>Rickettsia rickettsii</i>	31

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Período parasitário em dias dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA,), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle).....38

Gráfico 2: Peso das fêmeas ingurgitadas dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA,), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle).....38

Gráfico 3: Período pré-postura em dias dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA,), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle).....39

Gráfico 4: Peso da massa de ovos em gramas dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA,), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle).....39

Gráfico 5: Eficiência reprodutiva dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA,), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle).....40

Gráfico 6: Período de incubação em dias dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA,), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle).....40

Gráfico 7: Percentual de eclosão dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA,), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle).....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resultados de infestações com carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i> do grupo GL (Grupo exposto a <i>Rickettsia rickettsi</i> na fase de larva)	32
Tabela 2. Resultados de infestações com carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i> do grupo GN (Grupo exposto a <i>Rickettsia rickettsi</i> na fase de ninfa)	33
Tabela 3. Resultados de infestações com carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i> do grupo GA (Grupo exposto a <i>Rickettsia rickettsi</i> na fase adulta)	34
Tabela 4. Resultados de infestações com carrapatos <i>Amblyomma cajennense</i> do grupo GC (Grupo controle, nunca exposto a <i>Rickettsia rickettsi</i>)	35
Tabela 5. Sucesso de alimentação e sobrevivência de larvas, ninfas e adultos de <i>Amblyomma cajennense</i> provenientes dos quatro grupos.....	36
Tabela 6. Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas e seus ovos para quatro grupos experimentais de <i>Amblyomma cajennense</i> , expostos a infecção por <i>Rickettsia rickettsii</i> na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA), ou nunca expostos a <i>R. rickettsii</i> (GC).....	37
Tabela 7. Valores de frequência de transmissão transovariana (FTT) e de frequência de infecção da progênie (FIP) para posturas de fêmeas ingurgitadas de <i>Amblyomma cajennense</i> que foram expostas à infecção por <i>Rickettsia rickettsii</i> no estágio anterior de larva (grupo GL), ninfa (grupo GN) e adulto (GA).....	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GL	Grupo exposto a <i>Rickettsia rickettsi</i> na fase de larva
GN	Grupo exposto a <i>Rickettsia rickettsi</i> na fase de ninfa
GA	Grupo exposto a <i>Rickettsia rickettsi</i> na fase adulta
GC	Grupo controle, nunca exposto a <i>Rickettsia rickettsi</i>
RIFI	Reação de imunofluorescência indireta
UR	Umidade relativa
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
PCR	Polimerase Chain Reaction
DAI	Dias após inoculação ou infestação
N.D	Não determinado
FTT	Frequência de transmissão transovariana
FIP	Frequência de infecção da progênie
<i>A. cajennense</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>
<i>A. aureolatum</i>	<i>Amblyomma aureolatum</i>
<i>R. sanguineus</i>	<i>Rhipcephalus sanguineus</i>
<i>R. turanicus</i>	<i>Rhipcephalus turanicus</i>
<i>H. leporispalustris</i>	<i>Haemaphysalis leporispalustris</i>
<i>D. andersoni</i>	<i>Dermacentor andersoni</i>
<i>D. variabilis</i>	<i>Dermacentor variabilis</i>
<i>R. rickettsii</i>	<i>Rickettsia rickettsii</i>
<i>R. conorii</i>	<i>Rickettsia conorii</i>
<i>R. massilae</i>	<i>Rickettsia massilae</i>
SP	São Paulo
FM	Febre Maculosa
FMB	Febre Maculosa Brasileira

LISTA DE SÍMBOLOS

° C	Graus Celcius
%	Porcentagem
ng	Nanograma
g	Gramma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 História natural de <i>R. rickettsii</i>	19
2 OBJETIVOS	21
3 MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1 Obtenção de carrapatos	22
3.2 Exposição de carrapatos a <i>R. rickettsii</i>	22
3.2.1 Infestação com larvas	24
3.2.2 Infestação com ninfas	24
3.2.3. Infestação com adultos	25
3.2.4. Infestação com larvas de segunda geração	26
3.2.5. Infestação com ninfas de segunda geração	26
3.3 Sorologia dos animais para <i>R. rickettsii</i>	28
3.4 Avaliação clínica dos animais infestados	28
3.5 Verificação da aquisição da infecção por <i>R. rickettsii</i> e transmissão transestadial	28
3.6 Verificação da aquisição da infecção por <i>R. rickettsii</i> e transmissão transovariana	29
3.7. Extração de DNA e PCR	29
3.8 Análise estatística.	30
4 RESULTADOS	31
4.1 Grupo de carrapatos expostos a <i>R. rickettsii</i> na fase de larva (GL)	31
4.2 Grupo de carrapatos expostos a <i>R. rickettsii</i> na fase de ninfa (GN)	32
4.3 Grupo de carrapatos expostos a <i>R. rickettsii</i> na fase adulta (GA)	33
4.4 Grupo de carrapatos sem exposição a <i>R. rickettsii</i> (grupo controle: GC)	34
4.5 Efeito da infecção por <i>R. rickettsii</i> na viabilidade dos carrapatos	35
4.6 Parâmetros biológicos das fêmeas dos quatro grupos experimentais, expostos a infecção por <i>R. rickettsii</i> na fase de larva (GL), ninfa (GN), adulto (GA), ou nunca expostos a infecção (GC)	36
4.7 Verificação da aquisição da infecção por <i>R. rickettsii</i> e transmissão transestadial	41
4.8 Verificação da aquisição da infecção por <i>R. rickettsii</i> e transmissão transovariana	42
4.9 Sorologia das cobaias para <i>Rickettsia rickettsii</i>	42
4.10 Avaliação clínica dos animais infestados	43
4.10.1 Avaliação clínica das cobaias submetidas a uma prova de imunidade	43
5 DISCUSSÃO	44
5.1 Avaliação da capacidade de ninfas de <i>A. cajennense</i> em transmitir a bactéria <i>R. rickettsii</i> para vertebrados, durante o parasitismo	44
5.2 Avaliação da capacidade de adultos de <i>A. cajennense</i> em transmitir a bactéria <i>R. rickettsii</i> para vertebrados, durante o parasitismo	44
5.3 Avaliação da capacidade de larvas de segunda geração (F₂) de <i>A. cajennense</i> em transmitir a bactéria <i>R. rickettsii</i> para vertebrados, durante o parasitismo	45
5.4 Avaliação da capacidade de ninfas de segunda geração (F₂) de <i>A. cajennense</i> em transmitir a bactéria <i>R. rickettsii</i> para vertebrados, durante o parasitismo	47
5.5 Avaliação da transmissão transestadial de <i>R. rickettsii</i> de larvas para ninfas.	48
5.3 Avaliação da transmissão transestadial de <i>R. rickettsii</i> de ninfas para adultos	50
5.4 Avaliação da transmissão transovariana de <i>R. rickettsii</i>	51
5.5 Avaliação dos efeitos da infecção por <i>R. rickettsii</i> nos parâmetros biológicos de <i>A. cajennense</i>.	53
5.6 Considerações finais	54
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	57

1 INTRODUÇÃO

Rickettsia rickettsii é uma bactéria Gram-negativa, intra-celular obrigatória, causadora de uma grave riquetsiose em humanos, chamada no Brasil de Febre Maculosa Brasileira (FMB) ou febre do carrapato. Na Colômbia, Panamá, México e Costa Rica esta mesma doença recebe o nome de “Fiebre Manchada”, e nos Estados Unidos é conhecida como “Rocky Mountain Spotted fever” (febre maculosa das Montanhas Rochosas). *R. rickettsii* é encontrada multiplicando-se exclusivamente em células endoteliais de humanos, de alguns animais e em células de diferentes tecidos de algumas espécies de ixodídeos, os quais são vetores da doença (WEISS; MOULDER, 1984; YU; WALKER, 2003). As espécies vetoras de *R. rickettsii* para humanos, conhecidas até o momento, são: *Dermacentor andersoni*, *Dermacentor variabilis* e *Rhipicephalus sanguineus* nos Estados Unidos (DEMMA et al., 2005); *R. sanguineus* e *Amblyomma cajennense* no México (BUSTAMANTE; VARELA, 1947); *A. cajennense* no Panamá, Colômbia e Argentina (PATINO-CAMARGO, 1941; RODANICHE, 1953; PADDOCK et al., 2008); e *A. cajennense* e *Amblyomma aureolatum* no Brasil (GUEDES et al., 2005; PINTER ; LABRUNA, 2006).

Uma vez transmitida a bactéria pelo carrapato a humanos, o período médio de incubação da doença é de sete dias. Os sintomas clássicos são febre alta, cefaléia, mialgia, dor abdominal e aparecimento de manchas na pele. A letalidade em casos não tratados com antibióticos específicos (principalmente tetraciclina e cloranfenicol) pode chegar a mais de 80% (GALVÃO, 1996). No estado de São Paulo, a letalidade tem estado ao redor de 35-40% nos últimos 20 anos.

No Brasil, a febre maculosa tem sido reportada desde a década de 1920. Atualmente, casos confirmados de febre maculosa por *R. rickettsii* tem sido relatados em São Paulo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (SILVA; GALVÃO, 2004). Há também um caso confirmado na Bahia, ainda na década de 1970 (PLANK et al., 1979), e mais recentemente, de 2002 a 2006, os primeiros casos diagnosticados nos Estados de Santa Catarina (região de Blumenau), Paraná (São José dos Pinhais) e Rio Grande do Sul (região de Serro Largo) (Emanuel C. Martins, comunicação pessoal). Em nenhum desses casos, fora da região Sudeste, houve confirmação da espécie de *Rickettsia* envolvida.

1.1 História natural de *R. rickettsii*

Na América do Norte, considera-se que a *R. rickettsii* mantém seu ciclo vital na natureza, entre o carrapato vetor (*Dermacentor andersoni* e *Dermacentor variabilis*) e algumas espécies de pequenos roedores, chamadas de hospedeiros amplificadores (*Microtus pennsylvanicus*, *Pitymus pinetorum*, *Peromyscus leucopus* e *Sigmodon hispidus*) (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988). Embora a bactéria também seja transmitida hereditariamente entre gerações sucessivas de uma população de carrapatos (transmissões transovariana e transestadial), possivelmente só este mecanismo não é considerado suficiente para mantê-la ativa ao longo do tempo, uma vez que trabalhos experimentais evidenciaram que *R. rickettsii* é patogênica para algumas espécies de carrapatos como *D. andersoni*, (BURGDORFER, 1988; NIEBYLSKI et al., 1999) e *R. sanguineus* (LEVIN et al., 2009). Desta forma, o efeito amplificador que alguns animais silvestres desempenham, deve existir para garantir a manutenção na bactéria na natureza. Nesse caso, o hospedeiro amplificador mantém a bactéria em níveis altos em sua corrente sanguínea por alguns dias ou semanas, o que garante que novos carrapatos não infectados se infectem, amplificando a infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (BURGDORFER, 1988).

Nos Estados Unidos, as espécies de pequenos roedores supracitadas são consideradas os principais hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* na natureza (BURGDORFER, 1988). No Brasil, onde o principal vetor de *R. rickettsii* é o carrapato *A. cajennense*, os pequenos roedores não apresentam importância como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* para este carrapato, simplesmente, porque nenhum dos estágios parasitários de *A. cajennense* são encontrados parasitando pequenos roedores (larvas e ninfas de *A. cajennense* parasitam médios e grandes mamíferos, ao passo que adultos parasitam principalmente grandes mamíferos) (LABRUNA et al, 2005). Trabalhos recentes no Brasil constataram, pela primeira vez, que tanto gambás (*Didephis aurita*) como capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) podem funcionar como hospedeiros amplificadores da infecção por *R. rickettsii* em carrapatos *A. cajennense* (HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009) contribuindo para um melhor entendimento da ecologia de *R. rickettsii* em nosso país. Nesses trabalhos, cerca de 20% das ninfas não infectadas de *A. cajennense* que se alimentaram em gambás e capivaras experimentalmente infectados por *R. rickettsii*, adquiriram a infecção e a mantiveram para o próximo estágio evolutivo (adultos), ocorrendo portanto, a transmissão transestadial do agente.

Achados de carrapatos naturalmente infectados por *R. rickettsii* no Brasil incluem *A. cajennense* nos estados de São Paulo e Minas Gerais (MOREIRA; MAGALHÃES 1935; DIAS et al., 1937; VALLEJO-FREIRE 1946; GUEDES et al., 2005) e *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* na região da Grande São Paulo, estado de São Paulo (GOMES 1933; PINTER; LABRUNA 2006; MORAES-FILHO et al., 2009). Destes, apenas *A. cajennense* e *A. aureolatum* têm sido incriminados como vetores para humanos, sendo a primeira espécie a mais comum na região Sudeste e a segunda restrita à Grande São Paulo. Achados mais recentes de *R. sanguineus* naturalmente infectados por *R. rickettsii* (MORAES-FILHO et al., 2009) levantam suspeitas que este carrapato possa também participar como vetor para humanos, uma vez que, ainda que esporádico, o parasitismo humano por *R. sanguineus* tem sido relatado no Brasil (DANTAS-TORRES et al., 2006; LOULY et al., 2006).

Amblyomma cajennense é sem dúvida o ixodídeo responsável por quase a totalidade dos relatos de parasitismo humano por carrapatos na região Sudeste do Brasil (GUGLIELMONE et al., 2006). Por esta razão, não é surpresa que este carrapato seja o principal vetor incriminado na transmissão de *R. rickettsii* nesta região. Em estudos prévios, a transmissão transestadial de *R. rickettsii* em *A. cajennense* foi constatada apenas por Brumpt (1933), que verificou a transmissão da bactéria de ninfas para adultos. Mais recentemente, trabalhos realizados no Brasil verificaram este tipo de transmissão, além da transmissão de larvas para ninfas (LABRUNA et al., 2008; HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009). Com relação à transmissão transovariana de *R. rickettsii* em *A. cajennense*, esta nunca fora evidenciada com clareza, uma vez que, os únicos trabalhos realizados constataram a presença da bactéria em extratos de ovos e larvas oriundas de fêmeas infectadas, no entanto, essas larvas não provocaram sinais clínicos na cobaias após o repasto sanguíneo (MONTEIRO; FONSECA, 1932; MONTEIRO et al., 1932). Vale salientar que o único trabalho dos Estados Unidos que reporta infecção experimental por *R. rickettsii* em *A. cajennense* (PARKER et al., 1933), onde é demonstrada a transmissão transestadial da bactéria, lidou na verdade com carrapatos da espécie *Amblyomma imitator*, conforme esclarecido por Kohls (1958).

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com a finalidade de avaliar e quantificar a ocorrência das transmissões transovariana e transestadial de *R. rickettsii* em *A. cajennense*, verificando o efeito da infecção nos parâmetros biológicos do carrapato, e finalmente, a capacidade de larvas, ninfas e adultos transmitirem a bactéria para vertebrados.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho possui os seguintes objetivos:

- 1- Avaliar e quantificar a transmissão transovariana de *R. rickettsii* em uma colônia de *A. cajennense*.
- 2- Avaliar e quantificar a transmissão transestadial de *R. rickettsii* de larvas para ninfas em uma colônia de *A. cajennense*.
- 3- Avaliar e quantificar a transmissão transestadial de *R. rickettsii* de ninfas para adultos em uma colônia de *A. cajennense*.
- 4- Avaliar o efeito da infecção por *R. rickettsii* nos parâmetros biológicos de *A. cajennense*, quantificando as taxas de mortalidade dos diferentes estágios evolutivos, em comparação com uma colônia não infectada pela bactéria.
- 5- Avaliar a capacidade de larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense* em transmitir a bactéria *R. rickettsii* para vertebrados, durante o parasitismo.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e métodos deste trabalho serão expostos ao longo dos subtítulos 3.1 a 3.8.

3.1 Obtenção de carrapatos

Fêmeas da espécie *A. cajennense* de vida livre foram obtidas no Município de Pedreira, estado de São Paulo. O município de Pedreira é considerado uma área endêmica para febre maculosa (SANGIONI et al., 2005), portanto, os carrapatos para o presente trabalho representaram uma população incriminada na transmissão da febre maculosa para humanos. No laboratório, os carrapatos foram alimentados em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) livres de infecção por patógenos transmitidos por carrapatos. As teleóginas ingurgitadas foram acondicionadas a 27°C e 85% de umidade relativa (UR), para oviposição e obtenção de larvas. Ao final da postura, os ovos foram pesados e acondicionados em seringas plásticas, com a extremidade anterior cortada, estas foram mantidas a 27°C e 85% UR. As fêmeas (quenóginas) foram processadas pela técnica de PCR para detecção de DNA de *Rickettsia* spp (protocolo descrito abaixo no item 3.7), e somente as larvas oriundas de fêmeas negativas na PCR foram utilizadas para iniciar as infestações com carrapatos neste estudo.

3.2 Exposição de carrapatos a *R. rickettsii*

A exposição de larvas e ninfas de *A. cajennense* à bactéria *R. rickettsii* foi feita por alimentação em cobaias (*Cavia aperea porcellus*) inoculadas com a cepa Taiaçu de *R. rickettsii*, previamente isolada de carrapatos *A. aureolatum*, provenientes de Mogi das Cruzes, estado de São Paulo (PINTER; LABRUNA, 2006). A exposição de adultos de *A. cajennense* ao agente foi feita através da alimentação em coelhos inoculados da mesma forma. Para tal, cada cobaia foi inoculada no dia zero e cada coelho inoculado no dia um, pós-infestação, por via intraperitoneal, com 1 ml de suspensão de baço e cérebro oriundo de uma cobaia

anteriormente infectada por *R. rickettsii*, conforme previamente descrito (HORTA et al., 2009; LABRUNA et al., 2008). Este inóculo correspondeu a uma linhagem da cepa Taiaçu, a qual vem sendo mantida exclusivamente por passagem em animais, sem nunca ter sido passada em cultivo celular, evitando desta forma, potenciais riscos de perda de infectividade para carrapatos, conforme pode acontecer com certas linhagens mantidas em cultivo in vitro por algum tempo (LABRUNA et al., 2008).

As cobaias são indicadas para experimentos de aquisição de infecção por *R. rickettsii*, por representarem a espécie animal mais susceptível a *R. rickettsii* que se conhece (WEISS; MOULDER, 1984; MCDADE; NEWHOUSE, 1986). Os coelhos só foram utilizados para infestação dos estágios adultos, devido a não aceitação das cobaias como hospedeiro pelos mesmos, porém estes também são utilizados como fonte de infecção de riquetsias para carrapatos em outros trabalhos (MONTEIRO 1933; FREITAS et al., 2009; SOCOLOVSCHI et al., 2009c) ou como hospedeiros para ixodídeos infectados (SOCOLOVSCHI et al., 2009a; SOCOLOVSCHI et al., 2009b). No dia da inoculação, as cobaias foram infestadas com carrapatos, conforme descrito a seguir nos itens 3.2.1 e 3.2.2. Um dia após a infestação os coelhos foram inoculados, conforme descrito no item 3.2.3. Da mesma forma, todas as infestações subseqüentes com carrapatos expostos e não expostos a *R. rickettsii* foram efetuadas em cobaias, salvo a infestação dos adultos, a qual foi realizada em coelhos. Foram utilizados sempre animais adultos, do sexo masculino. Cada infestação em cobaias (figura 1) e/ou coelhos foi realizada dentro de uma câmara de pano de algodão, colada ao dorso tricotomizado do animal, através de cola específica para tecido animal (Kamar heat detector adhesive, Kamar, Steamboat Springs, CO), conforme previamente descrito (LABRUNA et al., 2008). Os animais infestados foram mantidos em gaiolas (coelhos) ou caixas (cobaias) individuais, as quais tinham fita de dupla face (5 cm de largura) colada por toda a extremidade superior interna das quarto laterais, impedindo um eventual escape de carrapatos, caso houvesse abertura acidental da câmara de infestação.

Figura 1 Cobaia com câmara de pano de algodão aderida ao dorso, A: vista frontal B: vista lateral

3.2.1 Infestação com larvas

Larvas não alimentadas e não infectadas de *A. cajennense*, com 30 dias de idade, foram levadas a infestar duas cobaias (cerca de 2500 larvas por cobaia) inoculadas com *R. rickettsii*, conforme descrito acima. As larvas ingurgitadas nessas cobaias foram recuperadas diariamente, quantificadas, e levadas a uma incubadora a 27°C e 85% UR, onde foram observadas diariamente para ecdise para ninfas. O número de larvas ingurgitadas que morreram sem fazer ecdise foi anotado. Este grupo de carrapatos, exposto a *R. rickettsii* na fase de larvas, foi denominado grupo GL.

Paralelamente, outras três cobaias não infectadas, foram infestadas com larvas da mesma origem citada acima, a fim de se formar o grupo controle (GC), não exposto a *R. rickettsii*, que foi observado da mesma forma como descrito para o grupo infectado (GL).

3.2.2 Infestação com ninfas

Ninfas não alimentadas e não infectadas de *A. cajennense*, de 30 dias de idade, foram levadas a infestar cinco cobaias (cerca de 150 ninfas por cobaia) inoculados com *R. rickettsii*, conforme descrito acima. As ninfas ingurgitadas nessas cobaias foram recuperadas diariamente, quantificadas, e levadas a uma incubadora a 27°C e 85% UR, onde foram

observadas diariamente para ecdise para adultos. O número de ninfas ingurgitadas que morreram sem fazer ecdise foi anotado. Este grupo de carrapatos, exposto a *R. rickettsii* na fase de ninfas, foi denominado grupo GN.

Paralelamente, outras ninfas dos grupos GC (controle) e do GL (exposto a *R. rickettsii* na fase de larva) foram levadas a infestar novas cobaias, sendo quatro animais para o grupo GC e cinco para o grupo GL, cada um infestado com cerca de 150 ninfas. As ninfas ingurgitadas nessas cobaias foram recuperadas diariamente, quantificadas, e levadas à incubadora a 27°C e 85% UR, onde foram observadas diariamente para ecdise para adulto. O número de ninfas ingurgitadas que morreram sem fazer ecdise foi anotado.

3.2.3. Infestação com adultos

Adultos não alimentadas de *A. cajennense* não infectados, com 30 dias de idade, foram levados a infestar dois coelhos (cerca de 10 casais por animal) inoculados com *R. rickettsii*, conforme descrito acima. As teleóginas foram recuperadas diariamente, quantificadas, pesadas em balança digital (precisão 0,001 g) e levadas a uma incubadora a 27°C e 85% UR, onde foram observadas diariamente para início do processo de oviposição. A postura total de cada quenógina foi pesada, o período de incubação foi observado, eficiência reprodutiva foi calculada (peso da postura/ peso da fêmea ingurgitada x 100) e o percentual de eclosão de cada postura foi determinado, conforme previamente descrito (PINTER et al., 2002). Este grupo de carrapatos, exposto a *R. rickettsii* na fase adulta, foi denominado grupo GA.

Paralelamente, outros carrapatos adultos dos grupos GC (controle), GL (exposto a *R. rickettsii* na fase de larva) e GN (exposto a *R. rickettsii* na fase de ninfa) foram levados a infestar novos coelhos, sendo dois animais para cada grupo, cada um infestado com cerca de 10 casais. As fêmeas ingurgitadas nesses coelhos foram recuperadas diariamente, quantificadas, pesadas, levadas à incubadora a 27°C e 85% UR e observadas diariamente para início da oviposição. A postura total de cada fêmea foi pesada, o período de incubação foi observado, a eficiência reprodutiva foi calculada (peso da postura/ peso da fêmea ingurgitada x 100), o período de incubação e o percentual de eclosão da postura foram observados conforme previamente descrito (PINTER et al., 2002).

3.2.4. Infestação com larvas de segunda geração

Após o término da postura as quenóginas foram submetidas a PCR para detecção de DNA de *Rickettsia* (protocolo descrito no item 3.7). Larvas oriundas da postura das fêmeas positivas na PCR, de todos os grupos expostos a *Rickettsia* (GL, GN e GA), foram utilizadas para infestar cobaias, bem como, larvas oriundas de fêmeas do grupo controle GC, sendo seis animais por grupo, na relação de uma cobaia para larvas oriundas de uma mesma postura. As larvas ingurgitadas nesses animais foram recuperadas diariamente, quantificadas, e levadas a uma incubadora a 27°C e 85% UR, onde foram observadas diariamente para ecdise para ninfas. O número de larvas ingurgitadas que morreram sem fazer ecdise foi anotado.

Para confirmar o contato das cobaias com amostras viáveis de *R. rickettsii* através das larvas de segunda geração, 21 dias após a infestação duas cobaias de cada um dos grupos: GC, GN, e GA, além de três animais do grupo GL foram submetidas a uma prova de imunidade, na qual as cobaias foram desafiadas com a inoculação, por via intraperitoneal, de 1 ml de suspensão de baço e cérebro originário de uma cobaia anteriormente infectada por *R. rickettsii*. Assim como feito por Monteiro e Fonseca (1932), para desafiar as cobaias expostas a riquetsia. Paralelamente, cobaias susceptíveis foram inoculadas com frações do mesmo inoculo, como controle de virulência do inoculo.

3.2.5. Infestação com ninfas de segunda geração

Ninfas não alimentadas com 30 dias de idade, oriundas das larvas de segunda geração foram utilizadas para infestar cobaias, sendo duas para cada grupo (GC, GL, GN e GA), cerca de 80 a 150 ninfas por animal. As ninfas ingurgitadas nesses hospedeiros foram recuperadas diariamente e levadas a uma incubadora a 27°C e 85% UR.

A figura 2 ilustra o esquema de infestações que foram realizadas neste trabalho para os grupos experimentais GC, GL, GN e GA.

Figura 2 Fluxograma ilustrando os procedimentos experimentais de infestações com quatro grupos experimentais (GL, GN, GA, GC) de *Amblyomma cajennense*. Os grupos GL, GN e GA foram expostos a *R. rickettsii* durante alimentação em cobaia e coelhos infectados, nas fases de larva, ninfa e adulto, respectivamente, e posteriormente criados até a próxima geração de ninfa, sempre em cobaia e/ou coelhos não infectados. O grupo GC foi o grupo controle não infectado, sempre exposto a cobaia e/ou coelhos não infectados

3.3 Sorologia dos animais para *R. rickettsii*

Todos os animais (cobaias e coelhos) utilizados no trabalho foram oriundos de biotério, sendo criados sem qualquer contato com carrapatos. Aos 21 dias após a infestação com carrapatos, o soro sanguíneo de todos eles foi testado pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) frente ao antígeno de *R. rickettsii*, conforme previamente descrito (HORTA et al., 2004, 2007). Os animais que apresentaram reação positiva na diluição de triagem (1/64), tiveram os soros testados para determinação do título final de reação (HORTA et al., 2004, 2007). Os animais que morreram antes dos 21 dias após a infestação, tiveram o soro sanguíneo coletado durante a necropsia e um fragmento dos pulmões destes animais foi colhido e processado para PCR para riquetsia, conforme descrito no item 3.7.

3.4 Avaliação clínica dos animais infestadas

Todos os coelhos e todas as cobaias infestadas tiveram sua temperatura retal aferida do dia zero ao vigésimo-primeiro dia após a infestação. Foi considerado estado febril temperaturas superiores a 39,5°C para cobaias (MONTEIRO 1931) e superior a 40,0°C para coelhos (HILLYER; QUESENBERRY 1997). A ocorrência de lesões escrotais, típicas de infecção por *R. rickettsii* em cobaias (MONTEIRO 1931), foi investigada em coelhos e cobaias.

3.5 Verificação da aquisição da infecção por *R. rickettsii* e transmissão transestadial

Após a ecdise na incubadora a 27°C e 85% de UR, foram obtidas amostras de ninfas e adultos de *A. cajennense*, oriundas de larvas e ninfas ingurgitadas, respectivamente, dos grupos GC, GL e GN. Para cada cobaia infestada, amostras de pelo menos 10 ninfas e 10 adultos não alimentados foram testados, individualmente, por PCR para verificação da

presença de DNA de *Rickettsia*, conforme descrito no item 3.7. A frequência de ninfas e adultos infectados (%) foi determinada para cada grupo experimental.

3.6 Verificação da aquisição da infecção por *R. rickettsii* e transmissão transovariana

Após alimentação dos adultos nos coelhos, as fêmeas ingurgitadas foram deixadas para oviporem na incubadora a 27°C e 85% de UR. Ao final da oviposição, as quenóginas foram todas testadas individualmente por PCR, conforme descrito no item 3.7. Para cada postura, 20 ovos frescos e escolhidos aleatoriamente foram separados, destes, pools de $\pm$ 10 ovos por fêmea foram testados pela PCR (item 3.7). Dos pools positivos, outros 10 ovos foram separados e testados individualmente. Após a eclosão das larvas, 20 larvas de 20 a 30 dias de idade foram escolhidas aleatoriamente e testadas por PCR (item 3.7) assim com descrito acima para os ovos. A necessidade de se testar tanto ovos quanto larvas se fez pela possibilidade de ovos infectados terem menor eclodibilidade que ovos não infectados.

3.7. Extração de DNA e PCR

A extração de DNA dos carrapatos foi realizada pelo protocolo isotiocianato de guanidina, conforme previamente descrito (SANGIONI et al., 2005). A extração de DNA a partir de um fragmento dos pulmões das cobaias que morreram durante a infecção foi realizada através de kit comercial (DNEasy Tissue Kit, Qiagen, USA). Para cada reação de PCR foram utilizadas amostras contendo cerca de 300 ng de DNA, previamente determinado em espectrofotômetro.

Para detecção de *Rickettsia* através de PCR, cada amostra de DNA extraído foi testada individualmente pelo protocolo de real-time PCR descrito por Labruna et al. (2004). Este protocolo utiliza um par de primers (CS5 e CS6) que amplificam um fragmento de 147 nucleotídeos do gene citrato sintase de *Rickettsia* spp, associado a uma sonda interna fluorogênica (5' 6-FAM – BHQ-1 3') de 23 nucleotídeos. Este protocolo de PCR mostrou-se sensível o suficiente para detecção de uma única cópia do gene citrato sintase de *R. rickettsii*. Ao final do experimento, algumas amostras de DNA de larvas de segunda geração dos grupos

GL, GN e GA, que se mostraram positivas no real-time PCR, foram escolhidas aleatoriamente e testadas por um protocolo de PCR convencional que amplifica um fragmento de 532-pb do gene *ompA* de riquetsias do grupo da febre maculosa, utilizando-se os primers Rr-190.70 e Rr-190.602, conforme protocolo previamente descrito (GUEDES et al., 2005). Os produtos amplificados foram seqüenciados em seqüenciador automático de DNA, conforme previamente descrito (GUEDES et al., 2005).

Para confirmar a presença de DNA e a ausência de inibidores de PCR, todas as amostras de DNA que foram negativas no PCR para *Rickettsia* foram submetidas à PCR com o par de primers: 16s +1 (5'-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3'); 16S - 1 (5' -CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T-3'), que amplifica um fragmento de $\pm$ 460-pb (pares de base) do gene 16S rRNA mitocondrial de carrapatos (MANGOLD et al. 1998). Este procedimento foi realizado para verificar presença e viabilidade do DNA extraído do carrapato e descartar possíveis falsos negativos na PCR para *Rickettsia*, assim como foi feito por Socolovschi et al. (2009b) com primers para o gene 12S rRNA.

3.8 Analise estatística.

Os dados gerados pela contabilização da mortalidade de larvas e ninfas foram avaliados com método estatístico Qui-quadrado utilizando-se o programa MINITAB 14, assumindo como diferença significativa valores de $P \leq 0,05$. Os valores dos parâmetros biológicos das fêmeas dos diversos grupos experimentais foram submetidos a análise de variância e as médias comparadas com o teste de Tukey ($P \leq 0,05$) utilizando o pacote estatístico Prisma 3.0.

4 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste estudo são descritos ao longo dos itens 4.1 a 4.10.1, apresentados abaixo.

4.1 Grupo de carrapatos expostos a *R. rickettsii* na fase de larva (GL)

As cobaias infectadas foram infestadas com as larvas que deram origem ao grupo GL (carrapatos infectados na fase de larva). Estes carrapatos, nos estágios subseqüentes foram sempre alimentados em animais livres de patógenos transmitidos por carrapatos. Os dados gerados pelas infestações de larvas, ninfas, adultos, larvas de segunda geração e ninfas de segunda geração do grupo GL, tais como, número de carrapatos recuperados, porcentagem de ixodídeos positivos por estágio, manifestações clínicas [período febril e presença de lesões escrotais (Figura 3)] dos animais infestados, bem como os títulos das reações sorológicas e o óbito dos mesmos estão apresentados na tabela 1.

Figura 3 Necrose escrotal em cobaia infectada com *Rickettsia rickettsii*

Tabela 1 Resultados de infestações de carrapatos do grupo GL de *Amblyomma cajennense*. O grupo GL iniciou-se com larvas F₁ (primeira geração de laboratório) não infectadas que foram inicialmente levadas a infestar duas cobaias (1, 2) experimentalmente infectadas com *Rickettsia rickettsii*. Os estágios subsequentes foram levados a infestar cobaios não infectados (para ninfas F₁, larvas e ninfas F₂) e coelhos não infectados (para adultos F₁)

Hospedeiro	Condição	Nº de carrapatos positivos na PCR / Nº de carrapatos não alimentados testados (%)	Número de carrapatos que se ingurgitaram	Período febril (DAI)	Lesão escrotal (DAI)	Óbito (DAI)	Título sorológico para <i>R. rickettsii</i> #
Cobaia 1	Inoculada com <i>R. rickettsii</i> e infestada com larvas F ₁	-	2.120	4 - 8	7	10	256
Cobaia 2			2.769	4 - 9	8	10	64
Cobaia 3	Infestadas com ninfas F ₁	0/20 (0)	47	10 - 16	17	não	4.096
Cobaia 4			39	13 - 17	18	não	4.096
Cobaia 5			38	9 - 12	12	14	256
Cobaia 6			56	7 - 13	não	14	2.048
Cobaia 7			43	12	não	não	4.096
Coelho 1	Infestados com adultos F ₁	9/50 (16.0)	9 ⁺	não	não	não	16.384
Coelho 2			5 ⁺	9 - 11	não	14	64
Cobaia 8	Infestadas com larvas F ₂ *	2/8 (25.0)**	23	não	não	não	<64
Cobaia 9			221	não	não	não	256
Cobaia 10			123	não	não	não	<64
Cobaia 11			N.D.	12 - 13	não	não	4.096
Cobaia 12			N.D.	não	não	não	128
Cobaia 13	Infestadas com ninfas F ₂ *	0/30 (0)	N.D.	12 - 18	não	não	2.048
Cobaia 14			N.D.	7 - 9	não	11	512
Cobaia 15			N.D.	8 - 11	não	13	<64

DAI: dias após inoculação ou infestação.

*Larvas e ninfas F₂ consistiram em carrapatos derivados de fêmeas F₁ infectadas, testadas ao final da postura.

**O processamento individual de larvas F₂ pela PCR englobou somente larvas derivadas de posturas sabidamente infectadas, através de PCR de *pool* de ovos ou larvas.

Se a cobaia morreu, seu sangue foi coletado no dia do óbito para ser testado por sorologia (imunofluorescência indireta com antígeno de *R. rickettsii*); se a cobaia não morreu, o sangue foi testado no DAI 21.

⁺ Refere-se apenas ao número de fêmeas ingurgitadas (não inclui os machos que se alimentaram com as fêmeas).

N.D.: não determinado.

4.2 Grupo de carrapatos expostos a *R. rickettsii* na fase de ninfa (GN)

As cobaias inoculadas com *R. rickettsii* foram infestadas com ninfas originando o grupo GN (carrapatos infectados na fase de ninfa). Estes carrapatos, nos estágios subsequentes foram alimentados em animais livres de patógenos transmitidos por carrapatos. Os dados gerados pelas infestações de ninfas, adultos, larvas de segunda geração e ninfas de segunda geração do grupo GN, tais como, número de ixodídeos recuperados, porcentagem de carrapatos positivos por estágio, manifestações clínicas (período febril e presença de lesões escrotais) dos animais infestados, bem como os títulos das reações sorológicas e o óbito dos mesmos estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 Resultados de infestações de carrapatos do grupo GN de *Amblyomma cajennense*. O grupo GN iniciou-se com ninfas F1 (primeira geração de laboratório) não infectadas que foram inicialmente levadas a infestar cinco cobaias (16 a 20) experimentalmente infectadas com *Rickettsia rickettsii*. Os estágios subsequentes foram levados a infestar coelhos não infectados (para adultos F1) e cobaios não infectados (para larvas e ninfas F2)

Hospedeiro	Condição	Nº de carrapatos positivos na PCR / Nº de carrapatos não alimentados testados (%)	Número de carrapatos que se ingurgitaram	Período febril (DAI)	Lesão escrotal (DAI)	Óbito (DAI)	Título sorológico para <i>R. rickettsii</i> #
Cobaia 16	Inoculada com <i>R. rickettsii</i> e infestada com ninfas F ₁	-	27	3 - 7	6	8	256
Cobaia 17			40	4 - 7	não	10	512
Cobaia 18			19	3 - 6	6	8	128
Cobaia 19			61	6 - 7	9	10	128
Cobaia 20			38	4 - 9	9	11	1.024
Coelho 3	Infestados com adultos F ₁	23/37 (62,2)	10 ⁺	10 - 17	não	não	16.384
Coelho 4			8 ⁺	9 - 15	16	18	2.048
Cobaia 21	Infestadas com larvas F ₂ *	14/23 (60,86)**	52	não	não	não	128
Cobaia 22			251	não	não	não	<64
Cobaia 23			99	não	não	não	512
Cobaia 24			N.D.	não	não	não	512
Cobaia 25			N.D.	não	não	não	512
Cobaia 26			N.D.	7 - 10	não	11	<64
Cobaia 27	Infestadas com ninfas F ₂ *	1/30 (3,3)	N.D.	não	não	11	256
Cobaia 28			N.D.	não	não	não	128

DAI: dias após inoculação ou infestação.

*Larvas e ninfas F₂ consistiram em carrapatos derivados de fêmeas F₁ infectadas, testadas ao final da postura pela PCR para *Rickettsia*.

**O processamento individual de larvas F₂ pela PCR englobou somente larvas derivadas de posturas sabidamente infectadas, através de PCR de *pool* de ovos ou larvas.

Se a cobaia morreu, seu sangue foi coletado no dia do óbito para ser testado por sorologia (imunofluorescência indireta com antígeno de *R. rickettsii*); se a cobaia não morreu, o sangue foi testado no DAI 21.

⁺ Refere-se apenas ao número de fêmeas ingurgitadas (não inclui os machos que se alimentaram com as fêmeas). N.D.: não determinado.

4.3 Grupo de carrapatos expostos a *R. rickettsii* na fase adulta (GA)

Os coelhos inoculados foram infestados com dez casais que originaram o grupo GA (carrapatos infectados na fase de adulta). Estes carrapatos, nos estágios subsequentes foram alimentados em cobaias livres de patógenos transmitidos por carrapatos. Os dados gerados pelas infestações de adultos, larvas de segunda geração e ninfas de segunda geração do grupo GA, tais como, número de carrapatos recuperados, porcentagem de ixodídeos positivos por estágio, manifestações clínicas (período febril e presença de lesões escrotais) dos animais infestados, bem como os títulos das reações sorológicas e o óbito dos mesmos estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 Resultados de infestações de carrapatos do grupo GA de *Amblyomma cajennense*. O grupo GA iniciou-se com carrapatos adultos F₁ (primeira geração de laboratório) não infectados que foram inicialmente levados a infestar dois coelhos (5 e 6) experimentalmente infectados com *Rickettsia rickettsii*. Os estágios subsequentes foram levados a infestar cobaíes não infectados (para larvas e ninfas F₂)

Hospedeiro	Condição	Nº de carrapatos positivos na PCR / Nº de carrapatos não alimentados testados (%)	Número de carrapatos que se ingurgitaram	Período febril (DAI)	Lesão escrotal (DAI)	Óbito (DAI)	Título sorológico para <i>R. rickettsii</i> #
Coelho 5	Inoculada com <i>R. rickettsii</i> e infestado com adultos F ₁	-	10 ⁺	9 – 17	não	não	64.536
Coelho 6			11 ⁺	4 - 8	não	12	<64
Cobaia 29	Infestadas com larvas F ₂ *	0/10 (0)**	540	não	não	não	<64
Cobaia 30			137	não	não	não	<64
Cobaia 31			184	não	não	não	<64
Cobaia 32			N.D.	não	não	não	<64
Cobaia 33			N.D.	9 – 11	não	12 [@]	<64
Cobaia 34			N.D.	não	não	não	<64
Cobaia 35	Infestadas com ninfas F ₂ *	0/30 (0)	N.D.	não	não	não	<64
Cobaia 36			N.D.	não	não	11 [@]	<64

DAI: dias após inoculação ou infestação.

*Larvas e ninfas F₂ consistiram em carrapatos derivados de fêmeas F₁ infectadas, testadas ao final da postura.

**O processamento individual de larvas F₂ pela PCR englobou somente larvas derivadas de uma postura sabidamente infectada, através de PCR de *pool* de ovos e de larvas.

Se a cobaia morreu, seu sangue foi coletado no dia do óbito para ser testado por sorologia (imunofluorescência indireta com antígeno de *R. rickettsii*); se a cobaia não morreu, o sangue foi testado no DAI 21.

+ Refere-se apenas ao número de fêmeas ingurgitadas (não inclui os machos que se alimentaram com as fêmeas).

N.D.: não determinado.

@ cobaia apresentou quadro agudo de diarreia, sem lesões escrotales.

4.4 Grupo de carrapatos sem exposição a *R. rickettsii* (grupo controle: GC)

Os dados referentes aos animais infestados com carrapatos livres de *R. rickettsii* em todos os estágios: larvas, ninfas, adultos, larvas e ninfas de segunda estão disponíveis na tabela 4. Os dados apresentados referem-se ao: número de carrapatos recuperados, a porcentagem de ixodídeos positivos por estágio, as manifestações clínicas (período febril e presença de lesões escrotales) dos animais infestados, bem como os títulos das reações sorológicas.

Tabela 4 Resultados de infestações de carrapatos do grupo GC de *Amblyomma cajennense*. O grupo GC iniciou-se com larvas F₁ (primeira geração de laboratório) não infectadas que foram inicialmente levadas a infestar três cobaias (37, 38, 39) não infectadas. Os estágios subsequentes foram levados a infestar cobaios não infectados (para ninfas F₁, larvas e ninfas F₂) e coelhos não infectados (para adultos F₁).

Hospedeiro	Condição	Nº de carrapatos positivos na PCR / Nº de carrapatos não alimentados testados (%)	Número de carrapatos que se ingurgitaram	Período febril (DAI)	Lesão escrotal (DAI)	Óbito (DAI)	Título sorológico para <i>R. rickettsii</i> #
Cobaia 37	Infestada com larvas F ₁	-	3.132	não	não	não	<64
Cobaia 38			2.767	não	não	não	<64
Cobaia 39			2.844	não	não	não	<64
Cobaia 40	Infestadas com ninfas F ₁	0/30 (0)	59	não	não	não	<64
Cobaia 41			44	não	não	não	<64
Cobaia 42			46	não	não	não	<64
Cobaia 43			36	não	não	não	<64
Coelho 7	Infestados com adultos F ₁	0/32 (0)	10 ⁺	não	não	não	<64
Coelho 8			10 ⁺	não	não	não	<64
Cobaia 44	Infestadas com larvas F ₂ *	0/40 (0)**	716	não	não	não	<64
Cobaia 45			243	não	não	não	<64
Cobaia 46			311	não	não	não	<64
Cobaia 47			N.D.	não	não	não	<64
Cobaia 48			N.D.	não	não	não	<64
Cobaia 49			N.D.	não	não	não	<64
Cobaia 50	Infestadas com ninfas F ₂ *	N.D.	N.D.	não	não	não	<64
Cobaia 51			N.D.	não	não	não	<64

DAI: dias após inoculação ou infestação.

*Larvas e ninfas F₂ consistiram em carrapatos derivados de fêmeas F₁ infectadas, testadas ao final da postura.

**Refere-se a 20 *pools* de ovos e 20 *pools* de larvas oriundas de 20 fêmeas ingurgitadas (1 *pool* de ovo e 1 de larva de cada fêmea).

#O sangue da cobaia foi testado no DAI 21 por sorologia (imunofluorescência indireta com antígeno de *R. rickettsii*).

⁺ Refere-se apenas ao número de fêmeas ingurgitadas (não inclui os machos que se alimentaram com as fêmeas).

N.D.: não determinado.

4.5 Efeito da infecção por *R. rickettsii* na viabilidade dos carrapatos

Os dados referentes ao número de carrapatos infestados, as proporções de carrapatos recuperadas e as proporções de carrapatos que se desenvolveram ao estágio evolutivo subsequente, dentro de cada grupo experimental (GL, GN, GA e GC), são demonstrados na tabela 5.

Tabela 5 Sucesso de alimentação e sobrevivência de larvas, ninfas e adultos de *Amblyomma cajennense* provenientes de quatro grupos experimentais, expostos a infecção por *Rickettsia rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN), adulto (GA), ou nunca expostos a infecção (GC).

Grupo de carrapatos	Nº total de carrapatos expostos	Nº carrapatos que ingurgitaram (%)	Nº de carrapatos ingurgitados que fizeram ecdise (larvas e ninfas) ou de fêmeas ingurgitadas que ovipuseram (%)
Larvas GC (F ₁)	N.D.	8.743	6.870 (78,6)a
Larvas GL (F ₁)	N.D.	4.889	1.616 (33,0)b
Ninfas GC (F ₁)	500	149 (29,8)	144 (96,6)a,b
Ninfas GL (F ₁)	550	223 (40,5)	205 (91,9)b
Ninfas GN (F ₁)	550	185 (33,6)	183 (98,9)a
Fêmeas GC (F ₁)	20	20 (100)	20 (100)a
Fêmeas GL (F ₁)	15	14 (93,3)	14 (100)a
Fêmeas GN (F ₁)	20	18 (90,0)	18 (100)a
Fêmeas GA (F ₁)	21	21 (100)	21 (100)a
Larvas GC (F ₂)	N.D.	1.570	837 (53,3)a
Larvas GL (F ₂)	N.D.	667	277 (41,5)b
Larvas GN (F ₂)	N.D.	702	355 (50,6)a
Larvas GA (F ₂)	N.D.	1.161	642 (55,3)a

N.D.: não determinado.

Letras diferentes na mesma coluna para o mesmo estágio e geração de carrapato significam proporções significativamente diferentes ($P < 0,05$).

4.6 Parâmetros biológicos das fêmeas dos quatro grupos experimentais, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN), adulto (GA), ou nunca expostos a infecção (GC)

Os parâmetros biológicos das fêmeas são apresentados na tabela 6 e demonstrados nos gráficos 1 (período parasitário), 2 (peso da fêmea), 3 (período pré-postura), 4 (peso da postura), 5 (período de incubação), 6 (eficiência reprodutiva) e 7 (percentual de eclosão da postura).

Tabela 6 Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas e seus ovos para quatro grupos experimentais de *Amblyomma cajennense*, expostos a infecção por *Rickettsia rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA.), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (GC)

Parâmetro biológico	Grupos experimentais			
	GC	GL	GN	GA
Nº de fêmeas ingurgitadas	20	14	18	21
Nº de fêmeas infectadas ⁺	0 (0)	9 (64,3)	14 (77,8)	16 (76,2)
Nº de fêmeas com TO de <i>Rickettsia</i>	0	2	6	1
Nº fêmeas com postura fértil (%)	20 (100)	13 (92,8)	17 (94,4)	20 (95,2)
Período parasitário (dias)*	9,4 ± 2,2 (7-14)a	11,5 ± 4,6 (7-24)a	10,7 ± 2,4 (7-15)a	9,7 ± 1,6 (7-12)a
Peso da fêmea (mg)*	554,1 ± 110,5 (387,7-850,5)a	413,8 ± 126,0 (99,1-539,6)b	410,7 ± 119,7 (250,7 – 602,7)b	499,6 ± 125,7 (222,5-748,4)ab
Período Pré-Postura (dias)*	7,0 ± 1,0 (5-8)a	7,2 ± 1,1(6-10)a	8,2 ± 1,6 (5-12)a	7,6 ± 1,7 (5-14)a
Peso da postura (mg)*	267,0±0,7 (184,2-442,9)a	164,2 ± 69,8 (33,1-277,5)b	169,0 ± 87,6 (42,6-301,2)b	199,4 ± 67,9 (60,9-353,6)b
ER*	48,4±7,9 (34,5-58,1)a	39,3 ± 11,7 (18,0-49,4)a	39,8 ± 14 (15,6- 58,6)a	40,6 ± 11 (13,7-53)a
Período de incubação (dias)*	34,9 ± 1,36 (31-37)a	35,9 ± 3,0 (32-43)a	35,7 ± 1,7 (33-40)a	35,2 ± 1,8 (32-38)a
% eclosão da postura	68,6±17,1 (25-90)a	46,2 ± 24,0 (0-85)ab	42,2 ± 28,3 (0-75)b	54,2 ± 25 (0-95)ab

* valores apresentados como media ± desvio padrão (amplitude entre parênteses).

TO: transmissão transovariana.

ER: eficiência reprodutiva = peso da postura peso da fêmea ingurgitada x 100.

Letras diferentes na mesma linha para grupos distintos significam proporções significativamente diferentes ($P<0,05$).

Letras iguais sobre as colunas significam ausência de proporções significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Gráfico 1 Período parasitário em dias dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle). Eixo horizontal: grupos. Eixo vertical: o período em dias

Letras diferentes sobre as colunas significam proporções significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Gráfico 2 Peso da fêmea ingurgitada em gramas dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle). Eixo horizontal: grupos. Eixo vertical: peso em gramas

Letras iguais sobre as colunas significam ausência de proporções significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Gráfico 3 Período pré-postura em dias dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle). Eixo horizontal: grupos. Eixo vertical: o período em dias

Letras diferentes sobre as colunas significam proporções significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Gráfico 4 Peso da massa de ovos em gramas dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle). Eixo horizontal: grupos. Eixo vertical: peso em gramas

Eficiência reprodutiva

Letras iguais sobre as colunas significam ausência proporções significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Gráfico 5 Eficiência reprodutiva dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle). Eixo horizontal: grupos. Eixo vertical: porcentagem

Período incubação

Letras iguais sobre as colunas significam ausência proporções significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Gráfico 6 Período de incubação em dias dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle). Eixo horizontal: grupos. Eixo vertical: o período em dias

Letras diferentes sobre as colunas significam proporções significativamente diferentes ($P < 0,05$)

Gráfico 7 Percentual de eclosão dos grupos experimentais de *A. cajennense*, expostos a infecção por *R. rickettsii* na fase de larva (GL), ninfa (GN) e adulto (GA), ou nunca expostos a *R. rickettsii* (Controle). Eixo horizontal: grupos. Eixo vertical: porcentagem

4.7 Verificação da aquisição da infecção por *R. rickettsii* e transmissão transtestadial

Os dados referentes as porcentagem de carrapatos que fizeram transmissão transtestadial de *R. rickettsii* encontram-se na tabelas 1(para os dados referentes ao grupo GL, infectado na fase de larva), tabela 2 (para o grupo GN, infectado na fase de ninfa) e tabela 3 (para os dados do grupo GA, infectado na fase de adulto). Para descartar o ocorrência de proporções de transmissão transtestadial errôneas só foram contabilizados os dados referentes aos carrapatos positivos na PCR para o gene 16S rRNA, a fim de descartar amostras que foram negativas na PCR para *Rickettsia* devido a problemas na extração ou presença de inibidores de PCR.

4.8 Verificação da aquisição da infecção por *R. rickettsii* e transmissão transovariana

Os dados referentes à porcentagem de fêmeas que fizeram transmissão transovariana, e a porcentagem de ovos e de larvas infectadas, por grupo e por fêmea são apresentados na tabela 7. Para que não ocorresse erros na proporção de ovos e larvas infectadas só foram contabilizados os dados referentes às amostras que foram positivas na PCR para o gene 16S rRNA, afim de descartar amostras que foram negativas na PCR para *Rickettsia* devido a problemas na extração ou presença de inibidores de PCR.

Tabela 7 Valores de frequência de transmissão transovariana (FTT) e de frequência de infecção da progênie (FIP) para posturas de fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* que foram expostas à infecção por *Rickettsia rickettsii* no estágio anterior de larva (grupo GL), ninfa (grupo GN) e adulto (GA)

Grupo	FTT (%)	FIP (%)	
		Ovos	larvas
GL	2/9 (22,2)	Fêmea 11: 1/10 (10,0)	Fêmea 11: 2/8 (25,0)
		Fêmea 10: 8/10 (80,0)	-
GN	6/14 (42,8)	Fêmea 7: 7/9 (77,8)	Fêmea 7: 3/10 (30,0)
		Fêmea 17: 1/4 (25)	Fêmea 17: 0/3 (0)
		Fêmea 18: 3/8 (37,5)	Fêmea 18: 10/10 (100)
GA	1/16 (6,2)	Fêmea 8: 0/10 (0)	Fêmea 8: 0/10 (0)

FTT: proporção de fêmeas infectadas que deram origem a pelo menos um ovo ou uma larva infectada, determinado por PCR em pool de ovos e/ou larvas, em relação ao total de fêmeas infectadas testadas (as fêmeas foram consideradas infectadas por se apresentarem positivas ao PCR no final do período de postura).

FIP: proporção de larvas e ovos infectados, em relação ao número total de larvas e ovos testados individualmente por PCR para cada postura positiva por PCR para *Rickettsia* de uma fêmea infectada.

4.9 Sorologia das cobaias para *Rickettsia rickettsii*

Os títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii* de cada um dos animais infestados estão apresentados nas tabelas 1, 2, 3 ou 4, referentes ao grupo que cada um destes animais fez parte. Os títulos dos animais infestados com carrapatos pertencentes ao grupo GL (infectado

na fase de larva) são apresentados na tabela 1. Os títulos dos animais infestados com carrapatos oriundos do grupo GN (infectado na fase de ninfa) são demonstrados na tabela 2. Os títulos dos animais infestados com carrapato do grupo GA (infectado na fase adulta) encontram-se na tabela 3. Os títulos dos animais parasitados por carrapatos pertencentes ao grupo GC (controle) são apresentados na tabela 4.

4.10 Avaliação clínica dos animais infestados.

O tempo, em dias, que os cobaios e os coelhos apresentaram febre, temperaturas superiores a 39,5°C para as cobaias (MONTEIRO, 1931) e superior a 40,0°C para coelhos (HILLYER; QUESENBERRY, 1997), bem com o tempo transcorrido para o surgimento de lesões escrotais e a ocorrência de óbitos são demonstrados nas tabelas correspondentes aos grupos dos quais os animais fizeram parte. Os dados clínicos dos animais infestados com carrapatos pertencentes ao grupo GL (infectado na fase de larva) estão apresentados na tabela 1. Os dados dos animais infestados com carrapatos oriundos do grupo GN (infectado na fase de ninfa) são demonstrados na tabela 2. A avaliação clínica dos animais infestados com carrapato do grupo GA (infectado na fase adulta) encontra-se na tabela 3. Os dados referentes à avaliação clínica dos animais parasitados por carrapatos pertencentes ao grupo GC (controle) são apresentados na tabela 4.

4.10.1 Avaliação clínica das cobaias submetidas a uma prova de imunidade

Todas as cobaias dos grupos CG, GN e GA, manifestaram febre, a qual iniciou entre o 3º e 6º dia pós-inoculação, com duração de um a quatro dias. Esses animais vieram a óbito entre o 8º e o 9º dia pós-exposição. No grupo GL, das três cobaias inoculadas, duas (cobaias 11 e 13 da Tabela 1) não apresentaram febre e sobreviveram ao desafio. Como é possível observar na tabela 1 estes animais apresentavam títulos altos à RIFI antes de serem desafiadas. Entretanto, todas as outras cobaias desafiadas possuíam títulos baixos à RIFI, antes de serem desafiadas e devido a isso, apresentaram manifestações clínicas condizentes com a infecção por *R. rickettsii*.

5 DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo serão discutidos ao longo dos itens 5.1 a 5.6 apresentados abaixo.

5.1 Avaliação da capacidade de ninfas de *A. cajennense* em transmitir a bactéria *R. rickettsii* para vertebrados, durante o parasitismo

As ninfas F₁ de *A. cajennense* (infectadas com *R. rickettsii* na fase de larva- GL) foram capazes de transmitir a bactéria para as cinco cobaias infestadas, uma vez que todos os animais (cobaias 3 a 7 da Tabela 1) manifestaram febre entre o 7º e 17º dia pós infestação, com duração de 1 a 6 dias. Além disso, todas as cobaias apresentaram reação sorológica positiva a *R. rickettsii* com títulos entre 256 e 4.096. Também foi possível observar lesões escrotais em três das cinco cobaias infestadas, bem como óbito em dois animais, os quais apresentaram os menores títulos: 256 e 2.048, provavelmente devido ao menor tempo para produção de anticorpos. Os fragmentos dos pulmões destes dois animais foram positivos à PCR. Horta et al. (2009) também demonstraram que ninfas de *A. cajennense* foram capazes de veicular a *R. rickettsii* para coelhos, após se infectarem como larvas que se alimentaram em gambás (*Didelphis aurita*) infectados com *R. rickettsii*.

5.2 Avaliação da capacidade de adultos de *A. cajennense* em transmitir a bactéria *R. rickettsii* para vertebrados, durante o parasitismo

Os carrapatos adultos de ambos os grupos, infectados em estágios anteriores, GL (infectado na fase de larva) e GN (infectado na fase de ninfa) foram capazes de transmitir o agente para os animais infestados. Dos dois coelhos infestados com adultos oriundos do grupo GL, um não manifestou febre (coelho 1 da Tabela 1), mas apresentou título muito alto à imunofluorescência, 16.384, o que deixa claro o contato do animal com a *Rickettsia*. O coelho

2 (Tabela 1) manifestou febre do 9º ao 11º dia, vindo a óbito no 14º dia pós-infestação. Como o soro sanguíneo foi coletado, no dia da morte do animal, este apresentou-se negativo à reação de imunofluorescência na diluição de corte de 1/64.

Quanto aos coelhos 3 e 4 (Tabela 2) infestados com carrapatos oriundos do grupo GN, ambos manifestaram febre entre o 9º e o 17º com duração de seis a sete dias, apresentaram-se positivos à imunofluorescência, com títulos de 16.384 e 2.048, respectivamente. O coelho 4 apresentou lesão escrotal no 16º, vindo a óbito no 18º dia pós-infestação. Baseado nos parâmetros clínicos e sorológicos, é possível afirmar que tanto os carrapatos infectados na fase de larva (GL), quanto os infectados na fase de ninfa (GN), foram capazes, quando adultos, de transmitir *R. rickettsii* para os coelhos, uma vez que, ou os animais manifestaram sinais clínicos da infecção por este agente ou apresentaram reação sorologia positiva frente ao antígeno (*R. rickettsii*), quando não manifestaram ambos os parâmetros. Horta et al. (2009) também demonstraram que adultos de *A. cajennense* foram capazes de veicular a *R. rickettsii* para coelhos, após se infectarem como ninfas que se alimentaram em gambás (*D. aurita*) infectados com *R. rickettsii*. Resultados semelhantes foram obtidos por Souza et al. (2009), quando as ninfas se alimentaram em capivaras infectadas com *R. rickettsii*. Monteiro e Fonseca (1932) também conseguiram comprovar a transmissão da *R. rickettsii*, por adultos de *A. cajennense*, porém com uma metodologia diferente, infectando o carrapato em uma cobaia infectada, retirando-o e levando-o a parasitar outro animal. Este processo foi repetido duas vezes, mas só obteve êxito em uma provavelmente pelo fato de nem todos os carrapatos desta espécie infectarem-se ao fazer o repasto sanguíneo em um animal infectado, como foi demonstrado por Labruna (2008), para larvas.

5.3 Avaliação da capacidade de larvas de segunda geração (F₂) de *A. cajennense* em transmitir a bactéria *R. rickettsii* para vertebrados, durante o parasitismo

Para infestação foram utilizadas seis cobaias para cada grupo, estas foram infestadas com larvas oriundas de fêmeas positivas na PCR, testadas ao final da postura. No grupo GL (infectado na fase de larva), das seis cobaias apenas quatro foram positivas na RIFI com títulos entre 128 e 4.096, destas somente duas manifestaram febre, sendo estas as cobaias com os maiores títulos (4.096 para cobaia 11 e 2.048 para cobaia 13), estes dois animais também sobreviveram à prova de imunidade.

Quanto ao grupo GN (infectado na fase de ninfa) das seis cobaias infestadas apenas quatro foram sorologicamente reativas, porém com títulos muito baixos, entre 128 e 512. A cobaia 26, da tabela 2, manifestou febre entre o 7º e o 10º dia, vindo a óbito no 11º dia, pós-infestação, apresentou-se sorologicamente negativa na diluição de corte (1/64), mas com PCR dos pulmões positivo.

Já no grupo GA (infectado na fase de adulta) das seis cobaias infestadas apenas uma manifestou febre (cobaia 33 da Tabela 3), porém este animal também manifestou um quadro de disenteria hemorrágica morrendo logo após esta manifestação, portanto, provavelmente a causa da febre e do óbito seja a gastroenterite hemorrágica, causada por um agente ainda desconhecido. Nenhum dos seis animais foram positivos à imunofluorescência na diluição de corte 1/64 e as duas cobaias submetidas à prova de imunidade manifestaram febre e vieram a óbito.

Frente aos resultados obtidos com os grupos GL e GN é possível inferir que, as larvas F₂ oriundas de tais grupos, foram capazes de transmitir a *Rickettsia* para hospedeiros vertebrados, porém em quantidades tão baixas que poucos animais tiveram sinais clínicos da infecção. Dos 12 cobaios (seis do grupo GL e seis do grupo GN), apenas três apresentaram sinais clínicos, e apenas um veio a óbito. Um total de oito animais foram positivos na RIFI, porém destes, seis apresentaram títulos baixos, entre 128 e 512. Outras três cobaias (cobaias 8 e 10 da Tabela 1 e cobaia 22 da Tabela 2), não tiveram contato com a *Rickettsia*, uma vez que não apresentaram sinais clínicos, nem ao menos sorologia positiva. Isto ocorre porque mesmo as fêmeas F₁, sendo positivas à PCR, a transmissão transovariana pode não ter ocorrido.

Quanto às larvas oriundas do grupo GA, é válido lembrar que apenas uma das fêmeas positivas fez transmissão transovariana e como a cobaia (cobaia 30 da Tabela 3) infestada com as larvas oriundas desta fêmea não apresentou qualquer alteração em seu quadro fisiológico, é provável que tais larvas não foram capazes de infectar seus hospedeiros, tanto pelo fato de haver uma pequena quantidade de larvas infectadas como também pelo fato da transmissão transovariana ter sido raro neste grupo.

Estes achados diferenciam dos relatados Freitas et al. (2009), em seu estudo com larvas de segunda geração de *Haemaphysalis leporispalustris* dos grupos GL, GN e GA, as quais foram capazes de veicular *R. rickettsii* para coelhos.

Os resultados deste trabalho também divergem dos encontrados por Monteiro e Fonseca (1932) quando os autores inocularam emulsão de 200 ovos de uma fêmea de *A. cajennense* alimentada em uma cobaia infectada, pois apesar do método de infecção ser completamente distinto, quando, no presente trabalho, foram infestadas larvas oriundas de

fêmeas infectadas na fase adulta, estas não foram capazes de provocar doença nas cobaias. Esta diferença entre os dois trabalhos pode estar no fato de que na época em que Monteiro e Fonseca realizaram seu estudo não havia respaldo molecular para garantir a ausência de infecção nos carrapatos adultos coletados a campo. Estes já poderiam ter vindo do campo infectados em estágios anteriores e assim, realizando a transmissão transovariana de forma mais eficiente, como os grupos GL e GN fizeram neste trabalho, o que estaria de acordo com os resultados encontrados, pois larvas oriundas dos grupos GL e GN foram capazes de provocar a infecção nas cobaias. Na época, a ausência de infecção era testada com a inoculação de uma amostragem de carrapatos em cobaias, como a taxa de adultos infectados está entre 16 e 60,86 %, dependendo do estágio em que ele se infectou, há a possibilidade dos carrapatos testados serem negativos e os utilizados não.

Outra hipótese é de que as cobaias, utilizadas por Monteiro e Fonseca (1932), sejam mais eficientes em infectar os carrapatos adultos que os coelhos, isso explicaria tais fatos, apesar de outros estudos utilizarem estes lagomorfos como fonte de infecção para os carrapatos com sucesso (MONTEIRO 1933, FREITAS et al., 2009 ;SOCOLOVSCHI et al., 2009c).

Monteiro e Fonseca (1932), quando inocularam a emulsão de 50 ovos de *A. cajennense* em uma cobaia, não conseguiram reproduzir a doença. Isso corrobora com nossos achados, pois a maioria das cobaias infestadas também não manifestou sinal clínico, provavelmente a quantidade de *Rickettsia* presente nas larvas seja muito pequena para provocar doença nos animais, mas suficiente para que ocorresse estimulação antigênica, levando a produção de anticorpos, os quais foram detectados na RIFI.

5.4 Avaliação da capacidade de ninfas de segunda geração (F₂) de *A. cajennense* em transmitir a bactéria *R. rickettsii* para vertebrados, durante o parasitismo

As ninfas F₂ dos grupos GL e GN foram capazes veicular *Rickettsia* para as cobaias, pois as duas cobaias do grupo GL manifestaram febre entre o 7º e o 11º dia, vindo a óbito no 11º e no 13º dia pós-infestação, estes animais foram positivos à PCR, entretanto não apresentaram lesões escrotais e manifestaram títulos muito baixos na RIFI, de 512 para cobaia 14 e menor que 64 para cobaia 15 (Tabela 1), provavelmente devido ao pouco tempo para produção de anticorpos.

Quanto aos carrapatos do grupo GN nenhuma das duas cobaias apresentaram febre ou necrose escrotal, porém uma delas veio a óbito no 11º (cobaia 27, Tabela 2). Os títulos destes animais à RIFI foram de 256, para cobaia 27, que morreu, e de 128 para a outra cobaia (cobaia 28, Tabela 2), o que sugere que este animal teve contato com uma carga bacteriana baixa.

Estes achados sugerem, que as ninfas de segunda geração do grupo GN, são parcialmente eficientes em transmitir *R. rickettsii*, pois uma das cobaias apresentou apenas reação sorológica positiva e com títulos muito baixos. Já as ninfas do grupo GL foram mais eficientes na transmissão do agente para as cobaias, uma vez que as cobaias deste grupo manifestaram sinais clínicos da infecção, porém estes sinais foram mais brandos e com títulos menores que os encontrados na infestação com ninfas de primeira geração. Freitas et al. (2009) também demonstrou que ninfas de segunda geração de *H. leporispalustris* dos grupos GL e GN foram capazes de infectar coelhos, porém sem esta diferença na eficiência entre grupos.

As ninfas oriundas do grupo GA foram incapazes de veicular *R. rickettsii* para os cobaias, pois estas não apresentaram sinais da infecção, nem ao menos reação sorológica positiva. A cobaia 36 (Tabela 3) veio a óbito, porém apresentando uma hemorragia gastrointestinal, a qual provavelmente seja a causa da morte deste animal. O grupo GA neste estudo apresentou resultados diferentes dos encontrados por Freitas et al. (2009) com *H. leporispalustris*, quando ninfas oriundas de carrapatos infectados na fase adulta foram capazes de transmitir *R. rickettsii* para os coelhos, causando-lhes sinais clínicos da infecção, além destes apresentarem resultado positivo a RIFI com títulos de 1.024.

5.5 Avaliação da transmissão transtadiária de *R. rickettsii* de larvas para ninfas.

Após a ecdise de larva para ninfa, 20 exemplares não alimentadas, do grupo GL foram submetidas individualmente à PCR, porém nenhuma das amostras foi positiva. É válido ressaltar que apenas foram consideradas negativas as amostras positivas na PCR para o gene 16S rRNA mitocondrial. Porém, os animais infestados com estas ninfas manifestaram alterações clínicas condizentes com infecção por *R. rickettsii* e reação sorológica positiva, além disso 16% dos adultos deste grupo foram positivos à PCR, o que comprova a transmissão transtadiária, neste grupo.

Provavelmente a porcentagem de ninfas infectadas na população total de ninfas, deste grupo, seja inferior a 5%, pois na amostragem de 20 ninfas não houve uma ninfa infectada. Horta et al. (2009) relatou porcentagens de 10 a 17,1% de transmissão transestadial de *R. rickettsii* de larvas para ninfas de *A. cajennense*, quando as larvas se alimentaram em gambás (*Didelphis aurita*) infectados por *R. rickettsii*. Labruna et al. (2008) encontrou um percentual superior de ninfas de *A. cajennense* infectadas por *R. rickettsii*, entre 10 e 60%, quando as larvas se alimentaram em cobaias infectadas por *R. rickettsii*. Neste mesmo estudo, a porcentagem de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* e *A. aureolatum* infectadas ficou entre 80 e 100 %, valores muito superiores aos encontrados no presente trabalho. Porém, Labruna et al. (2008) utilizou duas diferentes colônias de *A. cajennense* em sua pesquisa (Colônia Pirassununga e Colônia Pedreira), obtendo assim, um percentual entre 10 e 60% das ninfas infectadas. Caso sejam considerados apenas os resultados obtidos com a colônia de Pedreira, (mesmo local onde foram coletados os carrapatos que deram início ao presente trabalho) o percentual ficaria entre 5 e 25%, resultados este, mais próximo ao encontrado neste experimento. Freitas et al. (2009) testou ninfas alimentadas *H. leporispalustris*, que haviam sido infectadas com *R. rickettsii*, na fase de larva encontrou um percentual transmissão transestadial para ninfas de 8%, resultado este, próximo ao encontrado com ninfas de *A. cajennense*, neste trabalho e por Labruna et al. (2008) e Horta et al. (2009).

Para avaliar a transmissão transestadial de larvas de segunda geração para ninfas, 30 ninfas de cada grupo (GL, GN e GA) foram testadas individualmente por PCR. Nenhuma das 30 ninfas do grupo GL foi positiva à PCR, porém as cobaias infestadas com ninfas deste grupo manifestaram sinais clínicos da infecção. Provavelmente a quantidade de ninfas infectadas no total de ninfas deste grupo seja inferior a 3,3%. No grupo GN, das 30 ninfas testadas, uma foi positiva (3,3%). Freitas et al. (2009), ao realizar experimento semelhante com *H. leporispalustris*, encontrou 12,5% das ninfas de segunda geração do grupo GL infectadas e 10% das ninfas oriundas do grupo GN. Freitas et al. (2009) encontraram porcentagens significativamente superiores às encontradas com *A. cajennense*, provavelmente devido a baixa taxa de transmissão transovariana nesta espécie e a sua refratariedade a infecção pela *R. rickettsii*.

As larvas de segunda geração pertencentes ao grupo GA, não fizeram transmissão transestadial da *R. rickettsii* para as ninfas, provavelmente devido a transmissão transovariana ter sido rara neste grupo experimental. Estes achados divergem dos publicados por Freitas et al. (2009) que encontrou 8% das ninfas, deste grupo, infectadas.

Outros autores avaliaram a transmissão de *Rickettsia* ao longo das gerações de carrapatos, a partir de fêmeas naturalmente infectadas. Matsumoto et al. (2005) encontraram 100% das ninfas de segunda geração de *R. turanicus* infectadas por *Rickettsia massiliae* e Socolovschi et al. (2009a), encontraram 100% da terceira geração de ninfas de *R. sanguineus* infectados com *Rickettsia conorii conorii*.

As ninfas de segunda geração de *A. cajennense* do presente estudo apresentaram uma taxa de infecção muito aquém das observadas nos trabalhos de Matsumoto et al. (2005) e Socolovschi et al. (2009a), fato este, possivelmente relacionado à refratariedade que este carrapato apresenta a infecção pela *R. rickettsii*, já comprovada por Labruna et al. (2008) ao compará-lo com outras espécies de ixodídeos, o que ressalta a importância de hospedeiros amplificadores para manutenção da *Rickettsia* nesta espécie de carrapato (SOUZA et al., 2009; HORTA et al., 2009).

5.3 Avaliação da transmissão transestadial de *R. rickettsii* de ninfas para adultos

Dos 50 adultos do grupo GL, testados na PCR nove (16%) foram positivos. No grupo GN, dos 37 adultos testados 23 foram positivos (62,2%). Estes carrapatos também foram capazes de infectar coelhos livres de patógenos. O grupo GL apresentou resultado semelhante ao encontrado por Souza et al. (2009), no qual 20 e 25% dos adultos infectados na fase de ninfa foram positivos, e aos publicados por Freitas et al. (2009), que ao testar adultos de *H. leporispalustris* expostos a *R. rickettsii* na fase de larva, encontrou 22,5% destes infectados. Já quando estes autores testaram adultos infectados na fase de ninfa, encontraram uma porcentagem inferior a demonstrada neste trabalho, de apenas 40%. Souza et al. (2009) encontraram 30 a 35% dos adultos infectados, expostos a *R. rickettsii* pela alimentação no estágio ninfal em capivaras inoculadas. Horta et al. (2009) demonstraram que 20% das ninfas infectadas em gambás inoculados fizeram transmissão transestadial para adulto.

Souza et al. (2009), Freitas et al. (2009) e Horta et al. (2009) encontraram porcentagens inferiores de adultos GN infectados, mesmo utilizando inoculos iguais de *R. rickettsii* (cepa Taiaçu, PINTER; LABRUNA, 2006). Provavelmente isto ocorra devido a particularidades associadas aos hospedeiros utilizados como fonte de infecção.

Vários autores encontraram porcentagem altas, de 100%, dos adultos de segunda geração infectados por *Rickettsia*, dentre eles: Socolovschi et al. (2009a), que encontrou

100% dos adultos de *R. sanguineus* infectados com *R. conorii conorii*, Socolovschi et al. (2009b) com 100% das fêmeas de *Amblyomma variegatum* positivas para *Rickettsia africae*. Da mesma forma, Matsumoto et al. (2005) encontraram 100% dos adultos *Rhipicephalus turanicus*, expostos a *R. massiliae*, positivos no teste de hemolinfa. Estes resultados são consideravelmente superiores aos encontrados para *A. cajennense* exposto à *R. rickettsii*, o que sugere diferentes interações existentes entre determinadas espécies de *Rickettsia* e os carrapatos.

5.4 Avaliação da transmissão transovariana de *R. rickettsii*.

A progênie de todas as fêmeas dos grupos (GL, GN, GA e GC) foram testadas para presença de *R. rickettsii*, em pools de ± 10 ovos ou ± 10 larvas. Os pools positivos foram testados individualmente. É válido ressaltar que só foram contabilizadas as amostras negativas, que foram positivas na PCR para o gene 16S rRNA.

Das nove queóginas positivas do grupo GL, duas (22,2%) infectaram a progênie. No grupo GN seis (42,8%) das 14 fêmeas fizeram transmissão transovariana. No grupo GA apenas uma (6,2%) das 16 fêmeas infectou o pool de ovos e larvas. Price (1954) afirmou que 30 a 40% das fêmeas de *Dermacentor variabilis*, infectaram a progênie, esses valores são próximos aos encontrados no grupo GN, já Burgdorfer (1963) e Matsumoto et al. (2005), encontraram proporções mais elevadas, este último, em seu estudo demonstrou que 100% das teleóginas de *R. turanicus* infectaram sua prole com *R. massiliae* e Burgdorfer (1963) relatou que 40 (93,%) de 43 fêmeas de *D. andersoni* infectaram seu ovos com *R. rickettsii*.

Dez ovos de cada uma das duas fêmeas, que fizeram transmissão transovariana, do grupo GL foram testados individualmente e apresentaram porcentagens de infecção de 10% e 80%. Das seis fêmeas do grupo GN que realizaram transmissão transovariana, três tiveram os ovos testados individualmente e foram capazes de transmitir *Rickettsia* para 77,8%, 25% e 37,5% dos ovos.

No grupo GL, 25% das larvas foram infectadas, enquanto o grupo GN apresentou percentuais de 30%, 0% e 100% das larvas infectadas. Considerado a soma total (ovos e larvas) da progênie de cada grupo, é possível afirmar que as fêmeas, que fizeram transmissão transovariana, do grupo GL infectaram 39,3% da sua progênie e que as do grupo GN infectaram 54,54% da sua produção de ovos e larvas.

A fêmea 8 do grupo GA apresentou pools de ovos e de larvas positivos à PCR, porém estes quando testados individualmente não apresentaram nenhuma larva ou nenhum ovo infectado. Isto leva a crer que menos de 5% de sua prole esteja infectada.

Vários autores já relataram transmissão transovariana de *Rickettsia* em proporções de 100% da progênie infectada (BURGDORFER 1963; BURGDORFER et al. 1978; REHACEK 1984; MACALUSO et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2005; SOCOLOVSKI et al., 2009a,c). Burgdorfer (1963) trabalhou com *D. andersoni* infectado com *Rickettsia rickettsii* e em 1978 ele estudou *Rickettsia rhipicephali* em *R. sanguineus*. Rehacek (1984) pesquisou a *Rickettsia slovacica* em *Dermacentor marginatus*, já Macaluso et al. (2002) trabalharam com *D. variabilis* infectado com *Rickettsia montanensis*. Matsumoto et al. (2005) estudaram a permanência de *R. massiliae* em *R. turanicus* e finalmente, Socolovski et al. (2009a) trabalharam com *R. sanguineus* infectados com *R. conorii conorii* e Socolovski et al. (2009b) pesquisaram *R. africae* em *A. variegatum*. Alguns destes autores também avaliaram a infecção filial (proporção de ovos ou larvas infectados obtidos de uma fêmea infectada). Matsumoto et al. (2005) relataram uma proporção de 98,5% e Socolovski et al. (2009c) de 93,4%.

Um dos primeiros estudos sobre transmissão transovariana no Brasil foi realizado por Monteiro e Fonseca (1932), no qual a partir da inoculação da emulsão de ovos em cobaias os autores levantam a hipótese de transmissão transovariana no *A. cajennense*. No presente trabalho esta hipótese é comprovada pela primeira vez em *A. cajennense* por técnicas moleculares e biológicas, através de alimentação de larvas oriundas de fêmeas infectadas. O percentual da progênie de *A. cajennense* infectada é bem inferior aos encontrados nos trabalhos citados acima, sugerindo que as teleóginas desta espécie sejam menos eficientes em passar esta bactéria para sua prole e que o *A. cajennense* é mais refratário a infecção por *Rickettsia*, que as espécies citadas anteriormente. Porém Freitas et al. (2009) encontraram proporções ainda menores de larvas de segunda geração infectadas de *H. leporispalustris*, 1,7 % das larvas não alimentadas e 12,4% das larvas alimentadas, oriundas do grupo GL. No grupo GN, de seu estudo, Freitas et al. (2009) encontraram de 2,5 a 14% das larvas infectadas.

Quando Freitas et al. (2009) avaliaram a transmissão transovariana no grupo GA, encontraram uma infectividade baixa, entre 2 e 4% das larvas infectadas, resultado este semelhante ao encontrado neste trabalho, pois provavelmente a infecção na prole do grupo GA seja inferior a 5%. A infecção da progênie do grupo GA é menor provavelmente porque, segundo Burgdorfer e Brinton (1975), a quitinização da membrana vitelínica no *D. andersoni*, inicia entre 3 e 6 dias após o início da alimentação das fêmeas. Isto não permitiria a entrada da

Rickettsia nos oocitos, porém este processo não é sincronizado, o que possibilita a entrada da *Rickettsia* apenas nos últimos ovos a realizarem este processo. Este empecilho não ocorreu nos outros grupos GL e GN, pois tiveram contato com a *R. rickettsii* em estágios anteriores, explicando o fato da porcentagem de fêmeas que fizeram transmissão transovariana e a porcentagem da prole infectada serem superiores nestes grupos.

5.5 Avaliação dos efeitos da infecção por *R. rickettsii* nos parâmetros biológicos de *A. cajennense*.

Conforme demonstra a tabela 5, houve uma maior mortalidade de larvas do grupo GL de primeira e segunda geração. As ninfas do grupo GL apresentaram uma mortalidade significativamente maior que as ninfas do grupo GN, mas não significativamente maior que as do grupo GC. Todos os parâmetros biológicos das fêmeas infectados foram alterados de forma negativa, porém os que apresentaram significância estatística foram: peso da fêmea ingurgitada, peso da postura e porcentagem de eclosão da postura.

Socolovschi et al. (2009c) encontraram uma mortalidade de larvas de *R. sanguineus* infectadas com *R. conorii conorii* entre 3,2 e 56,8%, porém sem apresentar dados de um grupo controle. Niebylski et al (1999) publicaram uma mortalidade de larvas de *D. andersoni* infectados com *R. rickettsii* de 94,1%. Já Levin et al. (2009) demonstraram que apenas 16 a 18% das larvas de *R. sanguineus* infectadas com *R. conorii* fizeram a muda para ninfa. Em Labruna et al. (2008), a mortalidade de larvas de *A. cajennense* infectadas com *R. rickettsii* ficou entre 4,2 e 34,2%, enquanto que neste trabalho, a mortalidade foi de 67% para o grupo GL e de 21,4% para o grupo controle. Também foi observada uma maior mortalidade de larvas de segunda geração do grupo GL (41,5%) em comparação aos grupos GC, GN e GA. Esses achados comprovam a patogenicidade da *R. rickettsii* para o estágio larval de *A. cajennense*.

A sobrevivência de ninfas do grupo GC não foi significativamente maior que a do grupo GL e foi menor que a apresentada pelo grupo GN, o que indica que a *R. rickettsii* não é maléfica para este estágio evolutivo de *A. cajennense*. Estes resultados vão de encontro aos relatados por Matsumoto et al. (2005) e Freitas et al. (2009), que não encontraram efeito patogênico da infecção por *Rickettsia* nos estágios evolutivos de *R. turanicus* e *H. leporispalustris*, respectivamente.

A maioria das fêmeas dos grupos infectados realizaram o repasto sanguíneo com sucesso, GL (93,3%) GN (90%) e GA (100%), ao contrario das observações de Niebylski et al. (1999) em que apenas 30% das fêmeas ingurgitaram. Todas as fêmeas dos grupos infectados ovipuseram enquanto que apenas 66,6% das fêmeas de *D. andersoni* infectados com *R. rickettsii* fizeram postura (NIEBYLSKI et al., 1999) Os parâmetros biológicos observados por Niebylski et al. (1999) (número de fêmeas que ingurgitaram com sucesso e percentual de fêmeas que ovipuseram) foram pouco ou não afetados pela exposição a *R. rickettsii*, no presente trabalho. Infelizmente esses autores não avaliaram o peso da teleógina, peso da postura e porcentagem de eclosão da postura, parâmetros estes, significativamente alterados nos grupos infectados. Contudo é possível afirmar que *R. rickettsii* afeta as larvas e as teleóginas de *A. cajennense*, porém sua infecção afeta menos *A. cajennense* do que parece afetar *D. andersoni* (NIEBYLSKI et al., 1999) e *R. sanguineus* (Levin et al., 2009). Obviamente, este menor efeito patogênico observado em *A. cajennense* é influenciado pela refratariedade parcial que este carrapato apresenta a esta bactéria, ou seja, muitas fêmeas não foram afetadas simplesmente porque não estavam infectadas por *R. rickettsii*.

5.6 Considerações finais

Baseado na compilação dos dados obtidos é possível concluir que larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense* são capazes de veicular *R. rickettsii* para hospedeiros vertebrados, porém, as larvas e ninfas de segunda geração dos grupos GL e GN são pouco eficientes em transmitir este agente para as cobaias, a exceção seriam os estágios imaturos de segunda geração oriundas do grupo GA, que não transmitiram *R. rickettsii*.

A transmissão transtadial foi observada de larvas F₁ para ninfas F₁, bem como para adultos, além de larvas F₂ para ninfas F₂, baseando-se tanto nos resultados da PCR, quanto nos sinais clínicos e RIFIs dos animais infestados. Pela primeira vez a existência de transmissão transovariana de *R. rickettsii* no *A. cajennense* foi comprovada por técnicas moleculares e biológicas.

Quanto aos efeitos da infecção por *R. rickettsii* no *A. cajennense*, foi possível afirmar que tal infecção aumenta a mortalidade de larvas F₁, mas não pare ter efeito sobre as ninfas. Também foi demonstrado pela primeira vez que a infecção por *R. rickettsii* é maléfica para

teleóginas, alterando de forma significativa o peso da fêmea ingurgitada, peso da postura e porcentagem de eclosão da postura, este ultimo parâmetro apenas no grupo GN.

Portanto, as baixas porcentagens transmissão transestadial e transovariana da *R. rickettsii* no *A. cajennense* aliadas a uma maior mortalidade de larvas e aos efeitos nocivos desta bactéria produção de ovos das fêmeas infectadas, poderiam explicar porque é difícil encontrar um exemplar de *A. cajennense* naturalmente infectado por *R. rickettsii* na natureza, assim como demonstrou Pacheco et al. (2009) ao investigar a ocorrência de *Rickettsia* em 3.545 carrapatos desta espécie no estado de São Paulo.

Levando em consideração o fato de que algumas espécies de carrapatos podem perder a infecção por *Rickettsia* ao longo das sucessivas gerações, como observado por Macaluso et al. (2002) com *D. variabilis* infectado com *R. rhipicephali*, é válido ressaltar a importância dos hospedeiros amplificadores em uma espécie como o *A. cajennense* (SOUZA et al., 2009; HORTA et al., 2009), que apresenta um baixo percentual de indivíduos infectados, devido aos fatores anteriormente exposto, mesmo assim está é a principal espécie vetora de *R. rickettsii* no Brasil (GUEDES et al., 2005), devido a grande incidência de parasitismo em humanos (GUGLIELMONE et al., 2006).

6 CONCLUSÕES

1- *R. rickettsii* é transmitida por transmissão transovariana em *A. cajennense*, porém somente em porcentagens muito baixas, desde que a fêmea ingurgitada tenha se infectado na fase de larva ou ninfa. Quando a fêmea se infecta no próprio estágio adulto, a transmissão transovariana é praticamente ausente. De qualquer forma, mesmo se infectando no estágio de larva ou ninfa, a transmissão transovariana, naquela mesma geração, ocorrerá em apenas uma minoria de fêmeas ingurgitadas infectadas.

2- *R. rickettsii* é mantida por transmissão transestadial de larva para ninfa de *A. cajennense* em apenas uma parcela dos carrapatos que foram expostos a *R. rickettsii* na fase de larva.

3- *R. rickettsii* é mantida por transmissão transestadial de ninfa para adulto de *A. cajennense* em apenas uma parcela dos carrapatos que foram expostos a *R. rickettsii* na fase de ninfa.

4- A infecção por *R. rickettsii* nos diferentes estágios evolutivos de *A. cajennense* exerce um efeito patogênico nas fases de larva e fêmea, retratada por uma maior mortalidade de larvas ingurgitadas e menor performance reprodutiva de fêmeas ingurgitadas. O estágio ninfal não é afetado de forma significativa.

5- Tanto larvas, ninfas e adultos de *A. cajennense* apresentam competência vetorial para *R. rickettsii*.

REFERÊNCIAS

BRUMPT, E. Transmission de la fièvre pourprée des Montagnes rocheuses par la tique américaine *Amblyomma cajennense*. **Comptes Rendues des Seances de la Societé de Biologie**, v. 144, p. 416-419, 1933.

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

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

BURGDORFER, W., BRINTON, L. P.; KRINSKY, W. L.; PHILIP, R. N. *Rickettsia rhipicephali*, a new spotted fever group *Rickettsia* from the brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus*, In: KAZAR, J.; ORMSBEE, R. A.; TARASEVICH, I. N. (ed.), **Rickettsiae and rickettsial diseases**. House of the Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Czechoslovakia: Publishing 1978. p. 307-316.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rock Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D.H. **Biology of rickettsial diseases**. Boca Raton: 1988. CRC Inc, v. 1, p. 33-50.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribuicion de las rickettsias en Mexico. **Revista del Instituto de la Salub y Enfermedades Tropicales**, v. 8, p. 3-14, 1947.

DANTAS-TORRES, F.; FIGUEIREDO, L. A.; BRANDÃO-FILHO, S. P. *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae), the Brown dog tick, parasitizing humans in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n. 1, p. 64-67, 2006.

DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON JR, J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New England Journal Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.

DIAS, E.; MARTINS, A.; RIBEIRO, D. J. Thypho exanthematico no Oeste de Minas Gerais. **Brasil-Medico**, v. 51, n. 24, p. 651-655, 1937.

FREITAS, L. H. T.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M. B.; Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages. **Experimental and Applied Acarology**, v. 47, p. 321-345, 2009.

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

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

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

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

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

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

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

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

KOHL, G. M. *Amblyomma imitator*, a new species of tick from Texas and Mexico, and remarks on the synonymy of *A. cajennense* (Fabricius) (Acarina-Ixodidae). **Journal Parasitology**, v. 44, p. 430-433, 1958.

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

LABRUNA, M. B.; OGRZEWSKA, M.; MARTINS, T. F.; PINTER, A.; HORTA, M. C. Comparative susceptibility of the larval stage of *Amblyomma aureolatum*, *Amblyomma cajennense*, and *Rhipicephalus sanguineus* to the infection by *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 6, p. 1156-1159, 2008.

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 São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, p. 90-98, 2004.

LEVIN, M. L.; KLLMASTER, L.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. Effects of *Rickettsia conorii* infection on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* tick. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 15, p. 277-278, 2009. supplement 2.

LOULY, C. C. B.; FONSECA, I. N.; OLIVEIRA, V. F. B.; ORGES, L. M. F. Ocorrência de *Rhipicephalus sanguineus* em trabalhadores de clínicas veterinárias e canis, no Município de Goiânia, GO. **Ciência Animal Brasileira**, Goiânia, v. 7, n. 1, p. 103-106, 2006.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of second *Rickettsia*. **Journal of medical Entomology**, v. 39, p. 809-813, 2002.

MANGOLD, A.J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, p.478–484, 1998.

MATSUMOTO, K.; OGAWA, P.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Transmission of *Rickettsia massiliae* in the tick, *Rhipicephalus turanicus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 19 p. 263-270,2005

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

MONTEIRO, J. L. Comportamento Experimental do Coelho aos virus do typho Exanthema'tico de São Paulo e da febre maculosa das Montanhas Rochosas. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 8, n. 3, p. 80, 1933.

MONTEIRO, J. L. Estudos sobre o typho exanthematico de S. Paulo. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 6, p. 5-135, 1931.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F. Typho exanthematico de S. Paulo – Novas experiências sobre transmissão experimental por carrapatos (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). **Memórias do Instituto Butantan**, v. 7, p. 33-40, 1932.

MONTEIRO, J. L.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho endêmico de São Paulo – VI. Pesquisas sobre a possibilidade da transmissão experimental do vírus por Ixodidae. **Brasil Médico**, v. 46, n. 3, p. 49-52, 1932.

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

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

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 – 338, 1999.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; PINTER, A.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; NARDI, M. S.; SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; SZABÓ, M. P. J.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Pesquisa de *Rickettsia* spp em carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* no Estado de São Paulo, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 42, n. 3, p. 351-353, 2009.

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

PARKER, R. R.; PHILIP, C. B.; JELLISON, W. L. Rocky Mountain spotted fever: potentialities of tick transmission in relation to geographical occurrence in the United States. **Americam Journal Tropical Medicine and Hygiene**, v. 13, p. 341-378, 1933.

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

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

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy Science**, 2006 (in press).

PLANK, S. J.; TEIXEIRA, R. S.; MILANESI, M. L. Febre maculosa em Salvador: descrição de um caso. **Revista Médica da Bahia**, v. 25, p. 330-334, 1979.

PRICE, W. H. The epidemiology of Rocky Mountain spotted fever. II Studies on the biological survival mechanism of *Rickettsia rickettsii*. **American journal of hygiene**, v. 60, p. 292-319, 1954.

REHACEK, J. *Rickettsia slovaca*, the organism and its ecology. **Acta Scientiarum Naturalium Academiae Scientiarum Bohemoslovacae Brno**, v. 18, p. 1-50, 1984.

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

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

SILVA, L. J.; GALVÃO, M. A. M. Epidemiologia das rickettsioses do gênero *Rickettsia* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 13, p. 197-198, 2004.

SOCOLOVSKI, C.; BITAM, I.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Transmission of *Rickettsia conorii* in naturally infected *Rhipicephalus sanguineus*. **Journal Compilation**, v. 15, p. 319-321, 2009a. Supplementum 2.

SOCOLOVSCHI, C.; HUYNH, T. P.; DAVOUST, B.; GOMEZ, J.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Transovarial and trans-stadial transmission of *Rickettsia africae* in *Amblyomma varegatum* ticks. **Journal Compilation**, v. 15, p. 317-318, 2009b. Supplementum 2

SOCOLOVSCHI, C.; MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* with *Rickettsia conorii conorii*, **Journal Compilation** v15, p. 324-325, 2009c. suplemento 2.

SOUZA, C.; MORAES-FILHO, J.; SOUZA, S.; OGRZEWALSKA, M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of capybaras *Hydrochaeris hydrochoerus* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**. v.16, p. 116–121, 2009

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

WEISS, E; MOULDER, J. W.; The Rickettsias and Chlamydias. In KREIG, N.R.; HOLT, J.G. (Ed.). **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984, v. 1, p. 687-739.

YU, X. J.; WALKER, D. H.; The order rickettsiales. In: DWORKIN, M, (Ed.). **The Prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiology community 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2003. Disponível em <http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>. 27 set. 2008.