MONIZE GERARDI

Perfil genético e susceptibilidade
de diferentes populações do carrapato
Amblyomma sculptum à infecção pelo patógeno
Rickettsia rickettsii

São Paulo

2016

MONIZE GERARDI

**Perfil genético e susceptibilidade
de diferentes populações do carrapato
Amblyomma sculptum à infecção pelo patógeno
*Rickettsia rickettsii***

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

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de Concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador:

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna

São Paulo

2016

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

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

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

T.3338
FMVZ

Gerardi, Monize

Perfil genético e susceptibilidade de diferentes populações do carrapato *Amblyomma sculptum* à infecção pelo patógeno *Rickettsia rickettsii* / Monize Gerardi. -- 2016.
140 f. : il.

Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2016.

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

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna.

1. *Rickettsia rickettsii*. 2. *Amblyomma sculptum*. 3. Perpetuação transtadial. 4. Transmissão transovariana. 5. Análise filogenética. I. Título.

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Perfil genético e susceptibilidade de diferentes populações do carrapato *Amblyomma cajannense* à infecção pelo patógeno *Rickettsia rickettsii*", protocolado sob o nº 3104/2013, utilizando 180 (cento e oitenta) cobaias e 86 (oitenta e seis) coelhos, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, foi aprovado em reunião de 14/8/2013 e está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.

We certify that the Research "Genetic profile and susceptibility of different populations of the tick *Amblyomma cajannense* to the infection by the pathogen *Rickettsia rickettsii*", protocol number 3104/2013, utilizing 180 (one hundred and eighty) guinea pigs and 86 (eighty-six) rabbits, under the responsibility Marcelo Bahia Labruna, was approved in the meeting of day 8/14/2013 and agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Ethic Committee in the Use of Animals of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo.

São Paulo, 3 de maio de 2016.

Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: GERARDI, Monize

Título: **Perfil genético e susceptibilidade de diferentes populações do carrapato *Amblyomma sculptum* à infecção pelo patógeno *Rickettsia rickettsii***

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

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

*À minha mãe Margarete (in memoriam) e à
minha avó Maria (in memoriam) que, mesmo em
meio a tantas dificuldades, me deram a base ética
responsável por me trazer até aqui.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me permitir o encontro de caminhos e pessoas nesta jornada, os quais me proporcionaram grande crescimento pessoal e espiritual.

A toda a minha família, tios e primos, que tanto me estimulam e incentivam. Especialmente, ao “papai” Reinaldo, meu tio-padrinho que faz o verdadeiro papel de pai em minha vida; e ao meu marido, Breno, pelo apoio, pela paciência e por ser essa pessoa maravilhosa, uma verdadeira luz.

Ao professor Marcelo, pela confiança, orientação e os mais diversos ensinamentos, que não ficaram somente no profissional, mas também em aprendizado que levarei para toda a vida.

Ao professor Fábio, por toda ajuda com as análises filogenéticas, prestatividade, conselhos e todas as instruções passadas.

Aos amigos de laboratório, que se tornam família com o passar dos anos. Foram muitos momentos de trabalho, de descontração, de risos e choros que passamos juntos, o que certamente resultou em aprendizado técnico e pessoal. Amália, Eveline, Adne, Sol, Andréa, Vanessa, Caroline, Tati, Natália, Juliana Abreu, Karinne, Fernanda Gonsales, Thiago, Igor, Sebastian, Marcos, Francisco, Diego, Jairo, Jonas, Herbert, Hector, João Fábio, Fernanda Nieri e Arlei, muito obrigada por cada momento que passamos. Em especial, aos amigos Alejandro, Lina e Felipe, colaboradores na execução do trabalho e à Isabella, pela ajuda na construção do mapa. E ao amigo Danilo (*in memoriam*), que rapidamente passou por minha vida, mas que deixou sua sutileza e ternura como ensinamentos.

A todos os docentes e funcionários (técnicos, secretários, motoristas) da Universidade que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Aos professores, agradeço a oportunidade de aprendizado em cada disciplina cursada. Aos funcionários e secretários, agradeço por toda ajuda e também pela amizade construída ao longo destes anos. Em especial, ao técnico Pedro, sempre atencioso conosco e com os animais, parte fundamental deste trabalho.

A todos os animais que deram suas vidas para a realização desta pesquisa.

À “Lana” e ao “Zeca”, meus fiéis companheiros de quatro patas.

À FAPESP e a CAPES, pelo apoio financeiro.

RESUMO

GERARDI, M. **Perfil genético e susceptibilidade de diferentes populações do carrapato *Amblyomma sculptum* à infecção pelo patógeno *Rickettsia rickettsii***. [Genetic profile and susceptibility of different *Amblyomma sculptum* tick populations to infection by *Rickettsia rickettsia* pathogen]. 2016. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recentemente, o táxon *Amblyomma cajennense* sofreu uma divisão sistemática, através de estudos morfológicos, moleculares e biológicos. No Brasil, *Amblyomma sculptum* (pertencente ao complexo *Amblyomma cajennense*) tem sua importância em saúde pública relacionada à transmissão de *Rickettsia rickettsii*, agente etiológico da Febre Maculosa, doença esta considerada de maior importância dentre as enfermidades transmitidas por carrapatos na América Latina. A Febre Maculosa Brasileira (FMB) tem seu destaque de ocorrência na região sudeste do país, onde *A. sculptum* está bem estabelecido e quase sempre relacionado à presença de capivaras. Porém, nem todas as áreas da região sudeste com presença de carrapatos *A. sculptum* e capivaras tem notificações de transmissão de *R. rickettsii* para humanos. O intuito do presente estudo foi avaliar, em condições de laboratório, a susceptibilidade da infecção por *R. rickettsii* em seis populações geograficamente distintas de *A. sculptum*. Dessa forma, foi realizada a quantificação da perpetuação transtadial, da transmissão transovariana e de possíveis efeitos deletérios da infecção nos carrapatos. Além disso, tentou-se correlacionar a susceptibilidade à infecção das diferentes populações de carrapatos (de áreas endêmicas e não endêmicas para FMB) ao perfil genético das mesmas, através dos marcadores 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear. Com base nos resultados encontrados, pode-se constatar diferenças na susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii* entre as seis populações de *A. sculptum* estudadas, muito embora todas elas se mostraram parcialmente refratárias à infecção por *R. rickettsii*. No entanto, não foi observado nenhum padrão específico de variabilidade nos parâmetros biológicos e reprodutivos de carrapatos infectados e não infectados. A partir dos resultados de caracterização molecular, não foi possível verificar divergências genéticas entre as diferentes populações para o marcador ITS2 nuclear. Da mesma forma, com a análise do marcador 16S rDNA mitocondrial não constatou-se divergências genéticas que pudessem ser atribuídas à maior susceptibilidade ou refratariedade dos carrapatos à infecção por *R. rickettsii*. Porém, vale ressaltar que variabilidade nucleotídica neste marcador foi observada entre algumas populações, que parece

seguir padrões geográficos de origem. A exceção para este resultado foi a população de Belo Horizonte (Pampulha), que apresentou variabilidade intrapopulacional, com genótipo semelhante à população do Parque Nacional Grande Sertão Veredas (GSV), ambas do estado de Minas Gerais e um segundo genótipo idêntico ao de Itu, no estado de São Paulo.

Palavras-chave: *Rickettsia rickettsii*. *Amblyomma sculptum*. Perpetuação transestadial. Transmissão transovariana. Análise filogenética.

ABSTRACT

GERARDI, M. **Genetic profile and susceptibility of different *Amblyomma sculptum* tick populations to infection by *Rickettsia rickettsia* pathogen.** [Perfil genético e susceptibilidade de diferentes populações do carrapato *Amblyomma sculptum* à infecção pelo patógeno *Rickettsia rickettsii*]. 2016. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Recently, the taxon *Amblyomma cajennense* taxon resulted in a systematic division, through morphological, molecular and biological studies. In Brazil, *Amblyomma sculptum* (belonging to the *Amblyomma cajennense* complex) has its importance in public health related to *Rickettsia rickettsii* transmission, the etiologic agent of spotted fever, disease that is considered the most important among the tick-borne diseases in Latin America. Brazilian Spotted Fever (BSF) has its occurrence in the southeastern region of the country where *A. sculptum* is well established and is almost always related to presence of capybaras. However, not all areas of southeastern of Brazil with *A. sculptum* ticks and capybaras have notifications of transmission of *R. rickettsii* to humans. This study aimed to evaluate, under laboratory conditions, the *R. rickettsii* susceptibility among six geographically distinct populations of *A. sculptum*. To this purpose, the transtadial perpetuation, transovarial transmission and possible deleterious effects of *R. rickettsii* infection were quantified in the six tick populations. In addition, we attempted to correlate the susceptibility to infection of different populations of ticks (from BSF-endemic and BSF-non-endemic areas) to the genetic profile of them through the markers mitochondrial 16S rDNA and nuclear ITS2. The results show differences in the susceptibility to infection with *R. rickettsii* among the six *A. sculptum* populations, although all populations were partially refractory to *R. rickettsii* infection. However, it was not observed any specific pattern of variation in biological and reproductive parameters of infected and uninfected ticks. Results of molecular characterization did not indicate genetic divergence between the populations for nuclear ITS2 marker. In the same way, analysis of mitochondrial 16S rDNA marker found no genetic differences that could be attributed to increased susceptibility or refractory of ticks to infection by *R. rickettsii*. However, it is note worth that nucleotide variability in this marker was observed among some populations, which seems to follow geographical patterns of origin. The exception to this result was the Belo Horizonte (Pampulha) population, which showed intrapopulation variability, having a similar genotype to the Grande Sertão Veredas population (GSV), both

from the state of Minas Gerais and a second identical genotype to the Itu, from the state of São Paulo.

Keywords: *Rickettsia rickettsii*. *Amblyomma sculptum*. Transstadial perpetuation. Transovarian transmission. Phylogenetic analysis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	COMPLEXO <i>Amblyomma cajennense</i>	13
1.2	<i>Rickettsia rickettsii</i>	14
1.3	FEBRE MACULOSA BRASILEIRA	15
1.4	EPIDEMIOLOGIA DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA	17
1.5	SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR <i>Rickettsia rickettsii</i> EM CARRAPATOS <i>Amblyomma sculptum</i>	18
2	HIPÓTESE CENTRAL	20
3	OBJETIVO GERAL	21
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAIS E MÉTODOS	22
4.1	CARRAPATOS <i>Amblyomma sculptum</i>	22
4.2	CEPAS DE <i>Rickettsia rickettsii</i>	25
4.3	ANIMAIS	26
4.4	PROTOCOLO EXPERIMENTAL	27
4.4.1	PARÂMETROS AVALIADOS	30
4.5	DETECÇÃO MOLECULAR DE <i>Rickettsia rickettsii</i> EM CARRAPATOS E TECIDOS	32
4.6	SOROLOGIA PARA <i>Rickettsia rickettsii</i>	33
4.7	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE <i>Amblyomma sculptum</i> E ANÁLISE FILOGENÉTICA	33
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
5	RESULTADOS	36
5.1	INFECÇÃO EXPERIMENTAL NAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE <i>Amblyomma sculptum</i>	36
5.1.1	População de <i>A. sculptum</i> de Itu, São Paulo	36
5.1.2	População de <i>A. sculptum</i> de Piracicaba, São Paulo	46
5.1.3	População de <i>A. sculptum</i> de Pirassununga, São Paulo	54
5.1.4	População de <i>A. sculptum</i> de Poconé, Mato Grosso	62

5.1.5	População de <i>A. sculptum</i> do Parque Nacional Grande Sertão Veredas, Minas Gerais	69
5.1.6	População de <i>A. sculptum</i> de Belo Horizonte, Minas Gerais	77
5.2	ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEIS POPULAÇÕES DE <i>Amblyomma sculptum</i>	85
5.3	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA	88
6	DISCUSSÃO	95
7	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	107
	APÊNDICES	119

1 INTRODUÇÃO

1.1 COMPLEXO *Amblyomma cajennense*

Recentemente, o táxon *Amblyomma cajennense* sofreu uma divisão sistemática de acordo com descrições morfológicas (NAVA et al., 2014) e, juntamente com resultados de pesquisas moleculares e biológicas (LABRUNA et al., 2011^a; MASTROPAOLO et al., 2011; BEATI et al., 2013), concluiu-se que um complexo de pelo menos seis diferentes espécies o compõem. Dentre estas espécies estão: *Amblyomma interandinum*, *Amblyomma patinoi* e *Amblyomma tonelliae* (consideradas novas espécies); *Amblyomma mixtum*, *Amblyomma sculptum* e *Amblyomma cajennense* sensu stricto (redescrições). Este complexo de espécies possui, além de diferenças morfológicas, biológicas e moleculares, diferentes distribuições geográficas ao longo da América do Sul (LABRUNA et al., 2011a, MASTROPAOLO et al., 2011, BEATI et al., 2013, NAVA et al., 2014). Além disso, um recente estudo de modelagem ambiental com algumas das espécies do complexo *A. cajennense*, evidenciou padrões divergentes de preferências ambientais, como vegetação e temperatura, sendo fatores que direcionam a distribuição das espécies estudadas (ESTRADA-PENA et al., 2014).

No Brasil, recentes estudos realizados por Martins et al. (2016) encontraram *Amblyomma cajennense* sensu stricto nos estados do Pará, Rondônia, Tocantins, Maranhão e Mato Grosso (bioma Amazônia). Entretanto, esta espécie não foi encontrada no interior da Floresta Amazônica, e sim ao longo de áreas de borda do bioma, geralmente degradadas e sem a cobertura original da vegetação (LABRUNA et al., 2005a; BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2014; MARTINS et al., 2016).

Por outro lado, carrapatos *A. sculptum* têm uma maior abrangência territorial em termos de número de estados de ocorrência, sendo encontrado no Pará, Rondônia, Tocantins, Bahia, Maranhão, Pernambuco, Piauí, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, e Paraná (biomas de Cerrado, Pantanal e Mata Atlântica) (MARTINS et al., 2016). Cabe ressaltar ainda, que os registros desta espécie em áreas de Mata Atlântica estão geralmente associados a áreas de degradação da cobertura vegetal natural da floresta (SZABÓ et al., 2009; MARTINS et al., 2016). Martins et al. (2016) encontraram ainda três áreas de ocorrência das duas espécies (*A. cajennense* sensu stricto e *A. sculptum*) em simpatria, áreas estas que representam bordas do bioma

Cerrado e da Amazônia e que possuem, portanto, condições abióticas extremas, favoráveis às duas espécies.

Deve-se ressaltar a importância da reavaliação do papel de cada uma destas espécies do complexo *A. cajennense* na transmissão de patógenos, que inclui o agente etiológico da Febre Maculosa Brasileira, a bactéria *Rickettsia rickettsii* (MARTINS et al., 2016). Entretanto, na Região Sudeste do Brasil, somente *A. sculptum* está estabelecido (BEATI et al., 2013, MARTINS et al., 2016). Tendo em vista a distribuição de *R. rickettsii* e a ocorrência da Febre Maculosa Brasileira nos estados brasileiros, “*Amblyomma cajennense*,” quando referido como vetor de febre maculosa, será tratado como *A. sculptum*, embora a grande maioria das referências citadas tenham sido publicadas anteriormente à redescritção desta espécie por Nava et al. (2014) e utilizam portanto, “*Amblyomma cajennense*”.

1.2 *Rickettsia rickettsii*

Rickettsia rickettsii é uma Alphaproteobactéria pertencente à Ordem Rickettsiales. Foi descrita pela primeira vez no início do século XX nos Estados Unidos, por Howard Taylor Ricketts, que também identificou o carrapato como seu principal vetor (RICKETTS, 1909). É uma bactéria consideravelmente pequena (0,3 a 1,5µ), Gram negativa e parasito intracelular obrigatório (WEISS; MOULDER, 1984). Carrapatos são seus principais hospedeiros e reservatórios, além de vetores (McDADE; NEWHOUSE, 1986).

O nicho principal de crescimento bactérias do gênero *Rickettsia* é o citoplasma de célula eucariótica (WINKLER, 1990). Em vertebrados, estas bactérias têm como principal alvo as células endoteliais de pequenos e médios vasos e, após a invasão por fagocitose induzida e escape do fagossoma, sua rápida replicação culmina com a injúria da célula hospedeira por estresse oxidativo (SILVERMAN; SANTUCCI, 1988; WALKER, 1988; EREMEEVA et al., 1998).

Nos carrapatos, bactérias *Rickettsia* spp., adquiridas via alimentação em animal riquetsêmico, invadem as células epiteliais intestinais dos artrópodes (que suportam a replicação da bactéria) e escapam eficientemente da resposta imune invadindo os hemócitos (SOCOLOVSKI et al., 2009a). Assim, através da hemolinfa, invadem e infectam todos os tecidos e órgãos do carrapato, incluindo a glândula salivar e ovários, importantes veículos de

transmissão do patógeno respectivamente para vertebrados e para sua progênie (transmissão vertical) (SANTOS et al., 2002; SOCOLOVSKI et al., 2009a).

As primeiras observações biológicas da manutenção e persistência de *R. rickettsii* em artrópodes vetores datam da primeira década do século XX, antes mesmo de sua descrição como bactéria. Através de experimentos laboratoriais com *Dermacentor andersoni*, Ricketts (1907) demonstrou a infectividade de larvas provenientes de fêmeas anteriormente infectadas (através e alimentação em hospedeiros em bacteremia) e assim, a transmissão transovariana da bactéria pelos carrapatos, concluindo que este fenômeno ocorria em menos de 50% das fêmeas infectadas com *R. rickettsii*, em condições naturais. Este autor também demonstrou a persistência e infectividade do agente no artrópode após a realização da ecdise ou muda de estágio (perpetuação transtadial) (RICKETTS, 1907).

1.3 FEBRE MACULOSA BRASILEIRA

A Febre Maculosa Brasileira (FMB), causada pela bactéria *R. rickettsii*, é a doença transmitida por carrapatos de maior importância médica na América Latina (PAROLA et al., 2009). Neste continente, sua ocorrência está confirmada no México, Costa Rica, Panamá, Colômbia, Argentina e Brasil. O carrapato-estrela (*A. sculptum*) é o principal vetor da FMB na América Latina (LABRUNA, 2009), muito embora outras espécies exerçam este papel em alguns nichos específicos, como é o caso do carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, vetor incriminado no norte do México, e *Amblyomma aureolatum*, vetor incriminado na região metropolitana de São Paulo (PAROLA et al., 2009; OGRZEWSKA et al., 2012). No Brasil, foram registrados 737 casos de febre maculosa com confirmação laboratorial entre os anos de 1989 e 2008, que resultaram em 186 óbitos (letalidade de 25,2%) (Del FIOLE et al., 2010). A Região Sudeste registrou, neste período, a maioria dos casos (n = 591), com letalidade de 31,4% (Del FIOLE et al., 2010). Somente no Estado de São Paulo, 557 casos foram confirmados de 1985 a 2013, com 225 óbitos (letalidade de 40,4%). Esses números fazem da FMB, dentre as zoonoses transmitidas por vetores, a que mais mata pessoas no estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2016).

Os primeiros registros da FMB para a América Latina foram na cidade de São Paulo, ainda no final dos anos 20 (PIZA et al., 1932), quando era denominada “Tífo Exanthematico

de São Paulo”. Após estes primeiros relatos, houve um longo período de imprecisão nos dados, mas com registros de casos, sobretudo em municípios de áreas rurais vizinhas à capital, como Mogi das Cruzes, Diadema e Santo André (TIRIBA 1972; TIRIBA; MONTEIRO, 1985; ROSENTHAL, 1989). A partir da década de 1980, municípios da região de Campinas começaram a relatar FMB de forma endêmica (LIMA et al., 1995; LIMA et al., 2003) e em 1996 a doença se tornou de notificação compulsória nesta região.

Em 2001, o Ministério da Saúde incluiu a doença como notificação compulsória em todo o território nacional. Desde então, a doença vem ocorrendo de forma endêmica na região metropolitana de São Paulo (OGRZEWALSKA et al., 2012), além de se registrar casos em outros estados, como Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro (LE MOS et al., 2002; GALVÃO et al., 2003; SPOLIDORIO et al., 2010). No estado de São Paulo, uma “expansão” para o interior foi observada nos últimos anos, o que ainda deixa em dúvida se é de fato uma expansão das áreas de transmissão ou o resultado da efetividade no diagnóstico e notificação em áreas onde a doença era desconhecida (KATZ et al., 2009). Ressalta-se ainda que já na década de 40, Travassos e Vallejo-Freire (1945) apresentam mapas com extensa distribuição da doença no estado, sem citar suas fontes.

O carrapato-estrela, *A. sculptum*, é o vetor incriminado na transmissão da FMB no interior do estado de SP assim como em outros estados da região Sudeste (GUEDES et al., 2005; PEREZ et al., 2008; SPOLIDORIO et al., 2010). Equinos, antas (*Tapirus terrestris*), capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e suídeos silvestres são incriminados como hospedeiros primários deste carrapato, o que significa que seu estabelecimento numa determinada área com condições ambientais favoráveis depende da presença constante de pelo menos uma dessas espécies animais (LABRUNA, 2013).

No estado de São Paulo, as áreas endêmicas para FMB cujo vetor é *A. sculptum* estão associadas a capivaras, o que faz desses animais os principais hospedeiros do carrapato nas áreas de transmissão no interior do estado. Algumas áreas também possuem equídeos, porém sempre associados a capivaras (HORTA et al., 2007; LABRUNA et al., 2009a; BRITES-NETO et al., 2013; LABRUNA, 2013). Recentemente, Osava (2016) avaliou a infestação por carrapatos e sororreatividade a *Rickettsia* spp. em suínos domésticos de criações ao ar livre (SISCAL) no triângulo mineiro. Interessantemente, os resultados encontrados foram alta prevalência de animais infestados por *A. sculptum* e presença de anticorpos anti-*Rickettsia* nestes animais (OSAVA, 2016). Embora este tenha sido o primeiro estudo conhecido com suínos domésticos, carrapatos e *Rickettsia* spp., a possibilidade destes animais atuarem como

hospedeiros amplificadores de carrapatos e de *Rickettsia* spp. deve ser melhor estudado (OSAVA, 2016).

1.4 EPIDEMIOLOGIA DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA

Nas últimas décadas, o estado de São Paulo vem vivenciando uma clara expansão das populações de capivaras, que passaram a ocupar muitas áreas onde antes não existiam. Além disso, as densidades populacionais destes animais têm aumentado de forma significativa nos locais de populações já estabelecidas (VERDADE; FERRAZ, 2006; FERRAZ et al., 2007). No campus da USP na ESALQ, área endêmica para FMB em Piracicaba, as densidades populacionais de capivaras nos últimos anos têm alcançado números até 40 vezes maior que os registrados em ambientes naturais, como Pantanal e Amazônia (VERDADE; FERRAZ, 2006). Esta expansão numérica e espacial das populações de capivaras está associada primariamente à substituição de paisagens naturais por áreas de pastagens e lavouras (principalmente cana-de-açúcar), que tem aumentado a capacidade de suporte dessas áreas, associado à eliminação dos principais predadores naturais (onça, jacaré, sucuri) e proibição da caça (FERRAZ et al., 2007; MOREIRA et al., 2013). Neste caso, a proibição da caça tem também proporcionado a aproximação das capivaras aos locais mais frequentados pelo homem (FERRAZ et al. 2007), resultando em uma maior exposição humana aos carrapatos (como por exemplo, *A. sculptum*) carregados por esta espécie animal (PEREZ et al., 2008; NEO; MELO 2012). Por fim, porém não menos importante, foi constatado recentemente que as capivaras poderiam funcionar como hospedeiros amplificadores da infecção por *R. rickettsii* para carrapatos *A. sculptum*, isto é, uma vez infectada, a capivara mantém a bactéria *R. rickettsii* em sua circulação sanguínea por 7 a 10 dias, quando então pode infectar novos carrapatos que se alimentem nela neste período, gerando novas linhagens de carrapatos infectados dentro da população de carrapatos (SOUZA et al., 2009).

Um estudo mais recente (SOARES et al., 2012) constatou que *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) não é capaz de manter a infecção por *R. rickettsii* de forma eficiente por gerações consecutivas, simplesmente porque menos de 50% dos carrapatos mantêm a infecção pelas vias transovariana e transestadial. Desta forma, torna-se essencial a participação de hospedeiros vertebrados amplificadores na manutenção da bactéria na

natureza, para que haja uma criação constante de novas linhagens de carrapatos infectados (BURGDORFER, 1988; LABRUNA 2009; 2013). Segundo Labruna (2009), um hospedeiro amplificador eficiente de *R. rickettsii* precisa obrigatoriamente preencher os seguintes quesitos:

- 1- ser abundante nas áreas endêmicas para FMB;
- 2- ser hospedeiro primário para o carrapato vetor;
- 3- ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*, a ponto de desenvolver uma bacteremia suficiente para infectar novos carrapatos que se alimentem nele;
- 4- ser altamente prolífero, para que novos indivíduos suscetíveis sejam sempre introduzidos na população de hospedeiros. Este último quesito se baseia na premissa de que cada hospedeiro vertebrado apresenta, na prática, apenas uma bacteremia de 1 a 3 semanas em sua vida, pois após este período, elimina a infecção e se torna imune (PHILIP, 1959; McDADE & NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988; LABRUNA 2013).

Somente a capivara preenche de forma eficiente todos esses quatro quesitos nas áreas endêmicas para FMB no interior do estado de São Paulo. Desta forma, a expansão populacional desses animais nas últimas décadas pode estar diretamente relacionada à emergência da doença no interior do estado (LABRUNA, 2013). Os equinos, outro hospedeiro primário de *A. sculptum*, também presente em algumas áreas endêmicas, não preenchem todos esses quesitos porque são pouco prolíferos e conforme demonstrado num estudo recente (UENO et al., 2013), não desenvolvem bacteremia suficiente para infectar carrapatos.

No entanto, a distribuição geográfica de capivaras infestadas por *A. sculptum* é muito superior às áreas endêmicas para FMB. Em outras palavras, há muito mais áreas com presença de *A. sculptum* mantido por capivaras, sem presença de *R. rickettsii*, que áreas onde *R. rickettsii* circula entre *A. sculptum* e capivaras. As razões para a ausência de *R. rickettsii* nessas áreas são desconhecidas.

1.5 SUSCEPTIBILIDADE À INFECÇÃO POR *Rickettsia rickettsii* EM CARRAPATOS *Amblyomma sculptum*

Dois estudos bem recentes concluíram que o táxon *A. cajennense* está atualmente representado por um grupo de pelo menos seis espécies geneticamente, morfologicamente e geograficamente distintas, oriundas de um ancestral comum na América do Sul, a partir do período Mioceno (BEATI et al., 2013; NAVA et al., 2013). Em um desses estudos (BEATI et al., 2013), foi constatada que mesmo que a região Sudeste do Brasil esteja ocupada por apenas uma dessas espécies (*A. sculptum*), há distintas variações genéticas entre as populações desta região, traduzidas por polimorfismo especialmente no espaçador transcrito interno ITS2 (do inglês *internal transcribed spacer*) do genoma nuclear dos carrapatos. Desta forma, não se sabe se esta diferença genética poderia estar associada a diferentes susceptibilidades à infecção por *R. rickettsii* e portanto, se estaria interferindo na distribuição geográfica da FMB. Até o presente, somente um estudo (SOARES et al., 2012) avaliou a suscetibilidade à infecção por *R. rickettsii* nas diferentes fases do ciclo de vida de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*). Neste estudo, realizado com uma população de *A. sculptum* de Pedreira, SP, e uma cepa de *R. rickettsii* isolada do carrapato *A. aureolatum* de Mogi das Cruzes, SP, foi constatado que *A. sculptum* não é capaz de manter a infecção por *R. rickettsii* de forma eficiente por gerações consecutivas. Sabendo-se hoje do polimorfismo genético que ocorre nas populações de *A. sculptum* na região Sudeste (BEATI et al., 2013), os resultados de Soares et al. (2012) não poderiam ser extrapolados com segurança para diferentes populações deste carrapato no Brasil. Além disso, o fato de Soares et al. (2012) terem exposto os carrapatos *A. sculptum* a uma cepa de *R. rickettsii* (cepa Taiaçu) originalmente isolada de *A. aureolatum*, proveniente de uma área onde não havia *A. sculptum* (PINTER; LABRUNA, 2006), também não se pode descartar a hipótese de que a cepa Taiaçu não estaria adaptada à outra espécie de carrapato, no caso, *A. sculptum*. Infelizmente, no momento do trabalho de Soares et al. (2012), não havia disponível nenhuma cepa de *R. rickettsii* isolada de *A. sculptum*.

Diante deste contexto, torna-se essencial que a susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* seja realizada com uma cepa originária deste próprio carrapato. Por oportuno, recentemente uma nova cepa de *R. rickettsii* (designada como cepa ITU) foi isolada a partir de carrapatos *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) de uma área endêmica para FMB, no município de Itu, estado de São Paulo (KRAWCZAK et al., 2014). A obtenção deste novo isolado possibilitou a execução do presente projeto, buscando responder algumas perguntas que não foram suficientemente respondidas por Soares et al. (2012) ou que foram geradas pelos resultados desses autores.

2 HIPÓTESE CENTRAL

A ocorrência de *R. rickettsii* em *A. sculptum* poderia estar relacionada às susceptibilidades diferenciadas dos parasitos à infecção, relacionadas ao perfil genético dos carrapatos (marcadores 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear). Em outras palavras, divergências genéticas entre carrapatos *A. sculptum* poderiam influenciar a susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii*, fato que poderia ocorrer dentro de uma mesma população de *A. sculptum* (delimitada geograficamente) e entre distintas populações geográficas, podendo ser um fator determinante da distribuição da ocorrência de *R. rickettsii* e portanto, de febre maculosa no Brasil.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar, em condições de laboratório, a susceptibilidade de seis populações geograficamente distintas de *A. sculptum* à infecção por *R. rickettsii*, tentando correlacionar as diferentes susceptibilidades ao perfil genético das populações de carrapatos utilizando dois marcadores, 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Avaliar, dentro de cada população de *A. sculptum*, se há diferença na susceptibilidade dos carrapatos à infecção por *R. rickettsii* de acordo com o estágio em que houve a exposição ao patógeno;
- 2) Avaliar se parâmetros biológicos, bem como parâmetros reprodutivos podem ser alterados em função da infecção por *R. rickettsii* (efeito deletério) em cada população de *A. sculptum* utilizada;
- 3) Avaliar de forma comparativa a susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii* em seis populações geograficamente distintas de *A. sculptum*, através da quantificação da perpetuação transestadial e transmissão transovariana da bactéria nos carrapatos;
- 4) Avaliar, dentro de cada população de *A. sculptum*, se há divergência nos marcadores moleculares 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear entre carrapatos que adquirem a infecção por *R. rickettsii* e aqueles que são expostos à bactéria mas não se infectam; e
- 5) Caracterização molecular e análise filogenética de seis populações geograficamente distintas de *A. sculptum*, através de dois marcadores moleculares (16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARRAPATOS *Amblyomma sculptum*

As localidades de origem dos carrapatos *A. sculptum* foram escolhidas baseados em alguns critérios, de acordo com os objetivos deste trabalho.

O município de Itu, São Paulo, teve um caso confirmado de FMB em setembro de 2012. O local provável de infecção foi um condomínio residencial (particular), onde as casas se interpõem a áreas de mata conservada e recursos hídricos. A área total do condomínio é de 485 ha e possuía capivaras com livre acesso, que mantinham a população de *A. sculptum* no local (KRAWCZAK et al., 2014). Carrapatos *A. sculptum* desta localidade foram coletados de capivaras do referido local em abril de 2012 (fêmeas ingurgitadas, cujas larvas resultantes deram início aos experimentos - ver adiante item 4.4).

Piracicaba, estado de São Paulo é reconhecidamente um município endêmico para FMB e registra novos casos da doença a cada ano. De 1998 até 2015, 64 casos de FMB foram confirmados (SÃO PAULO, 2016). O Campus da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ/USP) possui área total de aproximadamente 915 ha, com áreas de reflorestamento e remanescentes florestais, entremeadas às áreas de cultivos, jardins planejados e edificações, além de cursos de rios e lagos (MARCHINI; FERRAZ, 2014). A ESALQ já foi relacionada como local provável de infecção em casos de FMB na cidade, e estudos já demonstraram que as capivaras são os principais hospedeiros para adultos de *A. sculptum* no local (PEREZ et al., 2008). Assim, carrapatos adultos de vida livre foram coletados através das técnicas de arraste de flanela (TERRASSINI et al., 2010) e armadilhas de gelo seco (CO₂) (SZABÓ et al., 2008) em março de 2014 no interior do campus.

Pirassununga, também interior do estado de São Paulo, se localiza a aproximadamente 80 km de Piracicaba. O campus da Universidade de São Paulo em Pirassununga (Campus Fernando Costa) possui uma área de aproximadamente 2.300 ha, onde há reservas florestais monitoradas com fauna silvestre, represas, áreas de pastagem e cultivo. O local já foi alvo de estudos há alguns anos e sabe-se que grandes populações de *A. sculptum* são mantidas principalmente por cavalos (SANGONI et al., 2005) e capivaras em alguns fragmentos (HORTA et al., 2007). Entretanto, nenhum caso de febre maculosa foi registrado até os dias

atuais, tão pouco foi encontrada título sorológico reagente especificamente ao antígeno de *R. rickettsii* em animais estudados (HORTA et al., 2007; SOUZA et al., 2008), sendo considerada portanto, área não endêmica para FMB. Carrapatos *A. sculptum* de Pirassununga foram obtidos em coleta de campo no interior do campus da USP em março de 2014. Carrapatos de vida livre foram coletados pelas técnicas de arraste de flanela (TERRASSINI et al., 2010) e armadilha de gelo seco (CO₂) (SZABÓ et al., 2008).

O município de Poconé, estado do Mato Grosso têm sido alvo de estudos recentes para investigar a soroprevalência de *Rickettsia* spp em animais domésticos como cães e equinos, além de pesquisas moleculares destes agentes em carrapatos (MELO et al., 2011; ALVES et al., 2014). Em nenhum destes estudos foi evidenciada a presença ou circulação de *R. rickettsii* nos hospedeiros vertebrados, tão pouco em carrapatos, sendo portanto, considerada área não endêmica para FMB. A colônia de *A. sculptum* de Poconé foi obtida em coleta de campo (julho de 2013) pela técnica de arraste de flanela (TERRASSINI et al., 2010) na Base Avançada de Pesquisas no Pantanal (BAPP) da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT) no município de Poconé. Esta área totaliza 10.000 m², com alta diversidade de espécies, como capivaras, antas, onça-pintada, além de vários outros mamíferos de médio porte.

Parque Nacional Grande Sertão Veredas (PNGSV) constitui uma grande reserva no estado de Minas Gerais, na divisa com a Bahia, com sede localizada no município de Chapada Gaúcha (MG). O parque ocupa uma área de mais de 230.000 ha de Cerrado, com grande riqueza de fauna de vertebrados (BRASIL, 2003). Até o presente momento, nenhum caso de FMB foi relacionado à localidade. Estudo recente conduzido por Barbieri (2016) sugere, através de estudos sorológicos em pequenos mamíferos e pesquisa molecular em carrapatos, que não há circulação *R. rickettsii* (área não endêmica para FMB). A colônia de *A. sculptum* do Parque Nacional Grande Sertão Veredas foi obtida em coleta de campo em novembro de 2013. Carrapatos de vida livre foram coletados por armadilha de gelo seco (CO₂) (SZABÓ et al., 2008) em um ponto no interior do parque, cuja fitofiosonomia é de carrasco e sem a presença de capivaras, apesar da existência destes animais no interior da reserva.

O estado de Minas Gerais, especificamente os municípios da região nordeste do estado são reconhecidamente considerados focos endêmicos de FMB (GALVÃO et al., 2002). Nas últimos anos, a capital, Belo Horizonte também têm registrado casos da doença, inclusive com óbitos. Dois destes casos foram relacionados com o parasitismo por *A. sculptum* depois de frequentar a orla da Lagoa da Pampulha (Parque Ecológico da Pampulha), reservatório que

se destaca por seu acervo cultural, turístico e histórico. Estudos recentes na Lagoa da Pampulha demonstraram a presença de várias espécies de organismos indicadoras de ambientes degradados (KAMEI, 2010). Além disso, mesmo com a forte alteração do ambiente e com a aparente limitação de espaço e outros recursos, a população de capivaras apresenta relativa estabilidade (ARAÚJO et al., 2007), mantendo populações de *A. sculptum*. Os carrapatos provenientes do local (vida livre) foram coletados pela técnica de armadilha de gelo seco (CO₂) (SZABÓ et al., 2008) em janeiro de 2015.

O resumo das seis populações de *A. sculptum* estudadas estão no Quadro 1.

Quadro 1 - Origem das populações de *A. sculptum* utilizadas no presente estudo

Código	Origem		
	FMB	Presença de capivaras no local de coleta	Localidade
ITU	Área endêmica	Sim	Condomínio particular em Itu/, SP*
PIC	Área endêmica	Sim	Campus ESALQ (USP) em Piracicaba, SP
PIS	Área não endêmica	Sim	Campus Fernando Costa (USP) em Pirassununga, SP
PAN	Área não endêmica	Sim	Base Avançada de Pesquisas no Pantanal (UFMT) em Poconé, MT
GSV	Área não endêmica	Não	Parque Nacional Grande Sertão Veredas, Chapada Gaúcha, MG**
PAMP	Área endêmica	Sim	Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, MG***

*Em setembro de 2012, houve um caso confirmado de FMB em uma criança neste condomínio. Em outubro de 2012, foi isolado em cultivo celular uma cepa de *R. rickettsii* (cepa Itu) a partir de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) de vida livre coletados neste mesmo condomínio (KRAWCZAK et al., 2014).

**Os carrapatos foram colhidos em uma área isolada do parque onde não há capivaras e nenhum animal doméstico.

***Desde 2012, cinco casos de FMB foram confirmados em frequentadores desta lagoa, com dois óbitos. Recentemente, foi isolada em cultivo celular uma cepa de *R. rickettsii* (cepa Pampulha) proveniente de carrapatos *A. sculptum* de vida livre coletados na Lagoa da Pampulha (LABRUNA et al., dados ainda não publicados).

Resumindo, todas as populações de carrapatos utilizadas neste estudo são resultantes de adultos de vida livre em seus locais de origem, exceto a população proveniente de Itu, São Paulo. Neste caso, fêmeas ingurgitadas foram coletadas diretamente das capivaras do local, e as larvas provenientes de tais fêmeas foram utilizadas para dar início às infestações experimentais. Nas demais populações, adultos de vida livre foram coletados pelas técnicas de arraste (TERRASSINI et al., 2010) e/ou armadilha de gelo seco (SZABÓ et al., 2008) em

cada uma das localidades. Estes carrapatos foram trazidos ao laboratório, alimentados em coelhos e as larvas resultantes foram utilizadas para iniciar as infestações experimentais.

Todas as fêmeas ingurgitadas que geraram as larvas utilizadas para iniciar o estudo foram previamente testadas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) em tempo real (ver adiante - item 4.5) e demonstradas negativas para *Rickettsia* spp., garantindo assim que a infecção por este patógeno se desse de forma igual para todas as populações. Além disso, os coelhos utilizados para alimentar os adultos F₀ que vieram do campo tiveram seu soro sanguíneo do 21º dia de infestação testado por sorologia (RIFI) (ver adiante - item 4.6) com o antígeno de *R. rickettsii*. Todos os animais utilizados para alimentação de adultos trazidos do campo foram negativos nesta sorologia.

Durante os experimentos, os carrapatos foram mantidos em estufas BOD a 27°C e a 85% de umidade relativa.

4.2 CEPAS DE *Rickettsia rickettsii*

Todos os procedimentos foram realizados conforme previamente descrito para infecção experimental da cepa Taiacu de *R. rickettsii* em uma colônia de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) (SOARES et al., 2012). No entanto, no presente estudo, foram utilizadas a cepa Itu de *R. rickettsii*, originalmente isolada de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) de uma área endêmica para FMB em Itu, SP (KRAWCZAK et al., 2014) e também, cepa Pampulha de *R. rickettsii*, recentemente isolada de *A. sculptum* coletados na orla da Lagoa da Pampulha, Belo Horizonte, Minas Gerais, área esta também endêmica para FMB (LABRUNA et al., em fase de elaboração)¹.

Inicialmente, o objetivo deste estudo era a comparação da susceptibilidade entre cinco populações de *A. sculptum*, sendo que todas seriam expostas à cepa Itu de *R. rickettsii*. Porém, após o isolamento de nova cepa (Pampulha) e a disponibilidade de carrapatos viáveis trazidos do mesmo local, tornou-se importante inserir esta nova população de carrapatos no presente estudo e, utilizar para a infecção experimental, a cepa de *R. rickettsii* originalmente isolada destes parasitos. Estes resultados poderiam ser comparados à infecção experimental da população de carrapatos de Itu - SP (também de área endêmica para FMB) infectados com a

¹ LABRUNA, M. B. et al. Manuscrito ainda não redigido.

cepa Itu de *R. rickettsii*. Assim, teríamos duas populações de carrapatos infectados com cepa autóctone da bactéria e, portanto, seria permitido verificar se a susceptibilidade dos carrapatos à infecção por *R. rickettsii* está ligada a uma especificidade à cepa local da bactéria. Essa nova hipótese está relacionada aos nossos resultados preliminares, nos quais observamos uma maior susceptibilidade à infecção e, portanto, maiores frequências de transmissão transestadial e transovariana da bactéria nos carrapatos originários de Itu (área endêmica para FMB e origem da cepa de *R. rickettsii* utilizada para os experimentos iniciais).

Ambas as cepas utilizadas neste estudo foram originalmente isoladas através da inoculação intraperitoneal de cobaias com um macerado de carrapatos *A. sculptum* trazidos do campo. Desde então, elas têm sido passadas de cobaia a cobaia, sendo que em cada passagem animal, fragmentos de fígado, pulmões, baço e cérebro são criopreservados. Para a inoculação das cobaias do presente trabalho, fragmentos desses órgãos de cobaias infectadas com as cepas Itu ou Pampulha foram descongelados, macerados em BHI (*brain-heart infusion*), e inoculados em cobaias pela via intraperitoneal no mesmo dia da infestação por carrapatos, conforme descrito por Soares et al. (2012).

No presente estudo, a cepa Itu de *R. rickettsii* foi utilizada para infectar carrapatos das populações de Itu, Pirassununga, Piracicaba, Poconé e Grande Sertão Veredas. Já a cepa Pampulha foi utilizada para infectar carrapatos originários da mesma localidade.

4.3 ANIMAIS

Para as infestações experimentais utilizaram-se coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) linhagem Nova Zelândia para alimentar o estágio adulto dos carrapatos e, cobaias (*Cavia porcellus*) para as infestações com os estágios imaturos (larvas e ninfas) de *A. sculptum*, ambos sem contato prévio com carrapatos e/ou produtos acaricidas. Coelhos foram utilizados com média de idade entre 60 e 90 dias, de ambos os sexos. Da mesma forma, cobaias de ambos os sexos foram utilizadas (dependendo da disponibilidade) e com idade média de 60 e 90 dias.

4.4 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

As colônias de carrapatos foram formadas a partir de carrapatos adultos colhidos em cada uma das localidades do Quadro 1. Uma vez comprovado através de PCR e sorologia de animais infestados, que cada colônia estava livre de infecção por *Rickettsia* spp., elas foram submetidas aos procedimentos descritos por Soares et al. (2012), com algumas modificações (Diagrama 1). Em cada cobaia ou coelho, a infestação por carrapatos foi realizada dentro de câmaras de pano de algodão coladas sobre o dorso tricotomizado do animal, conforme previamente descrito (PINTER et al., 2002).

Para cada colônia, a infecção experimental teve início com larvas F₁ infestando cobaias inoculadas no dia 0 com *R. rickettsii* (órgãos criopreservados de cobaias macerados em BHI). Os estágios dos carrapatos subsequentes, ninfas e adultos F₁, foram alimentados em cobaias ou coelhos respectivamente (grupo infectado como larva - GL). Além disso, ninfas F₁ também foram expostas a cobaias rickettsêmicas, e os adultos resultantes, alimentados em coelhos (grupo infectado como ninfa - GN). Simultaneamente, foram realizadas infestações em cobaias sem infecção (grupo controle - GC). Optou-se por não expor os carrapatos à infecção por *R. rickettsii* em estágio adulto devido aos resultados de uma série de estudos prévios com outras espécies de carrapatos (PARKER et al., 1933; BURGDORFER; BRINTON, 1975; PIRANDA et al., 2011) e, mais recentemente, de Soares et al. (2012) com *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*), nos quais se verificou que a transmissão vertical de *R. rickettsii* é mínima no grupo infectado como adulto (GA), quando comparado aos grupos infectados como larva (GL) e ninfa (GN).

Resultados preliminares sugeriram que a frequência de infecção encontrada em algumas populações de carrapatos (na primeira geração de laboratório) foram tão baixas, que não foi possível detectar carrapatos infectados no estágio subsequente ao da exposição a *R. rickettsii*. Entretanto, estes resultados corroboram com aqueles obtidos por Soares et al. (2012), onde se concluiu que *A. sculptum* é parcialmente refratário à infecção por *R. rickettsii*. Por isso, na segunda geração de laboratório do presente estudo, optamos por criar um novo grupo de infecção, no qual, larvas (F₂) seriam expostas à infecção e, as ninfas resultantes (ninfas F₂) seriam reexpostas a *R. rickettsii*, formando o grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa (GL/GN). Ressalta-se que os carrapatos que deram origem a este novo

grupo infectado vieram de fêmeas do grupo controle da geração anterior, garantindo assim, que a exposição à infecção ocorresse somente nos estágios da geração em questão (F_2).

Na primeira geração de laboratório (F_1), para cada fase do ciclo parasitário (larva, ninfa ou adulto), foram utilizadas 3 cobaias ou 2 coelhos por grupo (GC e GL e GN - F_1). Na segunda geração dos parasitos (F_2), também 3 cobaias foram utilizadas por grupo experimental (GC, GL/GN) e, na infestação de adultos, 2 ou 3 coelhos por grupo foram utilizados (GC e GL/GN).

O número de carrapatos utilizados por animal infestado variou de 80 a 100 ninfas e de 7 a 20 casais de adultos. O número de larvas utilizadas para as infestações não foi determinado, no entanto, em todas as ocasiões foram selecionados bolos de larvas cujos pesos das massas de ovos e taxa de eclosão tinham variação máxima de 100mg (no peso da massa de ovos) e de 10% (na taxa de eclosão).

Diagrama 1. Protocolo experimental das infestações com carrapatos *A. sculptum* em cobaias e coelhos. GC, grupo controle; GL, grupo de carrapatos de primeira geração expostos à infecção por *R. rickettsii* como larvas; GN, grupo de carrapatos de primeira geração expostos à infecção por *R. rickettsii* como ninfas; GL/GN, grupo de carrapatos de segunda geração expostos à infecção por *R. rickettsii* como larvas e reexpostos à infecção como ninfas.

4.4.1 Parâmetros avaliados

Com relação aos hospedeiros, todos os animais infestados tiveram sua temperatura retal aferida com termômetro digital do dia 0 ao dia 21 pós-infestação. Para cobaias, temperaturas acima de 39,5°C foram consideradas como febre (MONTEIRO, 1931) e para coelhos, acima de 40°C (MONTEIRO, 1933). Além disso, nos animais machos, foi avaliada reação escrotal como edema, hiperemia e necrose, sinais estes típicos de infecção por *R. rickettsii* em cobaias e coelhos (MONTEIRO, 1933; De BRITO et al. 1973; WALKER et al., 1977). Ainda nos animais, ao final de todas as infestações, foi avaliada a taxa de letalidade que carrapatos expostos à infecção em um estágio anterior ao em questão produziria nos hospedeiros utilizados para alimentá-los (cobaia ou coelho), o que poderia indiretamente refletir a frequência de infecção nos carrapatos.

As câmaras de infestação foram avaliadas diariamente do dia 0 ao dia que o último carrapato se despreendeu. Após o desprendimento dos seus hospedeiros, larvas e ninfas ingurgitadas foram acondicionadas em tubos de vidro com um pequeno pedaço de papel toalha (2cm x 3cm) em seu interior, tampados com algodão e devidamente identificados.

Para a avaliação do número de carrapatos que tiveram sucesso na muda, cem (100) larvas ingurgitadas (com visível mobilidade) foram selecionadas no dia de desprendimento do hospedeiro, sendo que, para os grupos infectados, este dia foi sempre posterior ao 2º dia consecutivo de febre acima de 40°C (para garantir que estes carrapatos teriam tido contato e, possivelmente, se infectado com *R. rickettsii*). No mesmo dia de desprendimento escolhido para a seleção de larvas do grupo infectado, também foram selecionadas 100 larvas do grupo controle (GC) para avaliação da taxa de ecdise. Assim, para cada hospedeiro, a taxa de ecdise de larva para ninfa foi avaliada em cem carrapatos. Com relação às ninfas ingurgitadas, todos os parasitos coletados dos hospedeiros foram utilizados para avaliação da taxa de ecdise de ninfa para adulto.

Fêmeas ingurgitadas, após o desprendimento dos coelhos, foram coletadas, pesadas individualmente em balança eletrônica analítica de alta precisão (Precisa XT 220A) e acondicionadas em placas de Petri pequenas (individual). Foram avaliados os seguintes parâmetros: período de ingurgitamento (número de dias decorridos desde a liberação dos carrapatos sobre o hospedeiro até o seu desprendimento); peso da fêmea ingurgitada; período de pré-postura (número de dias decorridos desde o desprendimento da fêmea até o início da ovipostura); peso da massa de ovos (ao final da postura), índice de eficiência de conversão da

reserva alimentar em ovos, obtido pela divisão entre o peso da massa de ovos e o peso da fêmea ingurgitada x 100); período de incubação dos ovos (número de dias decorridos desde o início da ovipostura até o início da eclosão da primeira larva) e taxa de eclosão de ovos em larvas (observação visual). Nos grupos de exposição à infecção, estes parâmetros foram analisados separadamente para as fêmeas encontradas positivas e aquelas negativas na PCR para *Rickettsia* spp..

Decorridos 30 dias após a ecdise de larvas e ninfas ingurgitadas, ninfas e adultos respectivamente foram selecionados para extração de DNA e PCR (ver adiante - item 4.5) para se determinar a frequência de infecção nos carrapatos (número de carrapatos positivos na PCR em tempo real sobre o número total de carrapatos testados). Este parâmetro refletiria a perpetuação transtadial da bactéria nos carrapatos (larva para ninfa e ninfa para adulto) em cada população de *A. sculptum*, bem como em cada grupo experimental de exposição à infecção. Nos grupos expostos a *R. rickettsii*, somente carrapatos que se desprenderam de seus hospedeiros a partir do segundo dia de febre acima de 40° C foram selecionados. A partir desta amostragem, carrapatos do mesmo dia de coleta no grupo controle foram selecionados para extração e PCR.

Outro parâmetro avaliado foi a proporção de fêmeas infectadas que deram origem a pelo menos um ovo ou larva infectado (frequência de transmissão transovariana - FTO). Este parâmetro foi dado pela razão entre o número de fêmeas com *pool* de ovos e/ou larvas positivos sobre o número de fêmeas positivas na PCR. Para tal, após o término da ovipostura pelas fêmeas, estas foram submetidas à extração de DNA e PCR para determinar a proporção de fêmeas infectadas. Das fêmeas encontradas positivas para *Rickettsia* spp. na PCR, um *pool* de ovos (10 a 20 unidades) foi submetido à extração de DNA e PCR e, em caso positivo, 10 ovos individuais foram também testados para se determinar a frequência de infecção filial (FIF) para os ovos. Havendo transmissão transovariana (fêmea e *pool* de ovos positivos na PCR) e eclosão de larvas, estas também foram testadas da mesma forma que os ovos (primeiro em *pool*, e depois de forma individual) e se determinou a frequência de infecção filial (FIF) para as larvas.

Ao final de cada geração de laboratório, larvas provenientes de fêmeas com transmissão transovariana foram alimentadas em cobaias para verificação da competência vetorial e consequente transmissão da bactéria para hospedeiros susceptíveis.

4.5 DETECÇÃO MOLECULAR DE *Rickettsia rickettsii* EM CARRAPATOS E TECIDOS

Durante as duas gerações de laboratório, para cada uma das seis populações de *A. sculptum*, amostras de ovos, larvas, ninfas e adultos de ambos os grupos experimentais (infectado e controle) foram processados. A extração de DNA foi feita utilizando isotiocianato de guanidina (SANGIONI et al., 2005) para adultos e para fêmeas ingurgitadas após o final da ovipostura e, método de fervura para ovos, larvas e ninfas segundo protocolo utilizado por Horta et al. (2005), com algumas modificações. Em tal método, os carrapatos macerados em TE (20 a 40µl), mantidos a 100°C por 20 minutos. Após este tempo, as amostras foram submetidas a uma centrifugação rápida ou *spin* (16.100g por 6 segundos) e mantidos a 100°C por mais 10 minutos. Além disso, em todos os animais que foram a óbito antes do 21º dia de infestação, foi realizada necropsia, na qual, fragmentos de baço, fígado e pulmão foram coletados (e estocados a -20° C), além do sangue coletado por punção intracardíaca. Neste caso, após a realização do teste sorológico (ver adiante item 4.6), os animais que apresentaram resultado não reagente ao antígeno de *R. rickettsii*, tiveram os fragmentos de órgãos processados para extração de DNA (*DNeasy Tissue and Blood Kit* - Qiagen, Chatsworth, CA, USA).

As amostras obtidas (carrapatos e/ou tecidos) foram processadas por taqman® PCR em tempo real (7500 Real Time PCR Systems apparatus - Applied BioSystems, Foster City, CA, USA) para pesquisa de bactérias do gênero *Rickettsia*, conforme protocolo previamente estabelecido para detecção de um fragmento de 147-pb do gene *gltA* (LABRUNA et al., 2004).

Após a realização da PCR em tempo real, todas as amostras negativas de carrapatos foram submetidas a PCR convencional cujo alvo foi um fragmento de ~460-pb do gene 16S rDNA mitocondrial de carrapatos (MANGOLD et al., 1998) para validação da extração de DNA e confirmar o resultado negativo na PCR em tempo real. Da mesma forma que com os carrapatos, aquelas amostras de tecidos negativas na PCR em tempo real, foram processadas por uma PCR convencional cujo alvo foi um fragmento de 359-pb do gene citocromo B (CYT B) da mitocôndria de vertebrados (STEUBER et al., 2005).

Ao final de cada geração, adultos positivos na PCR em tempo real foram submetidos a uma PCR convencional para amplificação de um fragmento de 532-pb do gene *ompA* de rickettsias do grupo da febre maculosa, segundo protocolo previamente estabelecido

(REGNERY et al., 1991). Os produtos gerados foram submetidos a sequenciamento de DNA em sequenciador automático (Applied Biosystems/Perkin Elmer, model ABI Prism 310 Genetic, Foster City, California) e as sequências obtidas foram comparadas com as disponíveis no Genbank, através do programa BLAST analysis (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Estes procedimentos foram realizados para confirmação da identidade da *Rickettsia* spp. que estaria infectando os carrapatos do grupo infectado ao final de cada geração de carrapatos.

4.6 SOROLOGIA PARA *Rickettsia rickettsii*

Todos os animais infestados tiveram sangue colhido nos dias 0 e 21 após a infestação. Em coelhos, foi realizada a venopunção auricular (vaso central). Já em cobaias, a colheita do sangue foi feita por punção intracardíaca após sedação dos animais com cloridrato de xilazina 10% (20mg/Kg), cloridrato de cetamina 10% (20mg/Kg) e acepromazina 1% (1mg/Kg). Caso um animal viesse a óbito antes do 21º dia de infestação, era realizada necropsia para coleta de fragmentos de órgãos (item 4.5) e tentativa de coleta de sangue intracardíaca, mas nem sempre esta foi possível nestes casos.

O sangue colhido foi centrifugado a 16.100g por dez minutos para separação do soro. Esses soros foram testados pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) frente a antígeno de *R. rickettsii*. Os procedimentos ocorreram conforme previamente estabelecido, através de antígeno bruto de *R. rickettsii*, obtido do crescimento da bactéria em cultivo de células Vero (HORTA et al., 2004; PACHECO et al., 2007; SOARES et al., 2012).

4.7 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS POPULAÇÕES DE *Amblyomma sculptum* E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Carrapatos das seis populações de *A. sculptum* foram processados por PCR para determinação de sequências de DNA de fragmentos dos genes 16S rDNA mitocondrial, e ITS2 nuclear, conforme previamente descrito (MANGOLD et al., 1998; MARRELLI et al., 2007). As sequências obtidas foram utilizadas para determinação de afinidades filogenéticas das seis populações, conforme previamente descrito para outros carrapatos (LABRUNA et al.,

2005b; MARRELLI et al., 2007; NAVA et al., 2008; VENZAL et al., 2013). Além disso, dentro de cada população de *A. sculptum*, as sequências de DNA dos genes acima referidos foram comparadas entre os carrapatos encontrados positivos na PCR para *Rickettsia* spp. e aqueles negativos, mas que foram expostos à infecção. Assim, objetivou-se verificar possíveis divergências genéticas nos marcadores 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear dentro de uma mesma população de carrapatos.

As sequências nucleotídicas foram editadas no programa SeqMan (Lasergene, DNASTar, Madison, Wisconsin). Posteriormente, estas sequências foram alinhadas utilizando-se o programa CLUSTAL W v.1.81 (THOMPSON et al., 1994) através do software Bioedit v.7.2.5 (HALL, 1999), tomando-se como grupo externo a amostra KF179349 de *A. cajennense* sensu lato (publicado como *A. cajennense*). (OGRZEWALSKA et al., 2014) (somente para o marcador 16S rDNA mitocondrial). O cálculo da matriz de identidade de nucleotídeos foi feito utilizando-se o software Bioedit v.7.2.5 (HALL, 1999).

As inferências filogenéticas das sequências nucleotídicas obtidas do gene 16S rDNA mitocondrial de *A. sculptum* foi realizada mediante uso do programa MEGA versão 7 (TAMURA et al., 2013). A árvore filogenética foi construída com o método de neighbor-joining através do modelo de substituição Tamura 3-parâmetros, sendo também definidos os valores de *bootstrap* a partir de 1.000 repetições, cujos valores maiores ou iguais a 50 foram apresentados próximos aos nós.

Finalmente, as sequências obtidas no presente estudo para o marcador ITS2 nuclear foram comparadas com algumas das geradas no trabalho de Beati et al. (2013), que analisou espécimes do grupo *A. cajennense* de diferentes países e regiões da América Latina.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O número de carrapatos que realizaram ecdise ou ovipostura, as frequências de infecção por perpetuação transestadial ou transmissão transovariana e a taxa de letalidade foram comparados utilizando o teste de Qui Quadrado.

Já os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas nos diversos grupos experimentais (GC, GL, GN e GL/GN) foram analisados através do teste de Kruskal-Wallis e teste de Dunn (optou-se pela estatística não paramétrica pelo fato de nem todos os grupos experimentais

terem passado pelo teste de normalidade D'Agostino-Pearson). Assim, estes resultados estão descritos e ilustrados nos resultados com base na mediana dos dados. Porém, no apêndice B, encontram-se os dados detalhados como média, desvio padrão e variação entre parênteses.

O nível de significância foi determinado em $p < 0,05$ e os programas utilizados foram GraphPad Prism® versão 5.0 (D'Agostino-Pearson, Kruskal-Wallis e Dunn) e Epi Info™ versão 7 (Qui Quadrado).

5 RESULTADOS

5.1 INFECÇÃO EXPERIMENTAL NAS DIFERENTES POPULAÇÕES DE *Amblyomma sculptum*

5.1.1 População de *A. sculptum* de Itu, São Paulo

A população do município de Itu, estado de São Paulo foi proveniente de um condomínio residencial onde ocorreu um caso de FMB em 2012. Os carrapatos (fêmeas ingurgitadas) foram coletados de capivaras, e as larvas resultantes deram início aos experimentos após tais fêmeas serem confirmadas como negativas na PCR em tempo real para *Rickettsia* spp. Infelizmente, o número de carrapatos resultantes da primeira geração de laboratório desta população não foi suficiente para dar continuidade ao protocolo experimental. Por isso, os carrapatos foram alimentados até adultos F₁ e, as larvas resultantes (larvas F₂) foram utilizadas para reiniciar as infestações experimentais. Assim, na comparação dos parâmetros (biológicos e reprodutivos) e das frequências de infecção (perpetuação transtadial e transmissão transovariana) entre as diferentes populações de *A. sculptum*, a população de Itu teve sua segunda geração (F₂) sendo comparada à F₁ das demais populações, e consequentemente, sua terceira geração (F₃) comparada à F₂ das demais populações. Os detalhes das infestações experimentais com a população de *A. sculptum* de Itu encontram-se nas tabelas A, B e C (Apêndice A).

Primeiramente, foram analisadas as frequências de infecção obtidas por perpetuação transtadial e transmissão transovariana após a exposição de diferentes estágios dos carrapatos à infecção por *R. rickettsii* (Tabela 1). A perpetuação da bactéria nos parasitos do estágio de larva para ninfa foi avaliada na segunda geração dos carrapatos no grupo infectado como larva (GL) e na terceira geração, no grupo infectado como larva e, posteriormente reexposto à infecção como ninfa (GL/GN). Os valores encontrados não diferiram significativamente entre estes grupos experimentais, sendo de 16% e 8,3% respectivamente (Tabela 1).

Quando avaliada a perpetuação da bactéria nos carrapatos do estágio de ninfa para adulto, a frequência de infecção encontrada foi significativamente maior em GL/GN

(exposição à infecção como larva e reexposição como ninfa) (60%), se comparado ao GN (exposição à infecção somente como ninfa) (0%), mas sem diferença significativa de GL (exposição à infecção como larva) (33,3%) (Tabela 1). Embora não tenha sido encontrado carrapato infectado no GN, os adultos provenientes deste grupo, quando alimentados em coelhos, foram capazes de transmitir à bactéria, como demonstrado por período febril, reação escrotal, óbito e sorologia reagente para *R. rickettsii* em ambos os coelhos utilizados (COELHO ITU 9 e 10 - Apêndice A - Tabela B).

Outro parâmetro avaliado foi a frequência de transmissão transovariana (FTO) da bactéria nos carrapatos, que reflete a proporção de fêmeas infectadas que deram origem a pelo menos um ovo ou larva infectados [obtida dividindo-se o número de fêmeas com *pool* de ovos positivos na PCR (infectados) sobre o número total de fêmeas infectadas, testadas ao final da ovipostura]. Neste parâmetro não foi encontrada diferença significativa entre GL, GN e GL/GN, sendo os valores respectivamente de 12,5%, 27,3% e 20% ($p>0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1 - Frequência de infecção por perpetuação transtadial e transmissão transovariana (%) de *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* (ITU) após exposição à infecção nos diferentes estágios do carrapato (GL, GN e GL/GN) por duas gerações de laboratório (F_2 e F_3)

Grupo experimental de exposição à infecção por <i>R. rickettsii</i>	Frequência de infecção (Nº PCR positivos/Nº testados)*		
	Perp. Transest. L-N	Perp. Transest. N-A	FTO
GL	16 (4/25) a	33,3 (5/15) a	12,5 (2/16) a
GN	-	0 (0/15) b§	27,3 (3/11) a
GL/GN	8,3 (3/36) a	60 (9/15) a	20 (4/20) a

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; Nº, número; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transtadial; L-N, larva para ninfa; N-A, ninfa para adulto, FTO, frequência de transmissão transovariana.

*Valores apresentados em porcentagem (%).

§Os adultos do GN, ao serem alimentados em coelhos, produziram sinais clínicos e sorologia reagente para *R. rickettsii* nos dois animais infestados.

Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro avaliado (perpetuação transtadial ou transmissão transovariana) diferem estatisticamente ($p<0,05$).

Nos estágios imaturos, foi avaliada a taxa de ecdise dos carrapatos, ou seja, a proporção de larvas ou ninfas ingurgitadas que tiveram sucesso na muda para o estágio posterior. Para as larvas ingurgitadas, a avaliação foi feita em um número de cem (100) carrapatos por cobaia,

totalizando 300 carrapatos (previamente separados nos dias de desprendimento das cobaias). Já as ninfas ingurgitadas foram avaliadas em sua totalidade de carrapatos coletados.

Em ambos os estágios (larvas e ninfas) a taxa de ecdise se mostrou significativamente maior nos carrapatos provenientes do grupo controle (GC), quando comparados aos grupos de exposição à infecção por *R. rickettsii*. Em F₂, 91% das larvas do grupo controle sofreram ecdise e, no grupo infectado (GL) 42% tiveram sucesso na muda ($p<0,05$). Este resultado se repetiu na F₃, sendo a taxa de ecdise igual a 81,3% e 55,3% respectivamente no GC e no GL/GN ($p<0,05$) (Tabela 2).

Para ninfas ingurgitadas, na F₂, a taxa de ecdise no grupo controle foi de 100%, sendo significativamente maior ($p<0,05$) que o grupo infectado como larva (GL) (68,8%) e que o grupo infectado como ninfa (GN) (74,8%), sem diferença significativa entre os dois últimos ($p>0,05$). Na F₃, 95,7% das ninfas do GC mudaram para adultos, valor este significativamente maior que aquele obtido no GL/GN, 87,9% ($p<0,05$) (Tabela 2).

Outro parâmetro avaliado foi a proporção de fêmeas ingurgitadas que realizaram ovipostura. Foram encontrados, na F₂, os valores de 92,9%, 95,5% e 95,2% respectivamente para os grupos GC, GL e GN, sem diferença significativa entre eles ($p>0,05$). Na F₃, o grupo controle teve 100% das fêmeas realizando ovipostura e o GL/GN, 95,5% ($p>0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2 - Sucesso de alimentação, ecdise e postura de carrapatos *A. sculptum* (ITU) nos diversos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GL, GN e GL/GN) ou não exposto à infecção (GC) por duas gerações de laboratório (F₂ e F₃)

Estágio do carrapato-grupo experimental	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (em 300 larvas ou ninfas total) ou fêmeas que ovipuseram (%)
Larvas (F ₂) GC	ND	3923	273 (91) a
Larvas (F ₂) GL	ND	2908	126 (42) b
Ninfas (F ₂) GC	300	242 (80,7)	242 (100) a
Ninfas (F ₂) GL	300	276 (92)	190 (68,8) b
Ninfas (F ₂) GN	300	234 (78)	175 (74,8) b
Fêmeas (F ₂) GC	15	14 (93,3)	13 (92,9) a
Fêmeas (F ₂) GL	30	22 (73,3)	21 (95,5) a
Fêmeas (F ₂) GN	29	21 (72,4)	20 (95,2) a
Larvas (F ₃) GC	ND	2543	244 (81,3) a
Larvas (F ₃) GL/GN	ND	2972	166 (55,3) b
Ninfas (F ₃) GC	300	257 (85,7)	246 (95,7) a
Ninfas (F ₃) GL/GN	300	289 (96,3)	254 (87,9) b
Fêmeas (F ₃) GC	23	19 (86,4)	19 (100) a
Fêmeas (F ₃) GL/GN	30	22 (73,3)	21 (95,5) a

GC, grupo controle (sem exposição à infecção); GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; N^º, número; ND, não determinado.

Letras diferentes dentro do mesmo estágio e geração de carrapatos diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Após a alimentação dos carrapatos adultos, os parâmetros biológicos e reprodutivos das fêmeas ingurgitadas foram comparados entre os diferentes grupos experimentais (GL, GN e GL/GN) e dentro de cada grupo, entre as fêmeas que foram positivas na PCR em tempo real (infectadas) e as negativas (não-infectadas, mas expostas à infecção). Na tabela N (Apêndice B) está detalhada a proporção de fêmeas infectadas e não infectadas dentro dos grupos de exposição a *R. rickettsii*, bem como os parâmetros analisados das fêmeas ingurgitadas. Ressalta-se ainda que, na referida tabela, os parâmetros biológicos e reprodutivos das fêmeas aparecem como média, desvio padrão e variação (entre parênteses) porém, a análise estatística (não paramétrica) destes dados será descrita com base nas figuras 1, 2 e 3 (ver adiante).

No total, o número de fêmeas que ingurgitaram em cada grupo experimental foi de 22 no GL, 21 no GN, 22 no GL/GN e 33 no GC (neste último se inclui as duas gerações de laboratório analisadas). A proporção de fêmeas infectadas foi significativamente maior no GL/GN (90,1%) quando comparada ao GN (52,4%) ($p < 0,05$), mas ambos não diferiram do GL (72,7%) ($p > 0,05$). A frequência de fêmeas com transmissão transovariana não diferiu

significativamente entre os diversos grupos, sendo respectivamente de 12,5%, 27,3% e 20% no GL, GN e GL/GN ($p>0,05$) (como visto anteriormente na tabela 1). A proporção de fêmeas com ovos férteis, ou seja, aquelas cujas posturas geraram pelo menos uma larva, variou de 50 a 90% nos diversos grupos experimentais, mas sem diferença significativa entre fêmeas positivas e negativas de um mesmo grupo e entre os diversos grupos ($p>0,05$) (Apêndice B - Tabela N).

O peso da fêmea ingurgitada variou de 294,8mg (fêmeas positivas do GL) a 486,8mg (fêmeas negativas do GN), não diferindo estatisticamente entre carrapatos positivos e negativos dentro de um mesmo grupo experimental. Entretanto, diferença significativa foi encontrada entre fêmeas infectadas do GL e não-infectadas do GN ($p<0,05$) (Figura 1a).

O peso da massa de ovos variou entre 111,6mg (fêmeas positivas do GL) e 188,4mg (fêmeas negativas do GN), não havendo diferença significativa entre fêmeas positivas e negativas de um mesmo grupo experimental ($p>0,05$). Diferença estatística foi encontrada entre o peso das massas de ovos de fêmeas do grupo controle em relação às fêmeas positivas do GL ($p<0,05$) (Figura 1b).

Tanto o período de alimentação das fêmeas, quanto o período pré-postura, não diferiram significativamente entre os carrapatos positivos e negativos de um mesmo grupo experimental e entre os diversos grupos (GC, GL, GN e GL/GN) ($p>0,05$). Os valores encontrados variaram respectivamente entre 10 e 13,5 dias e, 5,5 e 9 dias. (Figura 2a e 2b). O período de incubação dos ovos (tempo necessário para a eclosão da primeira larva) variou entre 35 e 38,5 dias, não diferindo estatisticamente em nenhum grupo experimental ($p>0,05$) (Figura 2c).

No índice de eficiência da conversão do peso da fêmea em massa de ovos (IECO) também não se observou diferença estatística entre fêmeas positivas e negativas de um mesmo grupo experimental. As medianas deste parâmetro variaram entre 25,98 (fêmeas negativas do GL) e 48,63% (fêmeas positivas do GL/GN), sendo nas fêmeas do grupo controle significativamente maior que nas fêmeas positivas, tanto GL quanto do GN ($p<0,05$) (Figura 3a).

Finalmente, a taxa de eclosão de ovos em larvas diferiu significativamente ($p<0,05$) entre fêmeas positivas e negativas no GN, sendo respectivamente 7,5% e 90%, e ainda, as fêmeas positivas deste grupo tiveram valores significativamente menores que as fêmeas do GC (87,5%). Tanto no GL quanto no GL/GN, não houve diferença estatística significativa entre fêmeas positivas e negativas, sendo 1% e 80% (GL) e 10% e 45% (GL/GN)

respectivamente. No entanto, as fêmeas positivas destes dois grupos também diferiram estatisticamente do valor encontrado para as fêmeas do GC ($p < 0,05$) (Figura 3b).

Figura 1 - (a) peso da fêmea ingurgitada (PFI); (b) peso da massa de ovos (PMO) de carrapatos *A. sculptum* (ITU) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 2 - (a) Período de ingurgitamento (P_{ing}); (b) período pré-postura (P_{pp}) e (c) período de incubação de ovos (P_{inc}) de carrapatos *A. sculptum* (ITU) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Figura 3 - (a) índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em (IECO) e (b) taxa de eclosão de ovos em larvas (Eclo) de carrapatos *A. sculptum* (ITU) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Ao final da segunda geração de laboratório, em duas fêmeas no GL (identificadas como F236 e F251) e em três no GN (identificadas como F271, F273 e F274) (Tabela 3) foi detectada a transmissão da infecção para sua progênie (transmissão transovariana). Entretanto, nestas fêmeas, a taxa de eclosão de larvas obtida foi de 0,5% e 2% (GL) e 0% nas três do GN (dados não mostrados). A frequência de infecção filial para ovos e larvas das fêmeas do GL foi 100% e, para o GN, a frequência de infecção filial para os ovos variou entre 90 e 100% nas três fêmeas (Tabela 3).

As larvas provenientes das duas fêmeas com transmissão transovariana do GL, mesmo sendo em baixo número, foram colocadas para alimentação em duas cobaias diferentes, porém, em nenhuma delas houve fixação dos carrapatos, que morreram sem se alimentar (dados não mostrados). Assim, não foi possível determinar se tais larvas seriam competentes na transmissão de *R. rickettsii*, adquirida via transmissão transovariana.

Por outro lado, ao final da terceira geração (F₃), quatro em vinte fêmeas positivas (20%) fizeram transmissão transovariana no GL/GN, identificadas como F740, F750, F752 e F756 (Tabela 3). A frequência de infecção filial para ovos foi de 100% nas três primeiras e de 0% na última. Para larvas, a frequência de infecção filial foi de 100% nas duas primeiras e de 0% na última (a fêmea F752 teve eclosão nula, não sendo possível se determinar a frequência de infecção filial para larvas) (Tabela 3).

Tabela 3 - Frequência de infecção filial (FIF) (%) para ovos e larvas de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (ITU) com transmissão transovariana nos diversos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GL, GN e GL/GN)

Grupo experimental	FTO (%)	FIF (%)	
		Ovos	Larvas
GL	12,5 (2/16)	Fêmea 236: 100 (10/10)	Fêmea 236: 100 (10/10)
		Fêmea 251: 100 (10/10)	Fêmea 251: 100 (10/10)
GN	27,3 (3/11)	Fêmea 271: 100 (10/10)	*
		Fêmea 273: 90 (9/10)	*
		Fêmea 274: 100 (10/10)	*
GL/GN	20 (4/20)	Fêmea 740: 100 (10/10)	Fêmea 740: 100 (10/10)
		Fêmea 750: 100 (10/10)	Fêmea 750: 100 (10/10)
		Fêmea 752: 100 (10/10)	*
		Fêmea 756: 0 (0/10)	Fêmea 756: 0 (0/10)

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; FTO, frequência de transmissão transovariana.

*Taxa de eclosão nula (larvas não testadas).

As larvas provenientes de duas fêmeas do GL/GN (F740 e F750) foram colocadas para se alimentar em duas cobaias (COBAIA ITU 37 e COBAIA ITU 38, respectivamente - Tabela C - Apêndice 1) que apresentaram período febril, reação escrotal e, uma delas foi a óbito. Além disso, na sorologia para *R. rickettsii*, estes animais apresentaram títulos iguais a 4096 e 2048 (COBAIA ITU 37 e 38, respectivamente). As larvas ingurgitadas recuperadas destas cobaias foram acompanhadas para avaliação do sucesso de ecdise, que foi 12,5% e 31,3% (Tabela 4). Após a ecdise, as ninfas foram estadas por PCR em tempo real e a frequência de infecção encontrada foi de 100% em ambos os lotes (F740 e F 750) (Tabela 4).

As ninfas resultantes da cobaia ITU 38 (F750), foram posteriormente alimentadas em outra cobaia (COBAIA ITU 39), que também apresentou período febril, reação escrotal e reação sorológica reagente no dia 21 com o título de 4096 (Tabela C - Apêndice 1). Após a ecdise destas ninfas em adultos, cujo sucesso foi de 81,8%, 100% dos carrapatos testados se mostraram infectados na PCR em tempo real (Tabela 4).

Tabela 4 - Sucesso de alimentação e ecdise de carrapatos *A. sculptum* (ITU) de quarta geração (F4) resultantes de duas fêmeas (F740 e F750) com transmissão transovariana (TOT) no GL/GN

Estágio do carrapato-origem	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (%)	Perp. Transest. (%)
Larvas (F ₄) F740	ND	16	2 (12,5)	2/2 (100)
Larvas (F ₄) F750	ND	99	31 (31,3)	5/5 (100)
Ninfas (F ₄) F750	29	22 (75,9)	18 (81,8)	11/11 (100)

GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transestadial.

5.1.2 População de *A. sculptum* de Piracicaba, São Paulo

A população de *A. sculptum* de Piracicaba foi obtida por uma coleta de campo no interior do Campus da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" (ESALQ), Universidade de São Paulo. Dos carrapatos adultos trazidos do campo, vinte casais foram alimentados em um coelho. Após a confirmação laboratorial de que estes carrapatos não estavam infectados com *R. rickettsii* (sorologia não reagente do coelho utilizado e processamento de todas as fêmeas ingurgitadas por extração de DNA e PCR em tempo real), as larvas resultantes destas fêmeas foram utilizadas para dar início ao protocolo experimental

com esta população de carrapatos (gerações F₁ e F₂). Os resultados das infestações experimentais com a população de *A. sculptum* de Piracicaba encontram-se detalhados nas tabelas D e E (Apêndice A).

Após a ecdise de cada estágio alimentado em cobaias (larvas e ninfas) nos grupos de exposição à infecção por *R. rickettsii*, foi determinada a proporção de carrapatos infectados (perpetuação transtestadial). Ao final das gerações, nas fêmeas ingurgitadas e seus respectivos *pool* de ovos testados ao final da ovipostura, foi determinada a frequência de transmissão transovariana (Tabela 4).

A frequência de perpetuação transtestadial de larva para ninfa foi avaliada em F₁ (GL) e em F₂ (GL/GN), e os valores encontrados foram 2,5% e 10% respectivamente, sem diferença estatística entre eles ($p>0,05$) (Tabela 5). Já a perpetuação de *R. rickettsii* nos carrapatos do estágio de ninfa para adulto, foi avaliada na primeira geração dos carrapatos (GL e GN) e na segunda geração (GL/GN) e, em ambas, não foi detectado carrapato positivo na PCR em tempo dentre os testados (0/10, 0/30 e 0/30 respectivamente) (Tabela 5). No GL e no GN, todas as fêmeas alimentadas nestes coelhos foram testadas ao final da ovipostura, sendo que nenhuma se mostrou positiva para *Rickettsia* spp. na PCR em tempo real (0/23 e 0/24 respectivamente no GL e GN) (Apêndice B - Tabela O). Consequentemente, a frequência de transmissão transovariana na população de *A. sculptum* (PIC) foi nula na primeira geração (Tabela 5). No GL/GN, apesar da frequência de infecção nos carrapatos adultos ter sido nula (0/30), quando alimentados em coelhos, a presença de infecção nos adultos do GL/GN pôde ser comprovada pelo desenvolvimento de sinais clínicos compatíveis com riquetsiose e sorologia reagente em um dos três coelhos infestados. Ainda, duas (em vinte e seis) fêmeas do GL/GN se mostraram positivas na PCR em tempo real; ambas foram provenientes do mesmo coelho (COELHO PIC 15), o único a apresentar período febril, reação escrotal e sorologia reagente para *R. rickettsii* no 21º dia após infestação (Apêndice A - Tabela E). Entretanto, em nenhuma das duas fêmeas foi observada transmissão transovariana (Tabela 5).

Tabela 5 - Frequência de infecção por perpetuação transtestadial e transmissão transovariana (%) de *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* (PIC) após exposição à infecção nos diferentes estágios do carrapato (GL, GN e GL/GN) por duas gerações de laboratório (F1 e F2)

Grupo experimental de exposição à infecção por <i>R. rickettsii</i>	Frequência de infecção (Nº PCR positivos/Nº testados)*		
	Perp. Transest. L-N	Perp. Transest. N-A	FTO
GL	2,5 (1/40) a	0 (0/10)	0
GN	-	0 (0/30)	0
GL/GN	10 (3/30) a	0 (0/30) §	0 (0/2)

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; Nº, número; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transtestadial; L-N, larva para ninfa; N-A, ninfa para adulto, FTO, frequência de transmissão transovariana, NP, dados não processados.

*Valores apresentados em porcentagem (%).

§Os adultos do GL/GN, ao serem alimentados em coelhos, produziram sinais clínicos e sorologia reagente para *R. rickettsii* em um (de três) animais infestados.

Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro avaliado (perpetuação transtestadial ou transmissão transovariana) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A avaliação do sucesso tanto na taxa de ecdise dos carrapatos quanto da ovipostura das fêmeas encontram-se na tabela 5. Na primeira geração (F₁), o número de carrapatos que fizeram muda de larva para ninfa não diferiu significativamente entre o grupo controle (GC) e o grupo infectado como larva (GL), sendo 89% e 88% respectivamente ($p > 0,05$). De ninfas para adultos, os valores encontrados para taxa de ecdise foi de 99,6%, 95,6% e 100% respectivamente para os grupos GC, GL e GN, sendo o valor encontrado para o GL significativamente menor que os valores de GC e GN ($p < 0,05$) (Tabela 6).

O número de fêmeas que fizeram ovipostura na F₁ não diferiu significativamente nos diversos grupos experimentais, sendo 100% tanto no GC quanto no GN e, 95,7% no GL (Tabela 6).

Por outro lado, na segunda geração dos carrapatos (F₂), uma taxa de ecdise significativamente menor foi encontrada para carrapatos do GL/GN quando comparados aos do GC, sendo 53% e 91,3% respectivamente ($p < 0,05$) (Tabela 6). Da mesma forma, diferença significativa ($p < 0,05$) foi encontrada na taxa de ecdise de ninfas para adultos entre o GC e o GL/GN (99,3% e 94,1% respectivamente).

Não foi observada diferença significativa no número de fêmeas F₂ que realizaram a ovipostura entre carrapatos do GC e GL/GN, sendo 90% e 88,5% respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6 - Sucesso de alimentação, ecdise e postura de carrapatos *A. sculptum* (PIC) nos diversos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GL, GN e GL/GN) ou não exposto à infecção (GC) por duas gerações de laboratório (F1 e F2)

Estágio do carrapato/grupo experimental	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (em 300 larvas ou ninfas total) ou fêmeas que ovipuseram (%)
Larvas (F ₁) GC	ND	3245	267 (89) a
Larvas (F ₁) GL	ND	2935	264 (88) a
Ninfas (F ₁) GC	300	256 (85,3)	255 (99,6) a
Ninfas (F ₁) GL	300	270 (90)	258 (95,6) b
Ninfas (F ₁) GN	300	272 (90,7)	272 (100) a
Fêmeas (F ₁) GC	25	24 (96)	24 (100) a
Fêmeas (F ₁) GL	26	23 (88,5)	22 (95,7) a
Fêmeas (F ₁) GN	24	24 (100)	24 (100) a
Larvas (F ₂) GC	ND	3503	274 (91,3) a
Larvas (F ₂) GL/GN	ND	3239	159 (53) b
Ninfas (F ₂) GC	300	280 (93,3)	278 (99,3) a
Ninfas (F ₂) GL/GN	300	269 (89,7)	253 (94,1) b
Fêmeas (F ₂) GC	20	20 (100)	18 (90) a
Fêmeas (F ₂) GL/GN	30	26 (86,7)	23 (88,5) a

GC, grupo controle (sem exposição à infecção); GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; N^o, número; ND, não determinado, NP, dados não processados.

Letras diferentes dentro do mesmo estágio e geração de carrapatos diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Com relação aos parâmetros biológicos e reprodutivos das fêmeas ingurgitadas alimentadas em coelhos, os resultados estão ilustrados nas figuras 4, 5 e 6 (ver adiante) e detalhados na Tabela O (Apêndice B).

Ao final da primeira geração (F₁), o número de fêmeas recuperadas no GL foi de 23 e 24 no GN. Nenhuma fêmea destes grupos de exposição à infecção (GL e GN) se mostrou positiva na PCR em tempo real (testadas ao final da ovipostura). E, conseqüentemente, a frequência de transmissão transovariana na F₁ foi nula, tanto para carrapatos infectados como larva (GL) quanto para aqueles infectados como ninfas (GN) (Apêndice B - Tabela O). Na F₂ (GL/GN), apesar de 7,7% (2/26) das fêmeas se mostrarem infectadas na PCR, em nenhuma das duas foi verificado transmissão transovariana (Apêndice B - Tabela O). A porcentagem de fêmeas com massa de ovos férteis não diferiu significativamente entre os grupos experimentais e nem entre fêmeas positivas e negativas do GL/GN, variando de 50% a 95,8% ($p > 0,05$) (Apêndice B - Tabela O).

Os valores encontrados para a mediana do peso da fêmea ingurgitada variou de 512,6mg (fêmeas infectadas do GL/GN) a 906,3mg (fêmeas não infectadas do GN), mas diferença significativa foi encontrada somente entre as últimas e as não infectadas do GL/GN (632,2mg) ($p < 0,05$) (Figura 4a).

No peso da massa de ovos, os valores encontrados variaram de 192,0mg nas fêmeas positivas do GL/GN a 452,1mg, nas negativas do GN, sendo que diferença significativa ($p < 0,05$) foi encontrada somente entre as fêmeas negativas do GL/GN (259,0mg) e as do GC (448,4mg) (Figura 4b).

Tanto o período de ingurgitamento das fêmeas quanto de incubação dos ovos não apresentaram diferença significativa entre diversos grupos experimentais ($p > 0,05$), variando entre 8 e 11 dias (P ing) e 34,5 e 36 dias (P inc), respectivamente (Figura 5a e 5c). Já o período pré-postura variou de 6 a 7 dias, mas diferença significativa foi encontrada entre as fêmeas expostas à infecção (mas negativas) na F_1 (GL e GN) e as do grupo controle (Figura 5b).

Por fim, no índice de eficiência da conversão do peso da fêmea em massa de ovos (IECO), os valores da mediana variaram de 37,44 (GL/GNpos) a 51,34% (GC), mas diferença estatística foi encontrada somente entre as últimas e as negativas do GL/GN (41,63%) ($p < 0,05$) (Figura 6a). E a taxa de eclosão de ovos em larvas variou de 55% a 90% respectivamente no GLneg e GC, sendo estes dois grupos os únicos diferentes estatisticamente entre si ($p < 0,05$) (Figura 6b).

Figura 4 - (a) peso da fêmea ingurgitada (PFI); (b) peso da massa de ovos (PMO) de carrapatos *A. sculptum* (PIC) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 5 - (a) Período de ingurgitamento (P ing); (b) período pré-postura (Ppp) e (c) período de incubação de ovos (P inc) de carrapatos *A. sculptum* (PIC) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 6 - (a) índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em (IECO) e (b) taxa de eclosão de ovos em larvas (Eclo) de carrapatos *A. sculptum* (PIC) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Ao final das duas gerações de laboratório, em nenhum dos grupos expostos à infecção por *R. rickettsii* houve manutenção da infecção. Na F_1 , nenhuma fêmea recuperada se mostrou positiva na PCR em tempo real. Na F_2 (GL/GN), embora duas fêmeas foram detectadas como infectadas, dos ovos provenientes de tais fêmeas não foi possível detectar infecção (testados em *pool*).

5.1.3 População de *A. sculptum* de Pirassununga, São Paulo

Carrapatos *A. sculptum* de Pirassununga foi obtida no Campus Fernando Costa, da Universidade de São Paulo. Da mesma forma que com os carrapatos de Piracicaba, dos carrapatos adultos trazidos do campo, vinte casais foram alimentados em um coelho e as larvas resultantes foram utilizadas para iniciar os experimentos (após confirmação de que nenhuma fêmea e postura eram positivas e que o coelho utilizado não apresentou reação sorológica frente ao antígeno de *R. rickettsii*). Os carrapatos foram mantidos durante primeira e segunda gerações (F_1 e F_2). Nas tabelas F e G (Apêndice A) estão os detalhes das infestações experimentais com a população de *A. sculptum* de Pirassununga.

A frequência de perpetuação transestadial encontrada de larva para ninfa foi de 1,8% na F_1 (GL) e 0% na F_2 (GL/GN) ($p > 0,05$) (Tabela 7). De ninfa para adulto, a frequência de infecção por perpetuação transestadial foi de 0%, 10,7% e 66,7% respectivamente para GL, GN e GL/GN, sendo os dois primeiros valores significativamente menores que o último ($p < 0,05$) (Tabela 7). O fato de não ter sido encontrado carrapatos adultos infectados no GL, não refletiu a real frequência de infecção neste grupo, pois quando alimentados em dois coelhos, foram capazes de transmitir a bactéria, como comprovado por período febril, reação escrotal e título sorológico reagente para *R. rickettsii* em um dos dois animais infestados (COELHO PIS 5 - Apêndice A - Tabela F).

Todas as fêmeas alimentadas nos coelhos foram testadas ao final da ovipostura e, daquelas encontradas positivas, foram testados *pools* de seus ovos. No GL, onze fêmeas foram positivas e destas, duas tiveram *pool* de ovos positivos na PCR (frequência de transmissão transovariana de 18,2%). Este valor não diferiu estatisticamente do encontrado no GN, 6,7% (uma fêmea com *pool* de ovos positivos em um total de quinze fêmeas positivas) e

do GL/GN, 15,8% (três fêmeas com *pool* de ovos positivos dentre as quinze positivas na PCR em tempo real) ($p>0,05$) (Tabela 7).

Tabela 7 - Frequência de infecção por perpetuação transestadial e transmissão transovariana (%) de *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* (PIS) após exposição à infecção nos diferentes estágios do carrapato (GL, GN e GL/GN) por duas gerações de laboratório (F_1 e F_2)

Grupo experimental de exposição à infecção por <i>R. rickettsii</i>	Frequência de infecção (Nº PCR positivos/Nº testados)*		
	Perp. Transest. L-N	Perp. Transest. N-A	FTO
GL	1,8 (1/55) a	0 (0/25) a§	18,2 (2/11) a
GN	-	10,7 (3/28) a	6,7 (1/15) a
GL/GN	0 (0/10) a	66,7 (20/30) b	15,8 (3/19) a

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; Nº, número; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transestadial; L-N, larva para ninfa; N-A, ninfa para adulto, FTO, frequência de transmissão transovariana, NP, dados não processados.

*Valores apresentados em porcentagem (%).

§Os adultos do GL, ao serem alimentados em coelhos, produziram sinais clínicos e sorologia reagente para *R. rickettsii* em um (de dois) animais infestados.

Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro avaliado (perpetuação transestadial ou transmissão transovariana) diferem estatisticamente ($p<0,05$).

Os resultados obtidos na avaliação do sucesso na muda e postura dos carrapatos estão na tabela 8. Os valores encontrados para taxa de ecdise de larva para ninfa na F_1 foram de 86,7% e 82,3% respectivamente para GC e GL, sem diferença significativa ($p>0,05$). Porém, de ninfa para adulto, uma proporção significativamente menor de carrapatos sofreram ecdise no GL (93,5%), quando comparados ao GC (100%) e GN (99,5%) ($p<0,05$), estes dois últimos sem diferença significativa entre eles ($p>0,05$). Ainda na primeira geração (F_1), o número de fêmeas que realizaram postura não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, sendo 96,6% no GC, 100% no GL e 96,7% no GN ($p>0,05$) (Tabela 8).

Na F_2 , a taxa de ecdise das larvas foi significativamente menor no GL/GN, quando comparado ao GC (58,7% e 94,3% respectivamente) ($p<0,05$). Nas ninfas, este parâmetro não diferiu significativamente entre os grupos (100% para GC e GL/GN), bem como a proporção de fêmeas que fizeram ovipostura, sendo 94,7 e 92,9 % no GC e GL/GN respectivamente ($p>0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Sucesso de alimentação, ecdise e postura de carrapatos *A. sculptum* (PIS) nos diversos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GL, GN e GL/GN) ou não exposto à infecção (GC) por duas gerações de laboratório (F1 e F2)

Estágio do carrapato-grupo experimental	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (em 300 larvas ou ninfas total) ou fêmeas que ovipuseram (%)
Larvas (F ₁) GC	ND	3431	260 (86,7) a
Larvas (F ₁) GL	ND	3566	247 (82,3) a
Ninfas (F ₁) GC	300	204 (68)	204 (100) a
Ninfas (F ₁) GL	300	248 (82,7)	232 (93,5) b
Ninfas (F ₁) GN	300	210 (70)	209 (99,5) a
Fêmeas (F ₁) GC	30	29 (96,7)	28 (96,6) a
Fêmeas (F ₁) GL	31	30 (96,8)	30 (100) a
Fêmeas (F ₁) GN	30	30 (100)	29 (96,7) a
Larvas (F ₂) GC	ND	3718	283 (94,3) a
Larvas (F ₂) GL/GN	ND	3699	176 (58,7) b
Ninfas (F ₂) GC	270	192 (71,1)	192 (100) a
Ninfas (F ₂) GL/GN	270	212 (78,5)	212 (100) a
Fêmeas (F ₂) GC	20	19 (95)	18 (94,7) a
Fêmeas (F ₂) GL/GN	30	28 (93,3)	26 (92,9) a

GC, grupo controle (sem exposição à infecção); GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; N^o, número; ND, não determinado.

Letras diferentes dentro do mesmo estágio e geração de carrapatos diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os parâmetros avaliados de fêmeas ingurgitadas encontram-se ilustrados nas figuras 7, 8 e 9 (ver adiante) e detalhados na tabela P (Apêndice B).

No total, 30 fêmeas ingurgitaram no GL, 30 no GN, 28 no GL/GN e 48 no GC (carrapatos da F₁ e da F₂). O número de fêmeas infectadas nos grupos de exposição à infecção foi significativamente maior no GL/GN (67,9%) quando comparado a GL (36,7%) ($p < 0,05$). No GN, 50% das fêmeas foram detectadas infectadas, mas este valor não diferiu estatisticamente dos outros dois grupos ($p > 0,05$) (Apêndice B - Tabela P).

A proporção de fêmeas que fizeram transmissão transovariana da bactéria não diferiu significativamente entre os grupos experimentais, sendo respectivamente de 18,2%, 6,7% e 15,8% no GL, GN, e GL/GN ($p > 0,05$) (Apêndice B - Tabela P).

Por outro lado, a proporção de fêmeas com massa de ovos férteis foi significativamente maior no GC (96,4%) que nas fêmeas positivas do GL (63,6%) ($p < 0,05$), mas ambas sem diferença estatística dos demais grupos (89,5% nas fêmeas negativas do GL, 92,9% nas positivas do GN, 86,7% nas fêmeas negativas no GN, 94,4% nas positivas do GL/GN e 100%

nas negativas do GL.GN) ($p>0,05$). Neste parâmetro também não houve diferença significativa entre fêmeas positivas e negativas de um mesmo grupo experimental ($p>0,05$) (Apêndice B - Tabela P).

O peso da fêmea ingurgitada não diferiu estatisticamente entre fêmeas positivas e negativas de um mesmo grupo experimental; mas o valor da mediana encontrado nas fêmeas negativas do GL (533,9mg) foi significativamente menor quando comparado ao valor encontrado para as fêmeas negativas do GN (896,2mg) e para as do GC (855,5mg) ($p<0,05$). Nos demais grupos, este parâmetro não diferiu significativamente ($p>0,05$) (Figura 7a).

No peso da massa de ovos, diferença estatística foi encontrada entre as fêmeas do GL (280,0mg e 247,0mg respectivamente para as fêmeas negativas e positivas) e as fêmeas do GC (449,0mg) ($p<0,05$), embora os demais grupos não tenham diferido significativamente destes valores (Figura 7b).

O período de ingurgitamento das fêmeas variou entre 8 e 10 dias, mas diferença significativa foi encontrada quando as fêmeas positivas do GL (10 dias) foram comparadas às fêmeas positivas e negativas do GL/GN (respectivamente 9 e 8 dias) e as do GC, 8 dias ($p<0,05$). Além disso, o valor encontrado para as fêmeas negativas do GL (10 dias) também diferiu estatisticamente dos valores encontrado para as fêmeas positivas do GL/GN e para as do GC ($p<0,05$) (Figura 8a).

O valor encontrado para a mediana do período de pré-postura variou entre 6 e 7 dias e não diferiu significativamente entre os diferentes grupos experimentais ($p>0,05$) (Figura 8b). O período de incubação dos ovos também não diferiu estatisticamente entre os diversos grupos ($p>0,05$), variando de 38 dias a 40 dias (Figura 8c).

O valor encontrado para a mediana do índice de eficiência da conversão de peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos (IECO) teve seu menor valor (35,64%) nas fêmeas positivas do GL, valor este significativamente diferente daquele encontrado para as fêmeas positivas do GL/GN (53,29%) e para as do GC (54,41%) ($p<0,05$). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas se comparado a estes valores ($p>0,05$) (Figura 9a).

Por fim, a taxa de eclosão de ovos em larvas variou de forma similar entre as fêmeas positivas e negativas de um mesmo grupo, mas diferença significativa foi encontrada entre as fêmeas positivas do GL e as fêmeas do GC (10% e 90% respectivamente) ($p<0,05$) (Figura 9b).

Figura 7 - (a) peso da fêmea ingurgitada (PFI); (b) peso da massa de ovos (PMO) de carrapatos *A. sculptum* (PIS) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 8 - (a) Período de ingurgitamento (P ing); (b) período pré-postura (Ppp) e (c) período de incubação de ovos (P inc) de carrapatos *A. sculptum* (PIS) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 9 - (a) índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em (IECO) e (b) taxa de eclosão de ovos em larvas (Eclo) de carrapatos *A. sculptum* (PIS) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Ao final da primeira geração de laboratório, 36,7% das fêmeas do GL (11/30 testadas) foram positivas, e destas, 18,2% tiveram *pool* de ovos positivos, ou seja, transmissão transovariana. Ambas as fêmeas, identificadas como F235 e F236 tiveram uma amostra de seus ovos testados individualmente e a frequência de infecção filial encontrada foi de 10% e 0% respectivamente (Tabela 9). Porém, a taxa de eclosão de ovos em larvas nestas duas

fêmeas foi nula (0%), não sendo testados desta forma a frequência de infecção filial para as larvas (Tabela 9).

No GN, 50% (15/30) das fêmeas que se alimentaram nos coelhos foram positivas na PCR em tempo real. No entanto, das quinze fêmeas, somente em uma (6,7%) foi verificada transmissão transovariana (Tabela 9). Esta fêmea, identificada como F270 teve taxa de eclosão de larvas igual a 50% (dados não mostrados), assim, teve amostras de seus ovos e larvas testados individualmente e a frequência de infecção filial encontrada para ovos e larvas foi de 50% e 10% respectivamente (Tabela 9).

Na F₂, 67,9% das fêmeas testadas (19/28) foram positivas na PCR em tempo real, e destas, 15,8% (3/19) tiveram *pool* de ovos testados também positivos. Tais fêmeas, identificadas como F419, F423 e F442 tiveram amostras individuais de ovos testados, e a frequência de infecção filial encontrada foi respectivamente de 80%, 100% e 60% (Tabela 9). Para larvas a frequência de infecção filial encontrada foi 50% para todas as fêmeas (Tabela 9).

Tabela 9 - Frequência de infecção filial (FIF) (%) para ovos e larvas de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (PIS) com transmissão transovariana nos diversos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GL e GN)

Grupo experimental	FTO (%)	FIF (%)	
		Ovos	Larvas
GL	18,2 (2/11)	Fêmea 235: 10 (1/10)	*
		Fêmea 236: 0 (0/10)	*
GN	6,7 (1/15)	Fêmea 270: 50 (5/10)	Fêmea 270: 10 (1/10)
GL/GN	15,8 (3/19)	Fêmea 419: 80 (8/10)	Fêmea 419: 50 (5/10)
		Fêmea 423: 100 (10/10)	Fêmea 423: 50 (5/10)
		Fêmea 442: 60 (6/10)	Fêmea 442: 50 (5/10)

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; FTO, frequência de transmissão transovariana.

*Taxa de eclosão nula (larvas não testadas).

As larvas e, posteriormente as ninfas provenientes da fêmea F270 foram colocadas para se alimentar em cobaias (COBAIAS PIS 22 - larvas e PIS 28 - ninfas, Apêndice A - Tabela G), que apresentaram febre, reação escrotal e sorologia reagente frente ao antígeno de *R. rickettsii* (Apêndice A - Tabela G) Estes carrapatos foram acompanhados para verificar o sucesso na ecidse e os valores encontrados foram respectivamente 44,5% e 100% para ecidse de larvas-ninfas e ninfas-adultos. Posteriormente, os adultos obtidos foram testados por PCR em tempo real, resultando em uma frequência de infecção de 70% (7/10) (Tabela 10).

Tabela 10 - Sucesso de alimentação e ecdise de carrapatos *A. sculptum* (PIS) de segunda geração (F2) resultantes de uma fêmea (F270) com transmissão transovariana (TOT) no GN

Estágio do carrapato-origem	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (%)	Perp. Transest. (%)
Larvas (F ₂) F270	ND	272	121 (44,5)	2/9 (22,2)
Ninfas (F ₂) F270	100	87 (75,9)	87 (100)	7/10 (70)

GN, grupo infectado como ninfa; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transestadial.

5.1.4 População de *A. sculptum* de Poconé, Mato Grosso

A colônia de *A. sculptum* de Poconé foi obtida em coleta de campo na Base Avançada de Pesquisas no Pantanal, da Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT). Carrapatos adultos provenientes desta coleta foram alimentados em um coelho e, do número total de fêmeas ingurgitadas, dez foram testadas (e negativas) por PCR em tempo real. A sorologia do coelho em questão foi não reagente no 21º dia após a infestação. Desta forma, larvas provenientes destas fêmeas testadas deram início ao protocolo experimental. Foram avaliadas a primeira e a segunda geração de laboratório desta colônia. Nas tabelas H e I (Apêndice A) estão detalhados os resultados da infestação/infecção experimental com a população de *A. sculptum* PAN.

Na primeira geração de laboratório, a frequência de infecção por perpetuação transestadial de larva para ninfa foi de 1,25% (GL). Na F₂ (GL/GN), não foi encontrada ninfa positiva dentre as testadas após as larvas serem expostas à infecção, mas estes valores não diferiram significativamente ($p>0,05$) (Tabela 11).

Já a perpetuação transestadial da bactéria nos carrapatos de ninfa para adulto foi nula, tanto no GL quanto no GN, assim, na F₁ desta população, não houveram fêmeas positivas (testadas ao final da ovipostura) e nem transmissão transovariana de *R. rickettsii* (Tabela 11). Isto pôde ser demonstrado também pela ausência de sinais clínicos (período febril e reação escrotal) e sorologia reagente nos coelhos utilizados para alimentar tais carrapatos (COELHOS PAN 4, 5, 6 e 7 - Apêndice A - Tabela H). Por outro lado, na segunda geração dos carrapatos (exposição à infecção como larvas e reexposição como ninfas - GL/GN) foram encontrados 20% dos adultos sendo infectados, mas este valor não diferiu da frequência de infecção do GL e do GN (0%) ($p>0,05$) (Tabela 11).

Ao final da postura das fêmeas F₂ (GL/GN), estas foram testadas por PCR juntamente com seus respectivos *pool* de ovos. Em oito fêmeas encontradas positivas, somente uma (12,5%) teve *pool* de ovos também positivos (Tabela 11).

Tabela 11 - Frequência de infecção por perpetuação transtadial e transmissão transovariana (%) de *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* (PAN) após exposição à infecção nos diferentes estágios do carrapato (GL, GN e GL/GN) por duas gerações de laboratório (F1 e F2)

Grupo experimental de exposição à infecção por <i>R. rickettsii</i>	Frequência de infecção (Nº PCR positivos/Nº testados)*		
	Perp. Transest. L-N	Perp. Transest. N-A	FTO
GL	1,25 (1/80) a	0 (0/20) a	0
GN	-	0 (0/15) a	0
GL/GN	0 (0/15) a	20 (3/15) a	12,5 (1/8)

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; Nº, número; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transtadial; L-N, larva para ninfa; N-A, ninfa para adulto, FTO, frequência de transmissão transovariana.

*Valores apresentados em porcentagem (%).

Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro avaliado (perpetuação transtadial ou transmissão transovariana) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Na primeira geração dos carrapatos, larvas do GL tiveram um menor sucesso de ecdise (63,7%) quando comparadas às do GC (72,3%) ($p < 0,05$). O mesmo ocorreu para ninfas do GL, das quais 91,2% sofreram ecdise, contra 97,6% do GC e 93,6% do GN, este último sem diferença significativa de GC e GL ($p > 0,05$). Já o sucesso na realização de postura pelas fêmeas foi de 100% nos três grupos experimentais ($p > 0,05$) (Tabela 12).

Na F₂, as larvas do GL/GN tiveram uma significativa redução na taxa de ecdise (62%) em comparação ao GC (87,7%) ($p < 0,05$), embora as ninfas desta geração não tenham apresentado diferença significativa neste parâmetro (95% no GC e 96,3% no GL/GN) ($p > 0,05$). Não houve diferença estatística no sucesso da ovipostura entre fêmeas do GC e GL/GN (96% e 95% respectivamente) ($p > 0,05$) (Tabela 12).

Tabela 12 - Sucesso de alimentação, ecdise e postura de carrapatos *A. sculptum* (PAN) nos diversos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GL, GN e GL/GN) ou não exposto à infecção (GC) por duas gerações de laboratório (F1 e F2)

Estágio do carrapato-grupo experimental	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (em 300 larvas ou ninfas total) ou fêmeas que ovipuseram (%)
Larvas (F ₁) GC	ND	3360	217 (72,3) a
Larvas (F ₁) GL	ND	3475	191 (63,7) b
Ninfas (F ₁) GC	300	207 (69)	202 (97,6) a
Ninfas (F ₁) GL	300	204 (68)	186 (91,2) b
Ninfas (F ₁) GN	300	171 (57)	160 (93,6) ab
Fêmeas (F ₁) GC	26	20 (76,9)	20 (100) a
Fêmeas (F ₁) GL	40	37 (92,5)	37 (100) a
Fêmeas (F ₁) GN	20	15 (75)	15 (100) a
Larvas (F ₂) GC	ND	2673	263 (87,7) a
Larvas (F ₂) GL/GN	ND	3642	186 (62) b
Ninfas (F ₂) GC	300	260 (86,7)	247 (95) a
Ninfas (F ₂) GL/GN	300	245 (81,7)	236 (96,3) a
Fêmeas (F ₂) GC	30	25 (83,3)	24 (96) a
Fêmeas (F ₂) GL/GN	30	20 (66,7)	19 (95) a

GC, grupo controle (sem exposição à infecção); GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; N^o, número; ND, não determinado.

Letras diferentes dentro do mesmo estágio e geração de carrapatos diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Os parâmetros avaliados nas fêmeas ingurgitadas se encontram-se detalhados na tabela Q (Apêndice B) e serão descritos e ilustrados a seguir nas figuras 10, 11 e 12.

No total, 37 fêmeas ingurgitaram no GL, 15 no GN (ambos na F₁), 20 no GL/GN (F₂) e 45 no GC (F₁ e F₂) (Apêndice B - Tabela Q). O número de fêmeas infectadas foi significativamente maior na F₂ (40% - 8/20) quando comparado aos grupos da F₁ (0%) ($p < 0,05$), já que não foi detectada nenhuma fêmea infectada no GL e GN (Apêndice B - Tabela Q). Assim, transmissão transovariana foi observada somente na F₂ e em 12,5% das fêmeas infectadas (uma em oito) (Apêndice B - Tabela Q).

A proporção de fêmeas com massa de ovos férteis foi significativamente menor ($p < 0,05$) nas fêmeas positivas do GL/GN (66,7%) quando comparado à proporção encontrada nas fêmeas negativas do GL (97,3%), mas sem diferir significativamente dos demais grupos (80% nas fêmeas negativas do GN, 83,3 nas fêmeas negativas do GL/GN e 95,5% no GC). ($p > 0,05$) (Apêndice B - Tabela Q).

A mediana do peso da fêmea ingurgitada variou de 545,5mg (fêmeas negativas do GN) 738,8mg (fêmeas negativas do GL/GN), sem diferença estatística nos diversos grupos ($p>0,05$) (Figura 10a). Os valores encontrados para peso da massa de ovos também não diferiram significativamente entre os diversos grupos ($p>0,05$), mas teve seu o menor valor da mediana nas fêmeas positivas do GL/GN (232,8mg) e o maior nas fêmeas negativas do GL (350,3mg) (Figura 10b).

Dentre os parâmetros analisados em dias, que incluem período de alimentação, de pré-postura e de incubação dos ovos, em nenhum deles houve diferença significativa entre os diversos grupos experimentais ($p>0,05$). O primeiro variou de 10 a 13 dias, o segundo de 6 a 7 dias e o último de 38 a 38,5 dias (Figuras 11a, b, c).

No índice de eficiência na conversão de reserva alimentar das fêmeas (IECO), as medianas dos valores encontrados variaram significativamente ($p<0,05$) entre as fêmeas negativas do GL (54,16%) e as fêmeas positivas e negativas do GL/GN (respectivamente 42,14% e 34,9%), os últimos não diferiram dos demais grupos ($p>0,05$) (Figura 12a).

Por fim, a taxa de eclosão de ovos em larvas também apresentou diferença entre as fêmeas negativas do GL (85%) e as fêmeas positivas e negativas do GL/GN (respectivamente 1% e 55%), além disso, as fêmeas positivas do GL/GN também diferiram do valor encontrado para o GC (75%) ($p<0,05$) (Figura 12b).

Figura 10 - (a) peso da fêmea ingurgitada (PFI); (b) peso da massa de ovos (PMO) de carrapatos *A. sculptum* (PAN) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 11 - (a) Período de ingurgitamento (P ing); (b) período pré-postura (Ppp) e (c) período de incubação de ovos (P inc) de carrapatos *A. sculptum* (PAN) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 12 - (a) índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em (IECO) e (b) taxa de eclosão de ovos em larvas (Eclo) de carrapatos *A. sculptum* (PIS) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Por fim, durante as duas gerações de laboratório com esta colônia de carrapatos, uma única fêmea fez transmissão transovariana dentre um total de oito fêmeas positivas (12,5%). Esta fêmea (identificada como F419) foi exposta à infecção como larva e reexposta como ninfa (GL/GN) e, após o final da postura, teve dez ovos processados por PCR individualmente, nos quais, se determinou a frequência de infecção filial para ovos de 100% (Tabela 13). A taxa de eclosão nesta fêmea foi nula, não sendo testados desta forma a frequência de infecção filial nas larvas (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência de infecção filial (FIF) (%) para ovos e larvas de uma fêmea ingurgitada de *A. sculptum* (PAN) com transmissão transovariana no grupo experimental de exposição à infecção por *R. rickettsii* GL/GN

Grupo experimental	FTO (%)	FIF (%)	
		Ovos	Larvas
GL/GN	12,5 (1/8)	Fêmea 419: 100 (10/10)	*

GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; FTO, frequência de transmissão transovariana.

*Taxa de eclosão nula, larvas não testadas.

5.1.5 População de *A. sculptum* do Parque Nacional Grande Sertão Veredas, Minas Gerais

A colônia de *A. sculptum* do Parque Nacional Grande Sertão Veredas, Minas Gerais, foi obtida em um ponto no interior do parque, área de alta diversidade de espécies e onde não há presença de capivaras. Dos carrapatos coletados na área em questão, vinte casais foram alimentados em um coelho. Após obter resultados negativos das fêmeas ingurgitadas testadas por PCR ao final da ovipostura e da sorologia do coelho no 21º dia após infestação, o protocolo experimental teve início. As informações sobre todos os animais infestados com *A. sculptum* GSV estão nas tabelas J e K (Apêndice A).

Após a exposição de larvas F₁ à infecção (GL), não foi possível detectar ninfas positivas após a ecdise (perpetuação transestadial nula); porém, na F₂ (GL/GN), 16,1% dos carrapatos testados foram positivos ($p < 0,05$) (Tabela 14). Embora não tenham sido detectadas ninfas positivas no GL, quando estes carrapatos foram alimentados em três cobaias, uma delas apresentou período febril, reação escrotal e sorologia positiva no 21º dia após a infestação (COBAIA GSV 10 - Apêndice A - Tabela J).

Quando avaliada de ninfa para adulto, a perpetuação transestadial de *R. rickettsii* não se mostrou diferente estatisticamente entre GL (0%), GN (18,2%) e GL/GN (23,3%) ($p>0,05$) (Tabela 14). Novamente, no GL, apesar de não terem sido encontrados carrapatos positivos dentre os testados, os adultos alimentados em dois coelhos foram capazes de produzir, em um deles, febre, reação escrotal e título de anticorpos anti-*R. rickettsii* (COELHO 5 - Apêndice A - Tabela J).

A frequência de transmissão transovariana, outro parâmetro analisado, foi nula no GL (nenhuma das cinco fêmeas positivas apresentou *pool* de ovos positivos). No GN, uma de seis fêmeas positivas teve *pool* de ovos testados também positivos (16,7%) e, no GL/GN, três em nove (27,3%) das fêmeas tiveram *pool* de ovos positivos. Estes valores não diferiram estatisticamente ($p>0,05$) (Tabela 14).

Tabela 14 - Frequência de infecção por perpetuação transestadial e transmissão transovariana (%) de *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* (GSV) após exposição à infecção nos diferentes estágios do carrapato (GL, GN e GL/GN) por duas gerações de laboratório (F1 e F2)

Grupo experimental de exposição à infecção por <i>R. rickettsii</i>	Frequência de infecção (Nº PCR positivos/Nº testados)*		
	Perp. Transest. L-N	Perp. Transest. N-A	FTO
GL	0 (0/48) a§	0 (0/16) a§	0 (0/5) a
GN	-	18,2 (4/22) a	16,7 (1/6) a
GL/GN	16,1 (5/31) b	23,3 (7/30) a	27,3 (3/11) a

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; Nº, número; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transestadial; L-N, larva para ninfa; N-A, ninfa para adulto; FTO, frequência de transmissão transovariana; NP, dados não processados.

*Valores apresentados em porcentagem (%).

§As larvas do GL, ao serem alimentados em cobaias, produziram sinais clínicos e sorologia reagente para *R. rickettsii* em um (de três) animais infestados. Os adultos do GL, ao serem alimentados em coelhos, produziram sinais clínicos e sorologia reagente para *R. rickettsii* em um dos dois animais infestados.

Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro avaliado (perpetuação transestadial ou transmissão transovariana) diferem estatisticamente ($p<0,05$).

Quando avaliado o sucesso na taxa de ecdise dos carrapatos, larvas dos grupos de exposição à infecção tiveram significativamente menores valores se comparados aos do grupo controle, e isto ocorreu tanto na F₁ quanto na F₂. No GC, 98% (F₁) e 95% (F₂) das larvas ingurgitadas sofreram ecdise e no GL 90,7% e 64,3% dos carrapatos tiveram sucesso na muda em F₁ e F₂ respectivamente ($p<0,05$) (Tabela 15).

Com relação à taxa de ecdise das ninfas ingurgitadas, na F₁ não foi encontrada diferença estatística entre GC e GL, respectivamente 94,5% e 97,8% ($p>0,05$), mas ambos os valores foram significativamente maiores que o valor encontrado nas ninfas do GN, 77,9% ($p<0,05$). Já na F₂, 99,1% das ninfas sofreram ecdise no GC, e 80% no GL/GN, valor este significativamente menor que o primeiro ($p<0,05$) (Tabela 15).

A proporção de fêmeas que realizaram postura, tanto na F₁ quanto na F₂ não diferiu significativamente entre GC, GL e GN, sendo 100% em todos eles ($p>0,05$) (Tabela 15).

Tabela 15 - Sucesso de alimentação, ecdise e postura de carrapatos *A. sculptum* (GSV) nos diversos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GL, GN e GL/GN) ou não exposto à infecção (GC) por duas gerações de laboratório (F1 e F2)

Estágio do carrapato-grupo experimental	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (em 300 larvas ou ninfas total) ou fêmeas que ovipuseram (%)
Larvas (F ₁) GC	ND	5605	294 (98) a
Larvas (F ₁) GL	ND	5307	272 (90,7) b
Ninfas (F ₁) GC	240	183 (76,3)	173 (94,5) a
Ninfas (F ₁) GL	300	278 (92,7)	272 (97,8) a
Ninfas (F ₁) GN	240	222 (92,5)	173 (77,9) b
Fêmeas (F ₁) GC	30	29 (96,7)	29 (100) a
Fêmeas (F ₁) GL	30	28 (93,3)	28 (100) a
Fêmeas (F ₁) GN	30	29 (96,7)	29 (100) a
Larvas (F ₂) GC	ND	2969	285 (95) a
Larvas (F ₂) GL/GN	ND	2593	193 (64,3) b
Ninfas (F ₂) GC	300	216 (72)	214 (99,1) a
Ninfas (F ₂) GL/GN	300	225 (75)	180 (80) b
Fêmeas (F ₂) GC	30	25 (83,3)	25 (100) a
Fêmeas (F ₂) GL/GN	32	32 (100)	32 (100) a

GC, grupo controle (sem exposição à infecção); GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; Nº, número; ND, não determinado.

Letras diferentes dentro do mesmo estágio e geração de carrapatos diferem estatisticamente ($p<0,05$).

Os resultados dos parâmetros biológicos e reprodutivos das fêmeas ingurgitadas GSV estão detalhados na tabela R (Apêndice B) e ilustrados a seguir nas figuras 13, 14 e 15

No total, 28 fêmeas ingurgitaram no GL, 29 no GN, 32 no GL/GN e 54 no GC (para este, carrapatos das duas gerações foram somados). Na primeira geração de laboratório, 17,9% das fêmeas do GL se mostraram infectadas (positivas na PCR), e no GN, 20,7%

($p>0,05$). Na F_2 (GL/GN), 34,4% das fêmeas testadas se mostraram infectadas, sem diferir estatisticamente dos valores da F_1 (Apêndice B - Tabela R).

Com relação à transmissão transovariana, em nenhuma das cinco fêmeas positivas do GL foi detectada a transmissão da bactéria para sua progênie (0%), enquanto que no GN, uma em seis fêmeas teve *pool* de ovos positivos (16,7%) ($p>0,05$). Estes números não diferiram significativamente da proporção encontrada para o GL/GN, de 27,3% ($p>0,05$) (Apêndice B - Tabela R).

O número de fêmeas com massas de ovos férteis também não diferiu significativamente entre fêmeas positivas e negativas de um mesmo grupo ou entre os diversos grupos. Este parâmetro variou de 83,3% a 100% ($p>0,05$) (Apêndice B - Tabela R).

Os valores da mediana encontrados para o peso da fêmea ingurgitada variaram entre 597,1mg (fêmeas positivas do GL/GN) e 930,4mg (fêmeas positivas do GL) com diferença significativa entre as primeiras e as fêmeas negativas do GL ($p<0,05$) (Figura 13a). Já o peso da massa de ovos não encontrou diferença entre fêmeas positivas e negativas de um mesmo grupo e nem entre os diversos grupos, variando de 289,1mg (fêmeas positivas do GL/GN) e 532,7mg (fêmeas positivas do GN) ($p>0,05$) (Figura 13b).

Os períodos de ingurgitamento, de pré-postura e de incubação não apresentaram diferenças significativas entre os diversos grupos. As medianas encontradas para estes parâmetros variaram de 8 a 13 dias (período de alimentação), 5 a 7 dias (período de pré-postura) e de 37 a 38 dias (período de incubação) ($p>0,05$) (Figuras 14a, b, c).

Finalmente, tanto o índice de eficiência da conversão da reserva alimentar em ovos (IECO), quanto a taxa de eclosão não encontraram diferenças significativas entre os diversos grupos experimentais, e os valores da mediana encontradas para estes parâmetros variaram respectivamente de 51,1 a 55,94%, e de 65 a 95% ($p>0,05$) (Figuras 15a, b).

Figura 13 - (a) peso da fêmea ingurgitada (PFI); (b) peso da massa de ovos (PMO) de carrapatos *A. sculptum* (GSV) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 14 - (a) Período de ingurgitamento (P ing); (b) período pré-postura (Ppp) e (c) período de incubação de ovos (P inc) de carrapatos *A. sculptum* (GSV) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 15 - (a) índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em (IECO) e (b) taxa de eclosão de ovos em larvas (Eclo) de carrapatos *A. sculptum* (GSV) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Ao final da primeira geração de laboratório, somente no GN (grupo de exposição à infecção no estágio de ninfa) houve transmissão transovariana. Neste caso, uma em seis fêmeas positivas na PCR (16,7%) teve *pool* de ovos também positivo (esta fêmea foi identificada como F234). A frequência de infecção filial em dez ovos testados individualmente foi de 70%. Porém, nesta fêmea, a eclosão de ovos em larvas foi nula, não podendo se determinar a frequência de infecção filial para as larvas (Tabela 16).

Na F₂ (GL/GN), três em onze fêmeas tiveram *pool* de ovos identificados como infectados na PCR em tempo real (F448, F451 e F453). Nestas fêmeas, a frequência de infecção filial para ovos foi de 100%, 60% e 30% respectivamente (Tabela 16). Já a frequência de infecção filial para larvas foi de 90% para as duas primeiras e 30% para a F453 (Tabela 16).

Tabela 16 - Frequência de infecção filial (FIF) (%) para ovos e larvas de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (GSV) com transmissão transovariana nos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GN e GL/GN)

Grupo experimental	FTO (%)	FIF (%)	
		Ovos	Larvas
GN	16,7 (1/6)	Fêmea 234: 70 (7/10)	*
GL/GN	27,3 (3/11)	Fêmea 448: 100 (10/10)	Fêmea 448: 90 (9/10)
		Fêmea 451: 60 (6/10)	Fêmea 451: 90 (9/10)
		Fêmea 453: 30 (3/10)	Fêmea 453: 30 (3/10)

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; FTO, frequência de transmissão transovariana.

*Taxa de eclosão nula (larvas não testadas).

As larvas provenientes das três fêmeas com transmissão transovariana do GL/GN, foram posteriormente alimentadas em três cobaias (COBAIAS GSV 28, 29 e 30 respectivamente para as fêmeas F448, 451 e 453, e as três apresentaram sorologia reagente para *R. rickettsii* após 21 dias da infestação, embora somente duas delas apresentaram sintomatologia clínica compatível com riquetsiose (Apêndice A - Tabela K). As larvas ingurgitadas foram acompanhadas para avaliação do sucesso de ecdise, que foi 60%, 68% e 0% respectivamente para carrapatos das fêmeas F448, F451 e F453 (Tabela 17). Após a ecdise, uma frequência de 100% por perpetuação transestadial foi observada nos dois lotes de carrapatos remanescentes (Tabela 17).

Tabela 17 - Sucesso de alimentação e ecdise de carrapatos *A. sculptum* (GSV) de terceira geração (F3) resultantes de três fêmeas (F448, F451 e F453) com transmissão transovariana (TOT) no GL/GN

Estágio do carrapato-origem	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (%)	Perp. Transest. (%)
Larvas (F ₃) F448	ND	520	312 (60)	5/5 (100)
Larvas (F ₃) F451	ND	75	51 (68)	5/5 (100)
Larvas (F ₃) F453	ND	2	0 (0)	*

GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transestadial.

*As duas larvas ingurgitadas recuperadas da cobaia não sofreu ecdise, e portanto, não foram testadas por PCR em tempo real.

5.1.6 População de *A. sculptum* de Belo Horizonte, Minas Gerais

A população proveniente de Belo Horizonte, Minas Gerais foi obtida através de carrapatos adultos (vida livre) coletados na orla da Lagoa da Pampulha. Ressalta-se ainda que a mesma coleta de carrapatos deu origem a um novo isolado de *R. rickettsii* (cepa PAMPULHA), que foi utilizado para a infecção experimental nesta população de carrapatos (item 4.2) (LABRUNA et al., em fase de elaboração)².

Dos carrapatos coletados na Lagoa da Pampulha, vinte casais foram selecionados aleatoriamente e alimentados em um coelho. Esta infestação não provocou título de anticorpos anti-*R. rickettsii* no 21º dia de infestação e, além disso, nenhuma fêmea testada ao final da ovipostura se mostrou positiva na PCR em tempo real. Assim, larvas provenientes destas fêmeas deram início ao protocolo experimental desta população de *A. sculptum*, cujos detalhes estão nas tabelas L e M (Apêndice A).

No momento da entrega deste documento, a infestação com adultos da segunda geração dos carrapatos ainda não tinha terminado. Por isso, alguns parâmetros foram analisados parcialmente na F₂ desta população de *A. sculptum*.

A frequência de infecção por perpetuação transestadial de larva para ninfa foi de 8,3% no GL e de 41% no GL/GN e estes valores foram significativamente diferentes ($p < 0,05$) (Tabela 18). De ninfa para adulto, a frequência de infecção encontrada foi de 46,7% no GL, 66,7% no GN e 33,3% no GL/GN, sem diferença estatística entre eles ($p > 0,05$). Já a

² LABRUNA, M. B. et al. Manuscrito ainda não redigido.

frequência de infecção por transmissão transovariana foi de 14,3% no GL e 16,7% no GN ($p>0,05$) (Tabela 18).

Tabela 18 - Frequência de infecção por perpetuação transestadial e transmissão transovariana (%) de *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* (PAMP) após exposição à infecção nos diferentes estágios do carrapato (GL, GN, GL/GN) por duas gerações de laboratório (F1 e F2) (resultados parciais)

Grupo experimental de exposição à infecção por <i>R. rickettsii</i>	Frequência de infecção (Nº PCR positivos/Nº testados)*		
	Perp. Transest. L-N	Perp. Transest. N-A	FTO
GL	8,3 (3/36) a	46,7 (7/15) a	14,3 (1/7) a
GN	-	66,7 (10/15) a	16,7 (1/6) a
GL/GN	41 (9/22) b	33,3 (5/15) a	NP

GL, grupo infectado como larva; Perp. Transest., frequência de infecção por perpetuação transestadial de *R. rickettsii* nos carrapatos; L-N, larva para ninfa; N-A, ninfa para adulto, Nº, número, NP, dados ainda não processados.

*Valores apresentados em porcentagem.

Letras diferentes dentro do mesmo parâmetro avaliado (perpetuação transestadial ou transmissão transovariana) diferem estatisticamente ($p<0,05$).

A taxa de ecdise de larvas para ninfas não se mostrou diferente estatisticamente entre carrapatos do grupo infectado (66,3%) e do grupo controle (69,3) ($p>0,05$) na primeira geração (F₁). Entretanto na F₂, um número significativamente menor de larvas tiveram sucesso na ecdise no grupo de exposição a *R. rickettsii* (GL) quando comparado ao grupo controle (57% e 94,3% respectivamente) ($p<0,05$) (Tabela 19).

A taxa de ecdise de ninfa para adulto na F₁ foi significativamente menor nos carrapatos do GL (85,7%) que nos do GC (97,9%) e do GN (96,8%) ($p<0,05$), mas estes dois últimos não apresentaram diferença significativa entre eles ($p>0,05$) (Tabela 19). Na F₂, 88,9% das ninfas do grupo controle tiveram sucesso na muda para adulto, enquanto que no GL/GN o valor encontrado foi de 67,1%, sendo a diferença entre eles significativa ($p<0,05$) (Tabela 19).

Por fim, a porcentagem de fêmeas que fizeram postura dentre todas as recuperadas foi de 100% nos três grupos da F₁ (GC, GL e GN) (Tabela 19).

Tabela 19 - Sucesso de alimentação e ecdise de carrapatos *A. sculptum* (PAMP) nos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* da primeira geração (GL e GN) ou não exposto à infecção (GC)

Estágio do carrapato-grupo experimental	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (em 300 larvas ou ninfas total) ou fêmeas que ovipuseram (%)
Larvas (F ₁) GC	ND	3560	208 (69,3) a
Larvas (F ₁) GL	ND	3516	199 (66,3) a
Ninfas (F ₁) GC	300	242 (80,7)	237 (97,9) a
Ninfas (F ₁) GL	300	283 (94,3)	240 (85,7) b
Ninfas (F ₁) GN	300	280 (93,3)	271 (96,8) a
Fêmeas (F ₁) GC	20	18 (90)	18 (100) a
Fêmeas (F ₁) GL	22	22 (100)	22 (100) a
Fêmeas (F ₁) GN	20	20 (100)	20 (100) a
Larvas (F ₂) GC	ND	1986	283 (94,3) a
Larvas (F ₂) GL/GN	ND	1378	171 (57) b
Ninfas (F ₂) GC	240	145 (60,4)	129 (88,9) a
Ninfas (F ₂) GL/GN	240	158 (65,8)	106 (67,1) b
Fêmeas (F ₂) GC	NP	NP	NP
Fêmeas (F ₂) GL/GN	NP	NP	NP

GC, grupo controle (sem exposição à infecção); GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; Nº, número; ND, não determinado; NP, dados ainda não processados.

Letras diferentes dentro do mesmo estágio e geração de carrapatos diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

Na tabela S (Apêndice B) estão detalhados os parâmetros biológicos e reprodutivos avaliados nas infestações com adultos desta população de carrapatos. A seguir, serão descritos tais resultados, que também estão ilustrados adiante nas figuras 16, 17 e 18.

Na primeira geração dos carrapatos, 22 fêmeas ingurgitaram no GL, 20 no GN e 18 no GC. Nos grupos expostos à infecção, 31,8% das fêmeas ingurgitadas do GL e 30% das fêmeas do GN foram detectadas como infectadas na PCR em tempo real ($p > 0,05$). Em ambos os grupos, em apenas uma fêmea de cada foi verificado ocorrer transmissão transovariana (*pool* de ovos positivos na PCR em tempo real), sendo respectivamente no GL e no GN 14,3% e 16,7% a frequência de fêmeas que transmitiram infecção para sua progênie ($p > 0,05$) (Apêndice B - Tabela S).

A proporção de fêmeas com ovos férteis também não diferiu significativamente entre fêmeas positivas e negativas de um mesmo grup ou entre os diferentes grupos (GL, GN e GC) e variou de 85,7% a 100% ($p > 0,05$) (Apêndice B - Tabela S).

Os parâmetros biológicos e reprodutivos avaliados nas fêmeas ingurgitadas serão descritos a seguir com base na mediana dos dados, mas na tabela S (Apêndice B) encontram-se a média e o desvio padrão destes dados.

Tanto o peso da fêmea ingurgitada quanto o peso da massa de ovos não diferiram estatisticamente entre os diversos grupos experimentais ($p>0,05$). O primeiro variou de 496,1mg (fêmeas positivas do GN) e 730,1mg (fêmeas negativas do GN). Já o peso da massa de ovos variou de 130,2 mg (fêmeas positivas do GL) e 336,5mg (fêmeas negativas do GN) (Figuras 16a, b).

Um período de ingurgitamento significativamente maior foi encontrado para as fêmeas do GL (positivas e negativas) (11 e 10 dias respectivamente) quando comparado às fêmeas negativas do GN (8 dias) ($p<0,05$). Nos demais grupos (fêmeas positivas do GN e GC) foram encontrados os valores de 8,5 dias e 9,5 dias respectivamente ($p>0,05$) (Figura 17a). Tanto o período pré-postura quanto o período de incubação dos ovos não diferiu significativamente entre os diversos grupos. O primeiro variou de 6 a 8 dias e o segundo de 38 a 38,5 dias ($p>0,05$) (Figura 17b, c).

Os valores encontrados para a mediana do índice de eficiência na conversão do peso da fêmea em ovos (IECO) diferiu significativamente entre as fêmeas positivas e negativas do GL, sendo 46% e 60,5% respectivamente ($p<0,05$). Este último também diferiu significativamente do valor encontrado no GC (46,6%) ($p<0,05$). Os demais grupos não diferiram significativamente entre si, sendo 50,3% e 47,1% respectivamente para as fêmeas positivas e negativas do GN ($p>0,05$) (Figura 18a).

Por fim, a taxa de eclosão de ovos em larvas variou de 70% a 99,99%, sem diferença estatística entre os diversos grupos ($p>0,05$) (Figura 18b).

Figura 16 - (a) peso da fêmea ingurgitada (PFI); (b) peso da massa de ovos (PMO) de carrapatos *A. sculptum* (PAMP) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 17 - (a) Período de ingurgitamento (P ing); (b) período pré-postura (Ppp) e (c) período de incubação de ovos (P inc) de carrapatos *A. sculptum* (PAMP) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Figura 18 - (a) índice de eficiência de conversão da reserva alimentar em (IECO) e (b) taxa de eclosão de ovos em larvas (Eclo) de carrapatos *A. sculptum* (PAMP) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN), positivos (pos) ou negativos (neg) na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC). Dados expressos em mediana e interquartis. Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$)

Ao final da primeira geração de laboratório, uma em sete fêmeas do GL (14,3%) apresentou *pool* de ovos positivos na PCR em tempo real (transmissão transovariana). Esta fêmea identificada como F122 teve seus ovos e larvas testados individualmente para determinar a frequência de infecção filial, que foi de 100% (Tabela 20).

No GN, uma em seis fêmeas (16,7%) teve transmissão transovariana detectada (F137), e a frequência de infecção filial para esta fêmea foi de 60% tanto para ovos quanto para larvas (Tabela 20).

Tabela 20 - Frequência de infecção filial (FIF) (%) para ovos e larvas de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (PAMP) com transmissão transovariana nos diversos grupos experimentais de exposição à infecção por *R. rickettsii* (GL, GN)

Grupo experimental	FTO (%)	FIF (%)	
		Ovos	Larvas
GL	14,3 (1/7)	Fêmea 122: 100 (10/10)	Fêmea 122: 100 (10/10)
GN	16,7 (1/6)	Fêmea 137: 60 (6/10)	Fêmea 137: 60 (6/10)

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; FTO, frequência de transmissão transovariana.

As larvas provenientes das duas fêmeas com transmissão transovariana (122F - GL e 137F - GN) foram posteriormente alimentadas em duas cobaias distintas (COBAIAS PAMP 22 e 23 respectivamente), e em ambos os animais foi verificado período febril, reação escrotal (necrose) e sorologia reagente para *R. rickettsii* (Apêndice A - Tabela M). Além disso, o sucesso na taxa de ecdise destes carrapatos também foram avaliados, sendo 71,5% (F122) e 17,8% (F137). Após a ecdise, parte destes carrapatos também foram testados para determinação da frequência de infecção e os valores encontrados foram 100% (F122) e 20% (F137) (Tabela 21).

Tabela 21 - Sucesso de alimentação e ecdise de carrapatos *A. sculptum* (PAMP) de segunda geração (F2) resultantes de duas fêmeas (F122 e F137) com transmissão transovariana (TOT) no GL e no GN

Estágio do carrapato-origem	Nº carrapatos expostos	Nº carrapatos ingurgitados (%)	Nº carrapatos que sofreram ecdise (%)	Perp. Transtest. (%)
Larvas (F ₂) F122	ND	551	394 (71,5)	5/5 (100)
Larvas (F ₂) F137	ND	264	47 (17,8)	1/5 (20)

GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; Perp. Transtest., frequência de infecção por perpetuação transestadial.

5.2 ANÁLISE COMPARATIVA DAS SEIS POPULAÇÕES DE *Amblyomma sculptum*

A susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii* nas diferentes populações de *A. sculptum* foi comparada através da frequência de perpetuação transestadial (Tabela 22) e transmissão transovariana (Tabela 23) da bactéria nos carrapatos.

Após os carrapatos de primeira geração serem expostos a *R. rickettsii* no estágio de larva (GL), a frequência de infecção por perpetuação transestadial foi significativamente maior na população ITU (16%), quando comparado às populações PAN (1,25%) e GSV (0%) ($p < 0,05$), ressaltando que nesta última o valor nulo não representou a real frequência de infecção neste grupo (COBAIA GSV 10 - Apêndice A - Tabela J). Nas populações PIC, PIS e PAMP, os resultados encontrados foram respectivamente de 2,5%, 1,8% e 8,3%. Estes valores não diferiram significativamente dos demais ($p > 0,05$) (Tabela 22). Na segunda geração dos carrapatos, a exposição à infecção foi repetida nas larvas (a partir de carrapatos não infectados) e os resultados obtidos demonstraram uma frequência de infecção significativamente maior na população PAMP (41%), se comparado à PIS e PAN (ambas 0%) ($p < 0,05$). Nas populações ITU (8,3%), PIC (10%) e GSV (16,1%) não foram encontradas diferenças significativas entre as demais populações ($p > 0,05$) (Tabela 22).

A perpetuação transestadial da bactéria do estágio de ninfa para adulto foi comparado em três grupos experimentais: GL, GN e GL/GN. No GL, frequência de infecção significativamente maior foi encontrada na população PAMP (41%) e em ITU (33,3%) ($p > 0,05$), porém esta última não diferiu estatisticamente de PIC e GSV (0% em ambas). As populações PIS e PAN (também 0% em ambas, sendo 25 e 20 o número de carrapatos testados) tiveram seus valores significativamente menores que as demais ($p < 0,05$) (Tabela 22). Entretanto, deve-se destacar que em PIS, a frequência de infecção nula não refletiu a real frequência de infecção na população, já que os adultos alimentados em dois coelhos, produziu febre, reação escrotal e sorologia positiva para *R. rickettsii* em um deles (COELHO PIS 5 - Apêndice A - Tabela F).

No grupo infectado como ninfa (GN), carrapatos adultos positivos foram detectados em número significativamente maior na população PAMP (66,7%) quando comparado as demais, ITU, PIC e PAN (0%); PIS (10,7%) e GSV (18,2%) ($p < 0,05$), embora estas últimas não tenham diferido estatisticamente (Tabela 22). Salienta-se que na população ITU, apesar da frequência de infecção ser nula, os carrapatos adultos provenientes deste grupo (GN) foram

capazes de transmitir a infecção, como constatado pelos sinais clínicos, reação escrotal e óbito nos dois coelhos infestados (COELHOS ITU 9 e 10 - Apêndice A - Tabela B).

Finalmente, a perpetuação transestadial de *R. rickettsii* nos carrapatos após a exposição como larva e reexposição como ninfa (GL/GN), apresentou uma maior e significativa frequência de infecção na população PIS (66,7%), ITU (60%) e PAMP (33,3%), mas estas duas últimas não diferiram de PAN (20%) e GSV (23,3%). Em PIC, nenhum carrapato testado foi encontrado positivo dentre os testados (0%) ($p < 0,05$) (Tabela 22), porém estes carrapatos, quando alimentados em coelhos, foram capazes de provocar febre, reação escrotal e sorologia reagente em um dos três animais infestado (COELHO PIC 15 - Apêndice A - Tabela E).

Tabela 22 - Frequência de infecção por perpetuação transestadial de *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* de diferentes populações

Populações de <i>A. sculptum</i>	% Perpetuação transestadial (Nº PCR positivos/Nº testados)				
	L-N (GL)	L-N (GL/GN)	N-A (GL)	N-A (GN)	N-A (GL/GN)
ITU	16 (4/25) a	8,3 (3/36) ab	33,3 (5/15) ac	0 (0/15) a*	60 (9/15) ac
PIC	2,5 (1/40) ab	10 (3/10) ab	0 (0/10) a	0 (0/30) a	0 (0/30) b*
PIS	1,8 (1/55) ab	0 (0/10) a	0 (0/25) b*	10,7 (3/28) a	66,7 (20/30) a
PAN	1,25 (1/80) b	0 (0/15) a	0 (0/20) b	0 (0/15) a	20 (3/15) c
GSV	0 (0/48) b*	16,1 (5/31) ab	0 (0/16) a*	18,2 (4/22) a	23,3 (7/30) c
PAMP	8,3 (3/36) ab	41 (9/22) b	46,7 (7/15) c	66,7 (10/15) b	33,3 (5/15) ac

L-N, larva para ninfa; N-A, ninfa para adulto; GL, grupo de exposição à infecção no estágio de larva; GN, grupo de exposição à infecção no estágio de ninfa; GL/GN, grupo de exposição à infecção no estágio de larva e reexposição no estágio de ninfa.

*Nestes grupos, embora não foi possível detectar pelo menos um carrapato positivo na PCR em tempo real, quando foram alimentados em animais susceptíveis, foram capazes de produzir sinais clínicos (febre e/ou reação escrotal) e títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii* em pelo menos um dos animais infestados.

Letras diferentes dentro mesmo estágio (L-N ou N-A) e grupo experimental (GL, GN ou GL/GN) diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

A transmissão transovariana de *R. rickettsii* nos carrapatos *A. sculptum* foi comparada entre as diferentes populações estudadas e também, entre os diferentes grupos experimentais de exposição à infecção (GL, GN e GL/GN). Carrapatos adultos (fêmeas) expostos à infecção no estágio de larva (GL) foram capazes de manter a infecção até o estágio de adulto e ainda, transmitir a bactéria a sua progênie nas populações ITU (frequência de transmissão transovariana - FTO de 12,5%), PIS (18,2%) e PAMP (14,3%) ($p > 0,05$). Embora na população GSV tenham sido detectadas cinco fêmeas positivas na PCR em tempo real após a

alimentação, nenhuma delas teve *pool* de ovos testados também positivos (FTO igual a 0). Ainda sim, estes valores não diferiram estatisticamente entre as diferentes populações ($p>0,05$) (Tabela 23).

No GN, as quatro populações anteriormente citadas (ITU, PIS, GSV e PAMP) tiveram fêmeas com sucesso na transmissão transovariana de *R. rickettsii* para sua progênie, numa frequência que variou de 6,7% a 27,3%, sem diferença estatística entre elas ($p>0,05$) (Tabela 23).

Por fim, no GL/GN, transmissão transovariana da bactéria nos carrapatos foi observada nas populações ITU, PIS, PAN e GSV, tendo sua frequência variando de 12,5% a 27,3% sem diferença significativa entre elas ($p>0,05$). Embora a população PIC tenha apresentado fêmeas infectadas após a alimentação, em nenhuma delas (zero em duas) foi constatada transmissão transovariana (FTO igual a 0, valor este sem diferença estatística das demais) ($p>0,05$) (Tabela 23).

Tabela 23 - Frequência de transmissão transovariana de *R. rickettsii* em carrapatos *A. sculptum* de diferentes populações

Populações de <i>A. sculptum</i>	Transmissão transovariana (Nº fêmeas com <i>pool</i> de ovos positivos/Nº fêmeas positivas)		
	GL	GN	GL/GN
ITU	12,5 (2/16) a	27,3 (3/11) a	20 (4/20) a
PIC	0*	0*	0 (0/2) a
PIS	18,2 (2/11) a	6,7 (1/15) a	15,8 (3/19) a
PAN	0*	0*	12,5 (1/8) a
GSV	0 (0/5) a	16,7 (1/6) a	27,3 (3/11) a
PAMP	14,3 (1/7) a	16,7 (1/6) a	NP

Nº número; GL, grupo de exposição à infecção no estágio de larva; GN, grupo de exposição à infecção no estágio de ninfa; GL/GN, grupo de exposição à infecção no estágio de larva e reexposição no estágio de ninfa; NP, dados ainda não processados.

*Nenhuma fêmea nestes grupos foi detectada como infectada.

Letras diferentes dentro mesmo grupo experimental (GL, GN ou GL/GN) diferem estatisticamente ($p<0,05$).

Foi calculada ainda, a taxa de letalidade que carrapatos anteriormente expostos à infecção produziram em cobaias ou coelhos. Esta taxa foi calculada nos diferentes grupos experimentais de cada população através da razão entre o número de animais que foram a óbito e o número de animais que apresentaram sinais clínicos compatíveis com FMB (período febril e/ou reação escrotal) ou ainda, sorologia reagente com título ≥ 64 para *R. rickettsii*.

A taxa de letalidade em cobaias expostas a ninfas infectadas no GL variou de 0 a 100% nas diferentes populações ($p>0,05$) (Tabela 24). Ainda em cobaias, naquelas populações em que houveram fêmeas com transmissão transovariana cujas larvas foram viáveis após a eclosão, a taxa de letalidade que tais larvas produziram variou de 0 a 50% ($p>0,05$) (Tabela 24).

Carrapatos adultos de diferentes grupos de exposição a *R. rickettsii* produziram taxa de letalidade em coelhos que variou de 0 a 50% no GL, 0 a 100% no GN e 0 a 33,3% no GL/GN, e em cada grupo experimental não houve diferença significativa ($p>0,05$) (Tabela 24).

Quando estes dados anteriormente expostos foram somados (número de cobaias e coelhos que foram a óbito), na população de *A. sculptum* ITU foi encontrada a maior taxa de letalidade (53,8%), valor este significativamente diferente de PIS (0% - 0/9). Nas demais populações, PAMP (14,3%), PIC (0% - 0/2), PAN (0% - 0/3) e GSV (11%), os valores encontrados não diferiram significativamente dos dois primeiros ($p>0,05$). (Tabela 24).

Tabela 24 - Taxa de letalidade em cobaias e coelhos infestados com larvas (L), ninfas (N), ou adultos (A) de *A. sculptum* de diversas origens, nos diferentes grupos de exposição à infecção (GL, GN ou GL/GN)

População de <i>A. sculptum</i>	Cobaia		Coelho			TOTAL
	GL (N)	Indiferente (L ou N)	GL (A)	GN (A)	GL/GN (A)	
ITU	100 (3/3) a	33,3 (1/3) a	50 (1/2) a	100 (2/2) a	0 (0/3) a	53,8 (7/13) a
PAMP	33,3 (1/3) a	0 (0/2)	0 (0/1)	0 (0/1)	NP	14,3(1/7) ab*
PIC	0 (0/1) a	-	-	-	0 (0/1)	0 (0/2) ab
PIS	0 (0/2) a	0 (0/1) a	0 (0/1) a	0 (0/2) a	0 (0/3)	0 (0/9) b
PAN	-	-	-	-	0 (0/3) a	0 (0/3) ab
GSV	0 (0/1) a	0 (0/3)	0 (0/1)	0 (0/1) a	33,3 (1/3) a	11,1 (1/9) ab

GL, grupo de exposição à infecção no estágio de larva; GN, grupo de exposição à infecção no estágio de ninfa; GL/GN, grupo de exposição à infecção no estágio de larva e reexposição no estágio de ninfa; Indiferente, corresponde às cobaias que foram infestadas com larvas ou ninfas provenientes de fêmeas com TOT, independente do grupo de exposição à infecção; L, larva, N, ninfa; NP, dados não processados.

*Resultados parciais.

Letras diferentes dentro mesmo estágio (L, N ou A) e grupo experimental (GL, GN ou GL/GN) diferem estatisticamente ($p<0,05$).

5.3 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E ANÁLISE FILOGENÉTICA

Após a exposição de *A. sculptum* de diferentes populações à infecção por *R. rickettsii*, amostras destes parasitos foram submetidas à PCR em tempo real para determinação da

frequência de infecção nestes carrapatos (Item 4.5). Além dos carrapatos encontrados positivos, também foram selecionados alguns negativos que se alimentaram no mesmo animal (expostos à infecção) para realização de PCR convencional, cujos alvos foram 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear. Os produtos amplificados obtidos foram sequenciados e estes procedimentos foram feitos para cada uma das seis populações estudadas (Item 4.7).

Para os marcadores 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear foram sequenciadas um total de 425 amostras, incluindo positivas e negativas de cada população. Na tabela 25 estão discriminadas estas amostras por população e por resultado da PCR em tempo real (positiva ou negativa). Além disso, foram sequenciadas um total de 20 amostras de carrapatos positivos na PCR em tempo real (infectados) cujo alvo foi o gene *ompA* de *Rickettsia* spp. do grupo da febre maculosa.

Tabela 25 - Número total de amostras sequenciadas e utilizadas para análise filogenética dos genes 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear de carrapatos *A. sculptum* (positivos ou negativos para *Rickettsia* spp. na PCR em tempo real) de diferentes populações

População de <i>A. sculptum</i>	Número de amostras sequenciadas				Total
	16S		ITS2		
	pos	neg	pos	neg	
ITU	43	43	40	40	166
PIC	4	17	3	8	32
PIS	4	15	4	12	35
PAN	9	26	6	20	61
GSV	25	22	14	22	83
PAMP	13	15	10	10	48
Total	98	138	77	112	425

Pos, carrapatos positivos para *Rickettsia* spp. na PCR em tempo real; neg, carrapatos negativos na mesma PCR.

A análise filogenética do gene ITS2 nuclear não revelou divergências entre carrapatos infectados e não infectados de uma mesma população de *A. sculptum* (dados não mostrados) tão pouco entre as diferentes populações (100% de identidade nucleotídica). Nesta análise, foram incluídas dois genótipos demonstrados por Beati et al. (2013) do município de Corumbá, Mato Grosso do Sul, entre as quais, também não foram encontrados polimorfismos em relação às populações estudadas no presente estudo. Foi utilizado como grupo externo para esta análise a sequência JN866864 de *A. cajennense* sensu stricto (BEATI et al., 2013). A matriz de identidade da análise descrita está na tabela 26 e a árvore filogenética na figura 19.

Tabela 26 - Matriz de identidade de nucleotídeos gerada a partir de sequências do fragmento do gene ITS2 nuclear de carrapatos *A. sculptum* de seis populações geograficamente distintas estudadas no presente trabalho e de duas sequências obtidas no trabalho de Beati et al., (2013)

Genótipos	GSV MG	PAN MG	PIC SP	PIS SP	ITU SP	PAMP MG	BRMaGa MS	BRMaGb MS	FG2005a GF
GSV MG	ID								
PAN MT	1	ID							
PIC SP	1	1	ID						
PIS SP	1	1	1	ID					
ITU SP	1	1	1	1	ID				
PAMP MG	1	1	1	1	1	ID			
BRMaGa	1	1	1	1	1	1	ID		
BRMaGb	1	1	1	1	1	1	1	ID	
FG2005a	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	0,962	ID

GSV, Grande Sertão Veredas; PAN, Pantanal; PIC, Piracicaba; PIS, Pirassununga, ITU, Itu; PAMP, Pampulha, BRMaGa e BRMaGb, sequências (respectivamente JN866842 e JN866843) de *A. sculptum* de Corumbá (BEATI et al., 2013); FG2005a, sequência (JN866864) de *A. cajennense* sensu stricto (BEATI et al., 2013); MG, Minas Gerais; SP, São Paulo; MS, Mato Grosso do Sul; GF, Guiana Francesa.

Figura 19 - Árvore filogenética construída com o método de neighbor-joining através do modelo de substituição Tamura 3-parâmetros para a região parcial (557 nt) do gene ITS2 nuclear de *A. sculptum*. As amostras apresentam a identificação localidade e estado, e a amostra JN866864 de *A. cajennense* sensu stricto como grupo externo

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Por outro lado, na análise de sequências do gene 16S rDNA mitocondrial, embora também não tenham sido observadas divergências entre as sequências de amostras positivas e negativas de uma mesma população de *A. sculptum* (dados não mostrados), foram revelados dois maiores *clusters*: Itu/Pampulha1/Piracicaba/Pirassununga e Grande Sertão Veredas/Pantanal/Pampulha2 (Figura 20). Interessantemente, na população de Belo Horizonte (Pampulha), foram identificados dois genótipos distintos dentre as amostras sequenciadas (Pampulha 1 e Pampulha 2), com 3% de variabilidade entre eles. O genótipo Pampulha 1 apresentou 100% de identidade com as sequências da população de Itu. As populações de Piracicaba e de Pirassununga também foram 100% idênticas entre si. Estes dois grupos, um englobando Itu/Pampulha 1 e o outro, Piracicaba/Pirassununga tiveram 0,3% de divergência entre eles. No *cluster* que englobou Grande Sertão Veredas/Pantanal/Pampulha 2, foi encontrada divergência de 0,3% entre Pampulha 2 e Grande Sertão Veredas/Pantanal, sendo estas duas últimas 100% idênticas entre si. A matriz de identidade da análise descrita está na tabela 27 e a árvore filogenética na figura 20.

Tabela 27 - Matriz de identidade de nucleotídeos gerada a partir de sequências do fragmento do gene 16S rDNA mitocondrial de carrapatos *A. sculptum* de seis populações geograficamente distintas

Genótipo	GSV MG	ITU SP	PAMP 1 MG	PAMP 2 MG	PAN MT	PIC SP	PIS SP	Paraguai P10
GSV MG	ID							
ITU SP	0,972	ID						
PAMP 1 MG	0,972	1	ID					
PAMP 2 MG	0,997	0,97	0,97	ID				
PAN MT	1	0,972	0,972	0,997	ID			
PIC SP	0,97	0,997	0,997	0,967	0,97	ID		
PIS SP	0,97	0,997	0,997	0,967	0,97	1	ID	
Paraguai P10	0,907	0,892	0,892	0,907	0,907	0,895	0,895	ID

GSV, Grande Sertão Veredas; PAN, Pantanal; PIC, Piracicaba; PIS, Pirassununga, PAMP, Pampulha, Paraguai P10, sequência (KF179349) de *A. cajennense* sensu lato (OGRZEWALSKA et al, 2014).

Figura 20 - Árvore filogenética construída com o método de neighbor-joining através do modelo de substituição Tamura 3-parâmetros para a região parcial (403 nt) do gene 16S rDNA mitocondrial de *A. sculptum*. As amostras apresentam a identificação localidade/genótipo (somente para Pampulha)/ Estado, e a amostra KF179349 de *A. cajennense* sensu lato como grupo externo. Os números próximos a cada nó representam os valores de 1.000 repetições de *bootstrap*, tendo sido demonstrados apenas aqueles superiores a 50%. A escala representa o número de substituições/sítio

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

A figura 21 ilustra os genótipos obtidos através da análise filogenética do marcador molecular 16S rDNA mitocondrial das populações de *A. sculptum* do presente estudo, com as localizações por município de origem. O mapa foi construído a partir do programa QGIS, versão 2.8.

Figura 21 - Mapa do Brasil com os estados da federação, demonstrando os cinco genótipos de *A. sculptum* do presente estudo, baseados em análise filogenética do gene mitocondrial 16S rDNA e em suas localizações (municípios) de origem

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

Por fim, buscou-se também verificar a identidade da *Rickettsia* spp. que estaria infectando as populações de carrapatos ao longo dos experimentos e excluir alguma possibilidade de contaminação das amostras durante os procedimentos de extração e/ou PCR. Assim, ao final da primeira e/ou segunda gerações de laboratório de cada uma das populações, pelo menos duas amostras positivas na PCR em tempo real foram selecionadas para amplificação do gene *ompA* de *Rickettsia* spp. com posterior sequenciamento. Um total

de 20 amostras foram sequenciadas dentre carrapatos infectados das seis populações estudadas, das quais, mostraram 100% de identidade nucleotídica entre si e com *Rickettsia rickettsii* (Figura 22).

Figura 22 - Alinhamento das sequências obtidas para o fragmento parcial (491 nt) do gene *ompA* de *Rickettsia* spp, demonstrando 100% de identidade nucleotídica com sequência (CP003305) de *R. rickettsii*

Fonte: (GERARDI, M., 2016)

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, atenção especial tem sido dada a emergência ou reemergência de doenças parasitárias/infecciosas e sua relação com alterações ecológicas (WALSH et al., 1993; PATZ et al., 2000; GREER et al., 2008), o que também tem sido observado em doenças transmitidas por carrapatos (HUBALEK & HALOUZKA, 1999; RANDOLPH, 2004).

No Brasil, atualmente são conhecidos dois cenários ecológicos para a transmissão de FMB. Na região metropolitana de São Paulo, este cenário está representado por *A. aureolatum* como vetor de *R. rickettsii* para humanos (PINTER & LABRUNA, 2006), que são neste caso hospedeiros acidentais do parasito. Um estudo recente nesta região relacionou claramente a presença de áreas endêmicas para FMB com a degradação de fragmentos florestais de Mata Atlântica (OGRZEWALSKA et al., 2012). Estes autores também sugeriram que o estabelecimento de *R. rickettsii* em determinada população de *A. aureolatum* poderia estar relacionada com traços genéticos específicos das populações de carrapatos locais (OGRZEWALSKA et al., 2012). Neste contexto, para se prever e/ou explicar melhor a epidemiologia de doenças parasitárias, especialmente as transmitidas por vetores, destaca-se a importância da compreensão das relações hospedeiro-parasito e dos seres envolvidos nela.

O conhecimento das interações entre um parasito e seu hospedeiro necessita, em um primeiro momento, da descrição destes seres, em termos de sistemática. Assim, a definição de espécie é proposta por diversos parâmetros, tais como morfológicos, reprodutivos e moleculares, dentre outros. Especialmente entre os carrapatos, estudos recentes têm demonstrado que, populações amplamente distribuídas e que anteriormente eram descritas como pertencentes à mesma espécie, podem se tratar, na verdade, de espécies distintas (SZABÓ et al., 2005; LABRUNA et al., 2009b; LABRUNA et al., 2011a; MASTROPAOLO et al., 2011; NAVA et al., 2014). De fato, o termo “espécie” é um processo orientado pelo ambiente ao longo do tempo, e não se trata, portanto, de uma entidade inerte. Assim, também no caso de parasitos, esta definição ainda não tem uma aplicação geral disponível (KUNZ, 2002).

A exemplo do que foi anteriormente exposto, está o “complexo *Amblyomma cajennense*”. Estudos anteriores à sua descrição propunham a sua existência baseado em experimentos de cruzamentos entre populações de diferentes origens (LABRUNA et al.,

2011a; MASTROPAOLO et al., 2011). De fato, o táxon *A. cajennense* era tido como umas das espécies de carrapatos com maior distribuição geográfica no continente americano (BEATI et al., 2013). Assim, estudos de Beati et al. (2013), sustentados por ferramentas moleculares e filogenéticas, evidenciaram a existência de seis grupos (ou clados) mutuamente exclusivos, caracterizados por diferentes aspectos ecológicos. Corroborando com tais resultados, Nava et al. (2014), através de estudos morfológicos, examinaram espécimes representativas de cada um dos seis clados encontrados por Beati et al. (2013). O resultado deste estudo foi a elucidação da existência de seis espécies distintas englobando *Amblyomma cajennense* sensu lato (com três novas descrições e duas redescrições) (NAVA et al., 2014), onde se inclui *A. sculptum*. Esta espécie por sua vez, foi primeiramente descrita por Berlese (1888) e posteriormente sinonimizada a *A. cajennense*, o que permaneceu até recentemente, quando este táxon foi reavaliado (NAVA et al., 2014). Entretanto, antes mesmo de sua redescrição, *A. sculptum* já tinha sido alvo de atenção devido ao seu polimorfismo genético entre diferentes populações do sudeste do Brasil (BEATI et al., 2013).

Recentemente, Martins et al. (2016) demonstraram a distribuição geográfica de duas espécies do complexo no Brasil: *A. cajennense* sensu stricto, restrito à região amazônica e *A. sculptum*, com ocorrência em algumas áreas em simpatria com *A. cajennense* sensu stricto, mas principalmente relacionado aos biomas Cerrado, Pantanal e ainda, regiões degradadas de Mata Atlântica, sem cobertura vegetal original (MARTINS et al., 2016). Assim, *A. sculptum* é incriminado como vetor de FBM no interior do estado de São Paulo, o que representa o segundo cenário ecológico da transmissão de *R. rickettsii* no Brasil, destacando neste caso, a presença de capivaras como hospedeiros amplificadores da infecção (LABRUNA, 2009a; SOUZA et al., 2009).

Por outro lado, é importante ressaltar que, nem todas as áreas com presença de capivaras retrata uma área endêmica para FBM. Embora as razões para isto sejam desconhecidas e, levando em consideração o polimorfismo genético das populações de *A. sculptum*, seria interessante especular que a distribuição de febre maculosa no Brasil esteja relacionada a susceptibilidades diferenciadas de seus vetores à infecção por *R. rickettsii*. Soares et al. (2012) conduziram um estudo com o propósito de estudar a interação de uma população de *A. sculptum* de área endêmica para FBM (Pedreira, SP) e *R. rickettsii*. Porém, a cepa da bactéria utilizada foi originalmente isolada de *A. aureolatum*, deixando em dúvida se os resultados encontrados realmente refletiriam a relação hospedeiro-parasito de forma semelhante como ocorre na natureza.

Conforme exposto anteriormente, o foco do presente estudo, em um primeiro momento, foi estudar a susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii* em diferentes populações de *A. sculptum*, tentando relacionar diferentes susceptibilidades à origem da população de carrapatos (área endêmica ou não endêmica para FMB) e também, correlacionar os resultados encontrados na infecção experimental ao perfil genético para dois marcadores de carrapatos, 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear.

Para tal, as populações de *A. sculptum* de áreas endêmicas para FMB, Itu, Piracicaba e Belo Horizonte; e as de áreas não endêmicas, Pirassununga, Poconé e Parque Nacional Grande Sertão Veredas foram expostas à infecção por *R. rickettsii* em diferentes estágios do ciclo de vida, por duas gerações de laboratório.

Quando avaliada a manutenção horizontal da bactéria nos carrapatos de primeira e segunda gerações (F_1 e F_2), os resultados de todas as populações de *A. sculptum* avaliadas no presente estudo demonstraram refratariedade a *R. rickettsii*, visto que, independente do estágio de exposição à bactéria, as frequências de infecção encontradas nunca foram 100%. Na verdade, a refratariedade de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) já havia sido evidenciada em outros estudos (LABRUNA et al., 2008; SOARES et al., 2012), embora a cepa da bactéria utilizada (cepa Taiaçu) não fosse originalmente isolada da espécie de carrapato utilizada no estudo, e sim de *A. aureolatum*. Além disso, Labruna et al. (2008) demonstraram que larvas de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) de duas populações distintas, uma de área endêmica (Pedreira, São Paulo) e uma de área não endêmica (Pirassununga, São Paulo) foram refratárias à infecção por *R. rickettsii* (também cepa Taiaçu), diferentemente de larvas de *A. aureolatum* e *R. sanguineus*, cujas frequências de infecção encontradas variaram entre 90 e 100% (LABRUNA et al., 2008).

No presente estudo buscou-se avaliar também, dentro de cada população de *A. sculptum*, se o estágio dos carrapatos que foram expostos a *R. rickettsii* poderia influenciar na susceptibilidade à infecção. Assim, três grupos de exposição à bactéria foram avaliados, GL (exposição como larvas), GN (exposição como ninfas) e GL/GN (exposição, na mesma geração de carrapatos, no estágio de larva e ninfa). Os resultados encontrados mostraram uma tendência de que, no grupo GL/GN, as frequências de infecção por perpetuação transestadial fossem maiores, embora sem diferença estatística. Exceção para este resultado foi observado na população de Pirassununga, onde tal diferença foi clara na frequência de infecção por perpetuação transestadial (ninfas para adulto) entre GL/GN e GN (Tabela 7). Entretanto há de se ressaltar que, na população de Itu, onde também foi encontrada diferença significativa

neste parâmetro entre GL/GN (60%) e GN (0%) (Tabela 1), a frequência de infecção nula não refletiu a real frequência de infecção neste grupo de carrapatos, como demonstrado nos animais que foram posteriormente infestados por tais paraitos (Apêndice A - Tabela B).

Os resultados da comparação exposta anteriormente, embora experimental, se extrapolados epidemiologicamente, poderiam sugerir algum efeito na relação capivara-*A. sculptum*-*R. rickettsii*. Capivaras são hospedeiros amplificadores da infecção por *R. rickettsii*, além de hospedeiros primários para *A. sculptum*. Porém, sabe-se que o período de riquetsemia nestes animais dura aproximadamente 10 dias, tornando-se depois, imunes (SOUZA et al., 2009; LABRUNA, et al., 2013). Por outro lado, são animais altamente prolíferos (OJASTI, 1973), e animais jovens (filhotes), que são susceptíveis a *R. rickettsii*, se tornam os amplificadores da infecção. Portanto, em uma determinada população de capivaras, mantidas em área restrita, com oferta de alimentos e sem manejo reprodutivo, o encontro de diversos estágios de *A. sculptum* de uma mesma geração com hospedeiros em bacteremia poderia se favorecer, aumentando assim, a frequência de infecção nos carrapatos do local. Se este local tiver presença constante de humanos, a exposição a carrapatos infectados estaria aumentada, com maior risco de casos FMB no local. De fato, áreas endêmicas para FMB cujo vetor é *A. sculptum*, têm sido cada vez mais associadas a populações de capivaras mantidas em regiões antropizadas, geralmente relacionadas a áreas de lazer humano, e que possuem condições de alimentar e reproduzir estes animais, como foi o caso de Itu (KRAWCZAK et al., 2014) e Lagoa da Pampulha, em Belo Horizonte.

Ainda neste raciocínio, e não menos importante, cabe ressaltar que gambás também já foram tidos como possíveis hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii*, já que são abundantes em áreas endêmicas para FMB no Brasil, são infestados por estágios imaturos de *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*) e apresentam títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii* (HORTA et al., 2009). Neste sentido, a amplificação da infecção no sentido de expor carrapatos de uma mesma geração à infecção também poderia ser extrapolado para estes hospedeiros. Entretanto, a relação de gambás como hospedeiros amplificadores naturais de *R. rickettsii* e sua importância em áreas endêmicas para FMB não está totalmente elucidada, tal como para capivaras.

A manutenção vertical de *R. rickettsii* em diferentes populações de *A. sculptum* também foi avaliada no presente trabalho. Para isso, foram calculadas as frequências de transmissão transovariana (FTO) e frequência de infecção filial (FIF) em ovos e larvas após a exposição a *R. rickettsii* nos diversos grupos experimentais. Os valores encontrados para FTO nas

diferentes populações e nos diferentes grupos de exposição sempre foram menores que 50%. E dentre as fêmeas que transmitiram a infecção para sua progênie, as frequências de infecção filial (FIF) para ovos e larvas variou muito dentre as diferentes populações estudadas (de 0 a 100%) e não foi possível observar algum padrão de variabilidade de acordo com o estágio de exposição à infecção. Assim, além de os resultados do presente estudo serem semelhantes aqueles encontrados por Soares et al. (2012) com relação às frequências de infecção para transmissão transovariana (FTO e FIF) de *R. rickettsii* (cepa Taiaçu) em carrapatos *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*), sustenta-se a hipótese levantada por estes autores de que, a transmissão vertical por si só não é capaz de manter uma população de *A. sculptum* infectada com por múltiplas gerações.

Estes resultados contrastam com o que já é conhecido para a relação *A. aureolatum*-*R. rickettsii*. Labruna et al. (2011b) demonstraram total susceptibilidade desta espécie de carrapato à infecção, obtendo valores para a manutenção vertical de 100% (FTO e FIF) por quatro gerações de laboratório. Assim, foi sugerido que, embora *A. aureolatum* seja mais eficiente que *A. sculptum* na manutenção de *R. rickettsii* (SOARES et al., 2012), a transmissão vertical por si só também não é capaz de manter populações de carrapatos infectados, visto que fêmeas ingurgitadas de *A. aureolatum* tiveram alta mortalidade e baixo desempenho reprodutivo quando infectadas (efeito deletério da infecção) (LABRUNA et al., 2011b).

Por outro lado, quando avaliados os resultados da infecção por *R. rickettsii* em estágios imaturos de *A. aureolatum*, inexpressivo efeito foi observado (LABRUNA et al., 2011b). No presente estudo, também foi avaliado se a infecção por *R. rickettsii* poderia causar algum efeito deletério nos diferentes estágios de *A. sculptum*, avaliados pelo sucesso de ecdise nos imaturos e pelos parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas. Com relação aos imaturos, algum efeito deletério da infecção pode ser sugerido visto que, na maioria das vezes, o sucesso de ecdise de larvas e ninfas foi menor nos grupos de exposição à infecção quando comparados ao grupo controle. E embora não tenham sido observadas altas taxas de mortalidade dentre os carrapatos infectados, há de se ressaltar que, em longo prazo, estas diferenças no sucesso de ecdise poderiam diminuir drasticamente o número de carrapatos albergando *R. rickettsii*. Este resultado também reforça a necessidade da manutenção da infecção também pela presença constante de um hospedeiro vertebrado amplificador e que crie, portanto, novas linhagens de carrapatos *A. sculptum* infectados. Soares et al. (2012) também encontraram uma proporção significativamente menor de sucesso na ecdise entre os

carrapatos infectados, embora a cepa da bactéria utilizada por estes autores não tenha sido originalmente isolada de *A. sculptum*.

Os parâmetros biológicos e reprodutivos das fêmeas ingurgitadas no presente estudo puderam ser avaliados separadamente entre carrapatos infectados e não infectados visto que, todas as fêmeas alimentadas nos coelhos foram testadas por PCR em tempo real após o período de ovipostura. Os resultados encontrados demonstraram haver pouco ou nenhum efeito prejudicial da infecção no desempenho reprodutivo das fêmeas infectadas, tanto para as diferentes populações de *A. sculptum* quanto para os diferentes grupos de exposição à infecção. Assim, alterações significativas foram observadas de forma pontual em favor das fêmeas ingurgitadas não infectadas, como por exemplo, a taxa de eclosão das larvas no GN da população de ITU (Figura 3b) e o índice de eficiência da conversão de peso da fêmea ingurgitada em ovos ou IECO no GL na população PAMP (Figura 18a).

Estes resultados foram diferentes dos obtidos por Soares et al. (2012), que encontraram diferenças significativas também para os pesos da fêmea ingurgitada e massa de ovos, sugerindo um baixo desempenho reprodutivo entre os carrapatos infectados e ainda, valores de FTO e FIF sempre abaixo de 50%. Assim, embora não tenha sido observada alta mortalidade entre os carrapatos infectados no estudo de Soares et al. (2012), é possível que uma incompatibilidade entre cepa de *R. rickettsii* (isolada de *A. aureolatum* e não de *A. sculptum*) poderia estar associado a este resultado, já que no presente estudo não foram observadas tais alterações tão claramente. De fato, estudos anteriores com *Rhipicephalus sanguineus* e *Rickettsia conorii* (MATSUMOTO et al., 2005; LEVIN et al., 2009; SOCOLOVSKI et al., 2009b) já evidenciaram efeitos contrastantes de diferentes isolados da bactéria em populações de carrapatos de localidades distintas.

Ainda neste contexto, somente no GN da população ITU poderia ser sugerido algum efeito deletério da infecção por *R. rickettsii*, visto que, 100% das fêmeas com transmissão transovariana tiveram taxa de eclosão igual a 0 (Tabela 3). Ressalta-se que os estudos mais recentes de avaliação dos efeitos de *R. rickettsii* em diversas espécies de carrapatos não foram capazes de explicitar efeito deletério claro da infecção sobre os carrapatos (FREITAS et al., 2009; PIRANDA et al., 2011; SOARES et al., 2012), inclusive quando bactéria e carrapatos eram de mesma localidade (SCHUMACHER et al., 2016). Por isso, o achado do presente estudo pode ter sido ocasional, já que em algumas populações de *A. sculptum* estudadas, tanto nas fêmeas do grupo controle quanto nas expostas à infecção (mas negativas na PCR em

tempo real), também foram observadas algumas fêmeas com taxas de eclosão mais baixas ou nulas (dados não mostrados).

No presente estudo, foi possível avaliar também a competência vetorial das larvas provenientes de fêmeas com TTO, independente da FIF encontrada para ovos e larvas. Assim, em todas as fêmeas com TTO e taxa de eclosão não nula, as larvas resultantes foram colocadas para se alimentar em cobaias susceptíveis. Interessantemente, os resultados encontrados mostraram sucesso quase total para a transmissão de *R. rickettsii* por tais larvas, como demonstrado pelos sinais clínicos de riquetsiose e sorologia com altos títulos de anticorpos (de até 65536) nos animais infestados. Estes resultados contrastaram com anteriores que avaliaram transmissão vertical de *R. rickettsii* em *A. sculptum* (publicado como *A. cajennense*). Monteiro et al. (1932) foram incapazes de demonstrar transmissão de *R. rickettsii* por larvas provenientes de fêmeas com TTO. Soares et al. (2012) demonstraram que este fenômeno ocorre em raros casos, e mesmo assim, provocando baixos títulos de anticorpos nas cobaias infestadas.

Assim, nas populações de *A. sculptum* ITU (Itu), PIS (Pirassununga), GSV (Grande Sertão Veredas) e PAMP (Belo Horizonte) foi demonstrada haver transmissão de *R. rickettsii* via larvas infectadas verticalmente, com sintomatologia clínica (período febril e reação escrotal) e reação sorológica positiva nas cobaias infestadas. Em algumas populações de *A. sculptum*, os estágios subsequentes a estas larvas também foram infestados até quando possível, e na maioria das vezes, 100% de perpetuação transestadial foi observada. Assim, seria justo especular que, a infecção por uma cepa de *R. rickettsii* originalmente isolada da espécie de carrapato estudada, sendo mais eficiente, poderia favorecer a competência vetorial de larvas infectadas verticalmente. Curiosamente, os estudos anteriores com *R. rickettsii* e *A. sculptum* (publicados como *A. cajennense*) utilizaram isolados de bactéria de *A. aureolatum* (LABRUNA et al., 2008; SOARES et al., 2012). Possivelmente, o estudo de Monteiro et al. (1932) também não utilizou cepa de *R. rickettsii* de *A. sculptum*, já que neste, a cepa da bactéria utilizada foi isolada de casos humanos ocorridos na cidade de São Paulo, que provavelmente se deram em áreas de transmissão por *A. aureolatum*.

Comparando todas as populações de carrapatos do presente estudo, frequência de infecção por perpetuação transestadial (Tabela 22) e por transmissão transovariana (Tabela 23), apesar de algumas diferenças significativas terem sido encontradas, não foi possível correlacionar maior ou menor susceptibilidade à infecção com a localidade de origem dos carrapatos (área endêmica e não endêmica). Quando avaliada a taxa de letalidade de animais

susceptíveis provocada por alimentação de carrapatos infectados em estágios anteriores, não houve correlação entre este parâmetro e susceptibilidade à infecção. Inicialmente esta correlação foi pensada em existir pelo fato de que, uma população altamente susceptível à infecção poderia gerar um maior número de carrapatos infectados, que refletiria no óbito dos animais infestados (Tabela 24). Entretanto, há de se ressaltar que houve uma tendência de alguns parâmetros (perpetuação transestadial, transmissão transovariana e taxa de letalidade) serem numericamente maiores nas populações ITU, PIS, GSV e PAMP, nas quais também foi possível perpetuar a infecção através da alimentação de carrapatos resultantes de fêmeas com transmissão transovariana em animais susceptíveis. Tais resultados sugerem susceptibilidades diferenciadas entre as populações de *A. sculptum* estudadas, embora sem um padrão claro nos parâmetros avaliados.

Assim, através dos resultados da infecção experimental, as populações ITU, PIS, GSV e PAMP foram mais susceptíveis à infecção que as populações PIC e PAN, com uma tendência de a ITU e a PAMP (áreas endêmicas) serem ainda mais. Por outro lado, a população de *A. sculptum* de Piracicaba (PIC), também área endêmica para FMB, foi uma das menos susceptíveis à infecção dentre as estudadas no presente trabalho. Isto ficou evidenciado pela refratariedade a *R. rickettsii* na primeira geração destes carrapatos e ausência de transmissão transovariana na segunda geração (Tabela 5). Infelizmente, não foi possível verificar se a refratariedade se deu devido à morte dos carrapatos infectados (efeito deletério) ou porque a população realmente não adquiriu a infecção.

Mesmo assim, os resultados obtidos para a população PIC contrastaram muito com os resultados obtidos nas outras duas populações de área endêmica para FMB estudadas, ITU e PAMP, cuja infecção se deu com cepas de *R. rickettsii* originalmente isoladas de mesma localidade (respectivamente cepas Itu e Pampulha). Na população de Piracicaba, a cepa utilizada foi originalmente isolada do município de Itu. Com estes resultados, caberia especular que algum provável polimorfismo genético existente também entre cepas de *R. rickettsii* de localidades diferentes poderia influenciar na susceptibilidade à infecção, reforçando a existência de uma melhor adaptação entre cepas da bactéria e do carrapato autóctones. Entretanto, Labruna et al. (2014) foram incapazes de detectar polimorfismo genético entre diferentes isolados de *R. rickettsii* do Brasil, como tem sido detectado nos Estados Unidos (KARPATY et al., 2007; PADDOCK et al., 2014). Se mesmo com a ausência de polimorfismo nos marcadores moleculares utilizados por Labruna et al. (2014) as cepas de *R. rickettsii* do Brasil poderiam apresentar diferentes mecanismos de interação com

diferentes populações do carrapato, e portanto, aumentar ou diminuir a susceptibilidade dos parasitos à infecção, ainda permanece desconhecido.

Interessantemente, com os resultados do presente estudo, ficou evidenciada a susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii* de populações de *A. sculptum* de áreas não endêmicas para FMB, como demonstrado pelas populações de Pirassununga, Grande Sertão Veredas, e em menor grau, pela população de Poconé. Estudos anteriores nestas áreas foram incapazes de comprovar a circulação de *R. rickettsii* entre carrapatos e/ou hospedeiros vertebrados, embora outras espécies de *Rickettsia* spp. tenham sido demonstradas por sorologia de animais ou biologia molecular em carrapatos, como *Rickettsia parkeri* e *Rickettsia bellii* em Pirassununga (HORTA et al., 2007; SOUZA et al., 2008), *R. parkeri*, *R. bellii*, *Rickettsia amblyommii* e “*Candidatus Rickettsia andeanae*” no Parque Nacional Grande Sertão Veredas (BARBIERI, 2016) e *R. amblyommii* em Poconé (MELO et al., 2011; ALVES et al., 2014). Neste contexto, poderia ser sugerido que a presença de outras espécies de *Rickettsia* nestas áreas, poderiam impedir o estabelecimento de *R. rickettsii*. De fato, Burgdorfer et al. (1981) e Macaluso et al. (2002) evidenciaram que a presença de uma espécie de *Rickettsia* não patogênica em carrapatos também infectados com *R. rickettsii* poderia impedir a transmissão da última, principalmente por uma eficiente competição na transmissão vertical.

As seis populações de *A. sculptum* deste estudo também foram avaliadas filogeneticamente pelos marcadores 16S rDNA mitocondrial de ITS2 nuclear. Primeiramente, não foram encontradas divergências genéticas para os dois marcadores utilizados entre carrapatos infectados e aqueles não infectados, de uma mesma população de *A. sculptum* (dados não mostrados). Para o marcador ITS2 nuclear, não foram encontradas sequer variações entre as diferentes populações de carrapatos aqui estudadas, e nem entre sequências obtidas por Beati et al. (2013), cuja origem foi diferente das populações do presente trabalho (Figura 19). Por outro lado, quando analisado o marcador 16S rDNA mitocondrial, apesar de as sequências obtidas de cada uma das populações de *A. sculptum* não constatarem divergências genéticas que pudessem ser atribuídas a maior susceptibilidade ou refratariedade à infecção por *R. rickettsii*, variabilidade nucleotídica foi observada entre algumas populações, que parece seguir padrões geográficos de origem. A exceção para este resultado foi visto na população da Pampulha (Belo Horizonte), que apresentou variabilidade intrapopulacional, tendo um genótipo semelhante à população do Parque Nacional Grande Sertão Veredas (GSV) de Minas Gerais e um segundo genótipo idêntico ao de Itu, São Paulo

(Figura 20). Cabe ressaltar que nos dois genótipos encontrados para a população PAMP havia sequências de amostras de carrapatos infectados e não infectados, o que impediu a correlação entre perfil genético e susceptibilidade à infecção.

Juntos, estes resultados refutaram a hipótese inicial do trabalho, na qual era esperado encontrar divergências genéticas entre amostras de carrapatos infectados e não infectados (mas expostos à infecção) dentro de uma mesma população ou ainda, entre as populações estudadas. Assim, não foi possível correlacionar os resultados moleculares com aqueles encontrados na infecção experimental para susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii*. Na verdade, os marcadores utilizados neste trabalho têm sido utilizados com sucesso para constatar polimorfismos genéticos entre populações de uma mesma espécie de carrapato ou entre espécies intimamente relacionadas (LABRUNA et al., 2005b; REICHARD et al., 2005; NAVA et al., 2008; TROUT et al., 2010; BEATI et al., 2012; BEATI et al., 2013; LADO et al., 2016, no prelo³). Porém, talvez seja pertinente sugerir que, através dos resultados do presente trabalho, os dois fragmentos utilizados não atuaram como bons marcadores para susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii*.

Estudo recente conduzido por Ogrzewalska et al. (2016) avaliou, através de microsatélites, a estrutura genética em seis populações de *A. aureolatum*, duas delas de área endêmica para FMB e quatro áreas não endêmicas ou sem o relato da doença até então. A hipótese do referido trabalho, que também foi a correlação entre a presença de determinado genótipo do carrapato com a circulação de *R. rickettsii* foi negada, já que baixa variabilidade foi encontrada (OGRZEWSKA et al., 2016). Além disso, estes autores sugeriram a possibilidade de fatores ecológicos (e não genéticos) estarem associados à presença ou ausência de *R. rickettsii* em diferentes populações de *A. aureolatum* (OGRZEWSKA et al., 2016). Se tais fatores poderiam atuar também na relação *A. sculptum*-*R. rickettsii* e então determinar a circulação ou não da bactéria em diferentes populações do carrapato, ainda permanece desconhecido.

O presente trabalho foi, a saber, o primeiro a confirmar a competência vetorial de larvas de *A. sculptum* provenientes de fêmeas com transmissão transovariana, para a transmissão de *R. rickettsii*, o que antes pensava-se não ser possível (MONTEIRO et al., 1932;

³LADO, P. NAVA, S.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; DURDEN, L. A.; BERMUDEZ, S.; MONTAGNA, M.; QUIRÓS, A. C. S.; BEATI, L. *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae): Phylogeography and systematic considerations. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 2016. No prelo.

MAGALHÃES 1952) ou que ocorreria em raras exceções (SOARES et al., 2012). Ainda, deve-se ressaltar que tais resultados foram obtidos em de infecção experimental, em laboratório. Para provar que os resultados obtidos aqui ocorrem na natureza, são necessários mais estudos, como foi sugerido por Socolovschi et al. (2009b), com relação à carga bacteriana de *R. conorii* obtida por infecção experimental de *R. sanguineus* versus condições naturais. Além disso, a presença de hospedeiros que atuem como reservatórios competentes da infecção na natureza também poderia equilibrar os efeitos que a infecção por *Rickettsia* spp causam em seus vetores (SOCOLOVSKI, et al., 2009b).

Assim, por hora têm-se que, carrapatos *A. sculptum*, infectados experimentalmente com cepa de *R. rickettsii* originalmente isolada da mesma espécie de carrapato, mantém o comportamento de refratariedade à infecção, como visto por estudos anteriores (LABRUNA et al., 2011b; SOARES et al., 2012). Porém, dependendo da população de *A. sculptum* a manutenção da infecção seja por perpetuação transetsadial ou por transmissão transovariana, pode ser diferenciada. O presente trabalho confirma a competência vetorial de larvas de *A. sculptum* provenientes de fêmeas com TTO na infecção de animais susceptíveis, tanto em populações de áreas endêmicas para FMB como para aquelas originadas em áreas não endêmicas. Entretanto, com os marcadores genéticos utilizados, este trabalho foi incapaz de relacionar perfil genético à susceptibilidade da infecção por *R. rickettsii* nas populações de *A. sculptum* estudadas.

7 CONCLUSÕES

- Experimentalmente, a susceptibilidade de *A. sculptum* à infecção por *R. rickettsii* não parece ser aumentada ou diminuída de acordo com o estágio do carrapato que foi exposto à infecção (larva, ninfa ou larva e ninfa), embora tenha sido observada uma tendência de as frequências de infecção por perpetuação transestadial serem maiores quando o carrapato foi infectado nos dois estágios imaturos (larva e ninfa) da mesma geração;
- Independente da população avaliada, o sucesso de ecdise dos estágios imaturos de *A. sculptum* parece sofrer algum efeito deletério da infecção por *R. rickettsii*, já que na maioria das vezes, proporções significativamente menores de carrapatos infectados sofreram ecdise quando comparados ao grupo controle, sem infecção;
- Os parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* não parecem sofrer efeito deletério da infecção por *R. rickettsii* nas diferentes populações de *A. sculptum* estudadas, muito embora houve alterações significativas pontuais em favor das fêmeas ingurgitadas não infectadas;
- Diferentes populações de *A. sculptum*, quando infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*, apresentam diferenças na susceptibilidade à infecção, com maiores ou menores frequências de infecção por perpetuação transestadial e transmissão transovariana;
- As susceptibilidades diferenciadas encontradas no presente estudo não teve relação clara com endemicidade da área de origem dos carrapatos para FMB, tão pouco com o perfil genético dos carrapatos para os dois marcadores utilizados (16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear);
- Os marcadores moleculares 16S rDNA mitocondrial e ITS2 nuclear não foram adequados para correlação entre perfil genético e susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii* nas populações de *A. sculptum* estudadas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, A. S.; MELO, A. L. T.; AMORIM, M. V.; BORGES, A. M. C. M.; SILVA, L. G.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M.; PACHECO, R. C. Seroprevalence of *Rickettsia* spp. in equids and molecular detection of ‘*Candidatus Rickettsia amblyommii*’ in *Amblyomma cajennense* sensu lato ticks from the Pantanal region of Mato Grosso, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 51, n. 6, p. 1242-1247. 2014.
- ARAÚJO, R. A.; ALMEIDA, A. J.; TORQUETTI, C. G.; FICHE, H.; TALAMONI, S. A. Monitoramento de um Grupo de Capivaras, *Hydrochaeris hydrochaeris*, (Mammalia: Rodentia) em um Parque Urbano na Região da Pampulha, Belo Horizonte, Brasil. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** 2007.
- BARBIERI, A. R. M. **Ecologia de carrapatos e riquetsias transmitidas por carrapatos em uma reserva natural de cerrado brasileiro**. 2016. 103 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.
- BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMAN-CORNEJO, C.; LÉON, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and allopatric divergence in the New World. **BMC Evolutionary Biology**, v. 13, n. 267, p. 1-20, 2013.
- BEATI, L.; PATEL, J.; LUCAS-WILLIAMS, H.; ADAKAL, H.; KANDUMA, E. G.; TEMPO-MWASE, E.; KRECEK, R.; MERTINS, J. W.; ALFRED, J. T.; KELLY, S.; KELLY, P. Phylogeography and demographic history of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the tropical bont tick. **Vector-borne and Zoonotic Diseases**, v. 12, n. 6, p. 514-525, 2012.
- BERLESE, A. Acaro austro-americani. **Bollettino della Societa Entomologica Italiana**, v. 20, p. 171-242, 1988.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. Fundação Pró-Natureza. **Plano de manejo**: parque nacional grande sertão veredas. Brasília, DF, MMA, FUNATYRA, IBAMA, 2003. 428 p.
- BRITES-NETO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; BRASIL, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F.; VERÍSSIMO, C. J.; BARBIERI, A. R. M.; LABRUNA, M. B. Environmental infestation and rickettsial infection in ticks in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 367-372, 2013.

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.; HAYES, S. F.; MAVROS, A. J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: BURGDORFER, W.; ANACKER, R. L. (Ed.). **Rickettsiae and rickettsial diseases**. New York, NY: Academic Press, 1981. p. 585-594.

BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D. H. **Biology of Rickettsial Diseases**, Boca Raton: CRC Press, 1988. p. 33-50.

Del FIOL, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO-FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 27, p. 461-466, 2010.

De BRITO, T.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; PEREIRA, M. O.; RIGILON, N. The pathogenesis of the vascular lesions in experimental Rickettsial disease of the guinea pig (Rocky Mountain Spotted Fever Group) a light, immunofluorescent and electron microscopic study. **Virchows Archiv für Pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin**. v. 358, p. 205-214, 1973.

EREMEEVA, M. E.; SILVERMAN D. J. *Rickettsia rickettsii* infection of the EA.hy 926 endothelial cell line: morphological response to infection and evidence for oxidative injury. **Microbiology**, v. 144, p. 2037-2048, 1998.

ESTRADA-PENA, A.; TARRAGONA, E. L.; VESCO, U.; MENEGHI, D.; MASTROPAOLO, M.; MANGOL, A. J.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Divergent environmental preferences and areas of sympatry of tick species in the *Amblyomma cajennense* complex (Ixodidae). **International Journal for Parasitology**, v. 44, p. 1081-1089, 2014.

FERRAZ K. M. P. M. B.; FERRAZ, S. F. B.; MOREIRA, J. R.; COUTO, H. T. Z.; VERDADE, L. M. Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis. **Journal of Biogeography**, v. 34, p. 223-230, 2007.

FREITAS, L. H.; FACCINI, J. L.; 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.; LAMOUNIER, J. A.; BONOMO, E.; TROPPIA, M. S.; REZENDE, E. G.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MACHADO, M. C.; OTONI, M. E. A.; LEITE, R. C.;

CARAM, C.; MAFRA, C. L.; WALKER, D. H. Rickettsioses emergentes e reemergentes numa região endêmica do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 18, n. 6, p. 1593-1597, 2002.

GALVÃO, M. A. M.; DUMLER, J. S.; MAFRA, C. L.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; CESARIO FILHO, G.; OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Fatal Spotted Fever Rickettsiosis, Minas Gerais, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, n. 11, p. 1402-1405, 2003.

GREER, A.; NG, V.; FISMAN, D. Climate change and infectious diseases in North America: the road ahead. **Canadian Medical Association Journal**, v. 178, p. 715-722, 2008.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; 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, n. 8, p. 841-845, 2005.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium**, n. 41, p. 95-98, 1999.

HORTA M. C.; LABRUNA, M. B.; SANGIONI, L. A.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; GALVÃO, M. A.; MAFRA, C. L.; VIDOTTO, O.; SCHUMAKER, T. T.; WALKER, D. H. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group *Rickettsia*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

HORTA, M. C.; PINTER, A.; CORTEZ, A.; SOARES, R. M.; GENNARI, S. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 7, n. 3, p. 321-325, 2005.

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

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

HUBALEK, Z.; HALOUZKA, J. West Nile Fever - a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 5, p. 643-650, 1999.

KAMEY, D. A. **Alguns componentes da biodiversidade da Lagoa da Pampulha e seu papel como bioindicadores**. 2010. 29 f. (Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Bilógicas). Centro Universitário Metodista, Belo Horizonte, 2010.

KARPATHY, S. E.; DASCH, G. A.; EREMEEVA, M. E. Molecular typing of isolates of *Rickettsia rickettsii* by use of DNA sequencing of variable intergenic regions. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 2545-2553, 2007.

KATZ, G.; CARMAGO-NEVES, V. L. F.; ANGERAMI, R. N.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa brasileira no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 6, p. 4-13, 2009.

KRAWCZAK, F.S.; NIERI-BASTOS, F. A.; NUNES, F. P.; SOARES, J. F.; MORAES-FILHO, J.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma cajennense* ticks and capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 7, p. 1-7, 2014.

KUNZ, W. When is a parasite species a species? **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 121-123, 2002.

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, n. 1, p. 90-98, 2004

LABRUNA, M. B.; CAMARGO, L. M.; 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, 2005a.

LABRUNA, M. B.; KEIRAN, J. E. CAMARGO, L. M. A.; RIBEIRO, A. F.; MARTINS, R. S.; CAMARGO, E. P. *Amblyomma latepunctatum*, a valid tick species (Acari: Ixodidae) long misidentified with both *Amblyomma incisum* and *Amblyomma sculpturatum*. **The Journal of Parasitology**, v. 91, p. 527-541, 2005b.

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

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

LABRUNA, M. B.; NARANJO, V.; MANGOLD, A. J.; THOMPSON, C.; ESTRADA-PENA, A.; GUGLIELMONE, A. A.; JONGEJAN, F.; De La FUENTE, J. Allopatric speciation in ticks: genetic and reproductive divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, v. 9, n. 46, p. 1-12, 2009b.

LABRUNA, M. B.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. F.; SOARES, H. S.; CABRERA, R. R. Cross-mating experiments with geographically different populations of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, v. 54, p. 41-49, 2011a.

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

LABRUNA M. B. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. In: MOREIRA, J. R.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; HERRERA, E. A.; MACDONALD, D. W. **Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species**. New York: Springer Science Business Media, 2013. p. 371-383.

LABRUNA, M. B.; SANTOS, F. C. P.; OGRZEWALSKA, M.; NASCIMENTO, E. M. M.; COLOMBO, S.; MARCILI, A.; ANGERAMI, R. N. Genetic identification of *Rickettsial* isolates from fatal cases of Brazilian Spotted Fever and comparison with *Rickettsia rickettsii* isolates from American continents. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 52, n. 10, p. 3788-3791, 2014.

LEMO, E. R. S.; ROZENTAL, T.; VILLELA, C. L. Brazilian spotted fever: description of a fatal clinical case in the State of Rio de Janeiro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 5, p. 523-525, 2002.

LEVIN, M. L.; KILLMASTER, L. F.; ZEMTSOVA, G.; GRANT, D.; MUNKUOGLU, K. Y.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A. Incongruent effects of two isolates of *Rickettsia conorii* on the survival of *Rhipicephalus sanguineus* ticks. **Experimental and Applied Acarology**, v. 49, p. 347-359, 2009.

MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Experimental infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. **Vector Borne Zoonotic Diseases**, v. 5, p. 363-372, 2005.

LIMA, V. C. L.; FIGUEIREDO, A. C.; PIGNATTI, M. G.; MODOLO, M., Febre maculosa no Município de Pedreira, Estado de São Paulo - Brasil - Relação entre ocorrência de casos e

parasitismo humano por ixodídeos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 28, p. 135-137, 1995.

LIMA V. C. L.; SOUZA, S. A. L.; SOUZA, C. E.; VILELA, M. F. G.; SANTOS, M. C. G.; PAPAORDANOU, P. M. O.; Del GUERCIO, V. M. F.; ROCHA, M. M. M. Situação da febre maculosa na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 19, n. 1, p. 331-334, 2003.

MAGALHÃES, O. Contribuição ao conhecimento das doenças do grupo tifo exantemático. In: **Monografia 6**. Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz, 1952.

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

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

MARCHINI, S.; FERRAZ, K. M. P. M. B. **Bichos da ESALQ, quais são, como vivem e como lidar com os animais silvestres no campus**. Piracicaba: ESALQ, 2014. 39 p.

MARRELLI, M. T.; SOUZA, L. F.; MARQUES, R. C.; LABRUNA, M. B.; MATIOLI, S. R.; TONON, A. P.; RIBOLLA, P. E.; MARINOTTI, O.; SCHUMAKER, T. T. Taxonomic and phylogenetic relationships between neotropical species of ticks from genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) inferred from second internal transcribed spacer sequences of rDNA. **Journal of Medical Entomology**, v. 44, n. 2, p. 222-228, 2007.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R.; COSTA F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M. A.; PETERKA, C. L. R.; PACHECO, R. C.; DIAS, R. A.; NUNES, P. H.; MARCILI, A.; SCOFIELD, A.; CAMPOS, A. K.; HORMA, M. C.; GUILLOUX, A. G.; BENATTI, H. R.; RAMIREZ, D. G.; BARROS-BATTESTI, D.; LABRUNA, M. B. Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense*. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 186, p. 1-14, 2016.

MELO, A. L. T.; MARTINS, T. F.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; AGUIAR, D. M. Seroprevalence and risk factors to *Ehrlichia* spp. and *Rickettsia* spp. in dogs from the Pantanal Region of Mato Grosso State, Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 213-218, 2011.

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

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, p. 49-52, 1932.

MONTEIRO, J. L. Comportamento experimental do coelho aos vírus do thypo exanthematico de São Paulo da febre maculosa das montanhas rochosas. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 8, p. 80, 1933.

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

MOREIRA, J. R. Taxonomy, natural history and distribution of the capybara. In: MOREIRA, J. R.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; HERRERA, E. A.; MACDONALD, D. W. **Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species**. New York: Springer Science Business Media, 2013. p. 3-37.

NAVA, S.; SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Distribution, hosts, 16S rDNA sequences and philogenetic position of the Neotropical tick *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). **Annals of Tropical Medicine & Parasitology**, v. 102, n. 5, p. 409-425, 2008

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and resurrection of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844 and *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 252-276, 2014.

NEO F. A.; MELO, J. S. C. Efeito do manejo de capivaras na ocorrência de carrapatos em áreas com trânsito de humanos. **HOLOS Environment**, v. 12, p. 250-258, 2012.

NOVAIS, C. R. A.; MORO, M. E. G. Levantamento qualitativo da fauna silvestre do Campus da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. In: **Simpósio Internacional de Iniciação Científica e Tecnológica da Usp**, 15, Pirassununga. 2007.

OGRZEWALSKA, M.; SARAIVA, D. G.; MORAES-FILHO, J.; MARTINS, T. F.; COSTA, F. B.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, n. 10, p. 1283-300, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; LITERAK, I.; MARTINS, T.F.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infections in ticks from wild birds in Paraguay. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, p. 83-89, 2014.

OJASTI, J. **Estudio biológico del chiguire o capibara**. Caracas, Venezuela: FONAIAP, 1973.

OSAVA, C. F. **Perfil sorológico contra *Rickettsia* spp e *Leptospira* spp e infestação de carrapatos em suínos mantidos sob diferentes sistemas de criação**. 2016. 96p. (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2016.

PACHECO, R. C.; HORTA, M. C.; MORAES-FILHO, J.; ATALIBA, A. C.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from Sao Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. **Biomedica**, v.27, p.364-371, 2007.

PADDOCK, C. D.; DENSION, A. M.; LASH, R. R.; LIU, L.; BATTEN, B. C.; DAHLGREN, F. S.; KANAMURA, C. T.; ANGERAMI, R. N.; SANTOS, F. C. P.; MARTINES, B. R.; KARPATY, S. E. Phylogeography of *Rickettsia rickettsia* genotypes associated with fatal Rocky Mountain Spotted Fever. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 91, p. 589-597, 2014.

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. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 13, p. 341-378, 1933.

PAROLA, P.; LABRUNA, M.B.; RAOULT D. Tick-borne rickettsioses in America: unanswered questions and emerging diseases. **Current Infectious Disease Reports**, v. 11, n. 1, p. 40-50, 2009.

PATZ, J.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; YITTER, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 1395-1405, 2000.

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

PHILIP, C.B. Some epidemiological considerations in Rocky Mountain spotted fever. **Public Health Reports**, v. 74, p. 595-600, 1959.

PINTER A.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Veterinary Parasitology**, v. 105, 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 of Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; PACHECO, R.C.; CANÇADO, P. H. D.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector-Borne Zoonotic Diseases**, v. 11, p. 29-36, 2011.

PIZA, J. T.; MEYER, G. R.; GOMES, L. S. Typho exanthematico de São Paulo, **Sociedade Impressora Paulista**, São Paulo, 156pp, 1932.

PRICE, W. T. The epidemiology of Rocky Mountain Spotted Fever II. Studies on the biological survival mechanism of *Rickettsia rickettsii*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, p. 292-319, 1954.

RANDOLPH, S. E. Evidence that climate change has caused ‘emergence’ of tick-borne diseases in Europe? **International Journal of Medical Microbiology**, v. 293, p. 5-15, 2004. Supplement, 37.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of *Rickettsiae* and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

REICHARD, M. V.; KOCAN, A. A.; Van Den BUSSCHE, R. A.; BARKER, R. W.; WYCKOFF, J. H.; EWING, S. A. Sequence variation of the ribosomal DNA second internal transcribed spacer region in two spatially distinct populations of *Amblyomma americanum* (L.) (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 91, n. 2, p. 260-263, 2005.

RICKETTS, H. T. Further experiments with the woodtick in relation to Rocky Mountain Spotted Fever.. **The Journal of the American Medical Association**, v. 49, p. 1278-1281, 1907.

RICKETTS, H. T. A micro-organism which apparently has a specific relationship to Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of the American Medical Association**, v. 52, p. 379-380, 1909.

ROSENTHAL, C. Riquetsioses. In: AMATO NETO, V. **Doenças transmissíveis**. 3. ed. São Paulo: Editora Savier, 1989. p. 737-751.

SANGIONI, L. A.; HORTA M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA,

M. B. Rickettsial Infection in Animals and Brazilian Spotted Fever Endemicity. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SANTOS, A. S.; BACELLAR, F.; SANTOS-SILVA, M.; FORMOSINHO, P.; GRACIO, A. J.; FRANCA, S. Ultrastructural study of the infection process of *Rickettsia conorii* in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus sanguineus*, **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 2, p. 165-177, 2002.

São Paulo, Secretaria de Vigilância Epidemiológica. Vigilância Epidemiológica: Agravos. Disponível em: cve.saude.sp.gov.br. Acessado em 24 de maio de 2016.

SCHUMACHER, L.; SNELGROVE, A.; LEVIN, M. L. Effect of *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) infection on the biological parameters and survival of its tick vector - *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 53, n. 1, p. 172-176, 2016.

SILVERMAN, D. J.; SANTUCCI, L. A. Potential for Free Radical-Induced Lipid Peroxidation as a Cause of Endothelial Cell Injury in Rocky Mountain Spotted Fever. **Infection and Immunity**, v. 56, n. 12, p. 3110-3115, 1988.

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology** v. 26, n. 2, p. 139-51, 2012.

SOCOLOVSCHI, C.; MEDIANNIKOV, O.; RAOULT, D.; PAROLA, P. The relationship between spotted fever group Rickettsiae and Ixodid ticks. **Veterinary Research**, v. 40, n. 34, p. 1-20, 2009a.

SOCOLOVSCHI, C.; MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* with *Rickettsia conorii conorii*. **European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v.15 (suppl. 2), p.324-325, 2009b.

SOUZA, C. E.; SOUZA, S. S. L.; LIMA, V. L. C.; CALIC, S. B.; CAMARGO, M. C. G. O.; SAVANI, E. S. M. M.; D'AURIA, S. R. N.; LINHARES, A. X.; YOSHINARI, N. H. Serological identification of *Rickettsia* spp from the spotted fever group in capybaras in the region of Campinas - SP - Brazil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1694-1699, 2008.

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

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MACHADO, R. Z.; MORAES-FILHO, J.; ZAGO, A. M.; DONATELE, D. M.; PINHEIRO, S. R.; SILVEIRA, I.; CALIARI, K. M.; YOSHINARI, N. H. Survey for tick-borne zoonoses in the state of Espírito Santo, southeastern Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 1, p. 201-206, 2010.

STEUBER, S.; ABDEL-RADY, A.; CLAUSEN, P. PCR-RFLP analysis: a promising technique for host species identification of blood meals from tsetse flies (Diptera: Glossinidae). **Parasitology Research**, v. 97, p. 247-254, 2005.

SZABÓ, M. P. J.; MANGOLD, A. J.; JOÃO, C. F.; BECHARA, G. H.; GUGLIELMONE, A. A. Biological and DNA evidence of two dissimilar populations of the *Rhipicephalus sanguineus* tick group (Acari: Ixodidae) in South America. **Veterinary Parasitology**, v. 130, p. 131-140, 2005.

SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B.; GARCIA, M. V.; PINTER, A.; CASTAGNOLLI, K. C.; PACHECO, R. C.; CASTRO, M. B.; VERONEZ, V. A.; MAGALHÃES, G.M.; VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, n. 1, p. 57-72, 2009.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TERASSINI, F. A.; BARBIERI, F. S.; ALBUQUERQUE, S.; SZABÓ, M. P. J.; CAMARGO, L. M.; LABRUNA, M. B. Comparison of two methods for collecting free-living ticks in the Amazonian forest. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 1, n. 4, p. 194-196, 2010.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIRIBA, A. C. Geografia médica das riquetsioses. In: LACAZ, C. S.; BARUZZI, R. G.; SIQUEIRA JR, W. **Introdução à geografia médica do Brasil**. São Paulo: Editora da USP (Edgar Blucher Ltda), 1972. 568 p.

TIRIBA, A. C.; MONTEIRO, E. V. Riquetsioses. In: VERONESI, R. **Doenças infecciosas e parasitárias**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. p. 213-226.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO-FREIRE, A. Criação artificial de *Amblyoma cajennense* para o preparo da vacina contra a Febre Maculosa. **Memórias do Instituto Butantã**, v. 18, p. 145-235, 1945.

TROUT, R. T.; STEELMAN, C. D.; SZALANSKI, A. L. Population genetics of *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from Arkansas. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 2, p. 152-161, 2010.

VENZAL, J.M.; NAVA, S.; TERASSINI, F. A.; OGRZEWALSKA, M.; CAMARGO, L. M.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros peropteryx* (Acari: Argasidae) in Bolivia: an argasid tick with a single nymphal stage. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, n. 2, p. 231-141, 2013.

UENO T.E.; COSTA, B. F.; SARAIVA, D. G.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of horses with *Rickettsia rickettsii* and evaluation of transmission to *Amblyomma cajennense* ticks - preliminary results. In: CONGRESO LATINOAMERICANO DE ENFERMEDADES RICKETTSIALES 4. San Jose, Costa Rica, 2013.

VERDADE, L. M.; FERRAZ, K. M. P. M. B. Capybaras in an anthropogenic habitat in southeastern Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 66, p. 371-378, 2006.

WALKER, D. H.; HARRISON, A.; HERDERSON, F.; MURPHY, F. A. Identification of *Rickettsia rickettsii* in a Guinea Pig Model by Immunofluorescent and Electron Microscopic Techniques. **American Journal of Pathology**, v. 86, p. 343-358, 1977.

WALKER, D. H. Pathology and pathogenesis of the vasculotropic rickettsioses. In: WALKER, D. H. **Biology of rickettsia1 diseases**. Boca Raton, FL: CRC Press, 1988. v. 1, p. 115-138.

WALSH, J. F.; MOLYNEUX, D. H.; BIRLEY, M. H. Deforestation: effects on vector-borne disease. **Parasitology**, v. 106, p. 55-75, 1993. Supplement, 1.

WEISS, E.; MOULDER, I. W. *Rickettsia*. In: KREIG, N. R.; HOLT, J. G. **Bergey's manual of systematic bacteriology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1984. p. 688-98.

WINKLER, H. H. *Rickettsia* species (as organisms). **Annual Review of Microbiology**, v. 44, p. 131-153, 1990.

APÊNDICES

APÊNDICE A

Tabelas de A - M com as informações detalhadas das infestações experimentais em seis populações de *A. sculptum* (ITU, PIC, PIS, PAN, GSV e PAMP).

Tabela A. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (ITU) na primeira geração de laboratório (F₁).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA ITU 1#	Infestadas com larvas F1	-	1516	não	não	não	nr
COBAIA ITU 2#	(GC)		998	não	-	não	nr
COBAIA ITU 3#			1102	não	-	não	nr
COBAIA ITU 4#	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	-	880	4 - 7	8	9	nr
COBAIA ITU 5#	e infestadas com larvas F1		976	4 - 7	8	9	nr
COBAIA ITU 6#	(GL)		937	3 - 6	7	8	nr
COELHO ITU 1#	Infestado com ninfas F1 (GC)	0/10 (0)	66	não	não	não	nr
COELHO ITU 2#	Infestado com ninfas F1 (GL)	0/20 (0)	188	7 - 13	10	não	4096
COELHO ITU 3#	Infestado com adultos F1 (GC)	0/10 (0)	30	não	não	não	nr
COELHO ITU 4#	Infestado com adultos F1 (GL)	1/20 (5)	22	não	-	não	nr

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente.

#Cobaias e coelhos utilizados para alimentar carrapatos de primeira geração de laboratório (F1), cujos dados não foram inclusos nas análises.

Tabela B. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (ITU) na segunda geração de laboratório (F₂).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA ITU 7	Infestadas com larvas F2	0/21 (0)*	1975	não	não	não	nr
COBAIA ITU 8	(GC)		102	não	não	não	nr
COBAIA ITU 9			1846	não	não	não	nr
COBAIA ITU 10#	Infestadas com larvas F2	0/19 (0)*	848	não	não	não	nr
COBAIA ITU 11#	(GL - F1)		1094	não	não	não	nr
COBAIA ITU 12#			796	não	não	não	nr
COBAIA ITU 13¥	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/21 (0)*	808	4 - 6	5	7	ND
COBAIA ITU 14¥	e infestadas com larvas F2		940	3 - 10	5	13	ND
COBAIA ITU 15¥	(GL)		1160	3 - 7	4	9	ND
COBAIA ITU 16	Infestadas com ninfas F2	0/10 (0)	86	não	não	não	nr
COBAIA ITU 17	(GC)		86	não	não	não	nr
COBAIA ITU 18			70	não	não	não	nr
COBAIA ITU 19	Infestadas com ninfas F2	4/25 (16)	94	8 - 11	-	13	128
COBAIA ITU 20	(GL)		82	6 - 10	-	11	128
COBAIA ITU 21			100	8 - 11	-	13	256
COBAIA ITU 22¥	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/10 (0)	72	3 - 6	6	7	ND
COBAIA ITU 23¥	e infestadas com ninfas F2		75	5 - 7	7	9	ND
COBAIA ITU 24¥	(GN)		87	5 - 8	-	10	ND
COELHO ITU 5	Infestados com adultos F2	0/10 (0)	7	não	não	não	nr
COELHO ITU 6	(GC)		7	não	não	não	nr
COELHO ITU 7	Infestados com adultos F2	5/15 (33,3)	11	8 - 11	10	14	1024
COELHO ITU 8	(GL)		11	10 - 12	não	não	2048
COELHO ITU 9	Infestados com adultos F2	0/15 (0)	8	6 - 10	10	13	1024
COELHO ITU 10	(GN)		13	6 - 8	10	12	128

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente; ND, não determinado.

*Pool de ovos testados.

#Cobaías e coelhos utilizados para alimentar carrapatos de primeira geração de laboratório (F1), cujos dados não foram incluídos às análises

¥Cobaías cujo sangue não foi colhido no dia do óbito para realização da sorologia, mas que apresentaram fragmentos de fígado, baço e pulmão positivos para *R. rickettsii* na PCR em tempo real.

Tabela C. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (ITU) na terceira geração de laboratório (F₃).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA ITU 25	Infestadas com larvas F3 (GC)	0/14 (0)*	632	não	não	não	nr
COBAIA ITU 26			509	não	não	não	nr
COBAIA ITU 27			1402	não	não	não	nr
COBAIA ITU 28	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com larvas F3 (GL/GN)	0/14 (0)*	1284	3 - 8	7	10	256
COBAIA ITU 29			917	3 - 11	8	não	32768
COBAIA ITU 30			771	4 - 7	6	9	256
COBAIA ITU 31	Infestadas com ninfas F3 (GC)	0/15 (0)	70	não	não	não	nr
COBAIA ITU 32			92	não	não	não	nr
COBAIA ITU 33			95	não	não	não	nr
COBAIA ITU 34	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com ninfas F3 (GL/GN)	3/36 (8,3)	99	8 - 11	-	13	128
COBAIA ITU 35			94	4 - 10	6	não	16384
COBAIA ITU 36			96	4 - 6	6	9	512
COELHO ITU 11	Infestados com adultos F3 (GC)	0/10 (0)	6	não	não	não	nr
COELHO ITU 12			5	não	não	não	nr
COELHO ITU 13			8	não	não	não	nr
COELHO ITU 14	Infestados com adultos F3 (GL/GN)	9/15 (60)	9	9 - 13	14	não	32768
COELHO ITU 15			4	8 - 14	12	não	32768
COELHO ITU 16			9	8 - 12	12	não	32768
COBAIA ITU 37	Infestada com larvas F4**	10/10 (100)	16	6 - 11	8	13	4096
COBAIA ITU 38	Infestada com larvas F4**	10/10 (100)	99	7 - 12	8	não	2048
COBAIA ITU 39	Infestada com ninfas F4***	5/5 (100)	22	7 - 12	11	não	4096

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente; ND, não determinado.

*Pool de ovos testados

**Larvas provenientes das duas únicas fêmeas com transmissão transovariana e eclosão de larvas viáveis (F740 e F 750).

***Ninfas provenientes da fêmea com transmissão transovariana F750 (cobaia ITU 38).

Tabela D. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (PIC) na primeira geração de laboratório (F₁).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA PIC 1	Infestadas com larvas F1	0/12 (0)*	952	não	-	não	nr
COBAIA PIC 2	(GC)		1156	não	-	não	nr
COBAIA PIC 3			1137	não	-	não	nr
COBAIA PIC 4‡	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/12 (0)*	970	4 - 6	5	8	ND
COBAIA PIC 5	e infestadas com larvas F1		1077	3 - 8	6	não	32768
COBAIA PIC 6	(GL)		888	5 - 8	7	não	16384
COBAIA PIC 7	Infestadas com ninfas F1	0/15 (0)	89	não	-	não	nr
COBAIA PIC 8	(GC)		81	não	-	não	nr
COBAIA PIC 9			86	não	-	não	nr
COBAIA PIC 10	Infestadas com ninfas F1	1/40 (2,5)	83	não	não	não	64
COBAIA PIC 11	(GL)		95	não	não	não	nr
COBAIA PIC 12			92	não	não	não	nr
COBAIA PIC 13	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/15 (0)	84	3 - 10	não	não	32768
COBAIA PIC 14	e infestadas com ninfas F1		93	4 - 11	7	não	16384
COBAIA PIC 15	(GN)		95	4 - 11	7	10	16384
COELHO PIC 4	Infestados com adultos F1	0/10 (0)	11	não	não	não	nr
COELHO PIC 5	(GC)		13	não	não	não	nr
COELHO PIC 6	Infestados com adultos F1	0/10 (0)	10	não	não	não	nr
COELHO PIC 7	(GL)		13	não	não	não	nr
COELHO PIC 8	Infestados com adultos F1	0/30 (0)	12	não	não	não	nr
COELHO PIC 9	(GN)		12	não	não	não	nr

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente; ND, não determinado.

*Pool de ovos testados.

‡Cobaia cujo sangue não foi colhido no dia do óbito para realização da sorologia, mas que apresentou fragmentos de fígado, baço e pulmão positivos para *Rickettsia* spp. na PCR em tempo real

Tabela E. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (PIC) na segunda geração de laboratório (F₂).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA PIC 16	Infestadas com larvas F2 (GC)	0/24 (0)*	1201	não	-	não	nr
COBAIA PIC 17			1012	não	-	não	nr
COBAIA PIC 18			1290	não	-	não	nr
COBAIA PIC 19	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com larvas F2 (GL/GN)	0/24 (0)*	1184	4 - 8	6	9	128
COBAIA PIC 20¥			976	5 - 9	7	12	ND
COBAIA PIC 21¥			1079	6 - 8	7	11	ND
COBAIA PIC 22	Infestadas com ninfas F2 (GC)	0/5 (0)	91	não	-	não	nr
COBAIA PIC 23			95	não	-	não	nr
COBAIA PIC 24			94	não	-	não	nr
COBAIA PIC 25	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com ninfas F2 (GL/GN)	3/30 (10)	96	7 - 16	8	não	32768
COBAIA PIC 26			92	4 - 10	8	11	512
COBAIA PIC 27			81	4 - 8	6	10	1024
COELHO PIC 10	Infestados com adultos F2 (GC)	0/10 (0)	10	não	não	não	nr
COELHO PIC 11#¥			0	não	não	6	ND
COELHO PIC 12			10	não	não	não	nr
COELHO PIC 13	Infestados com adultos F2 (GN/GN)	0/30 (0)	10	não	não	não	nr
COELHO PIC 14			8	não	não	não	nr
COELHO PIC 15			8	8 - 13	11	não	32768

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente; ND, não determinado.

*Pool de ovos testados.

#Coelho excluído das análises.

¥Cobaias e coelho cujos órgãos testados na PCR em tempo real para *Rickettsia* spp resultaram negativos.

Tabela F. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (PIS) na primeira geração de laboratório (F₁).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA PIS 1	Infestadas com larvas F1	0/10 (0)*	1108	não	-	não	nr
COBAIA PIS 2	(GC)		1135	não	-	não	nr
COBAIA PIS 3			1188	não	-	não	nr
COBAIA PIS 4	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/10 (0)*	1295	3 - 8	5	não	16384
COBAIA PIS 5	e infestadas com larvas F1		1095	4 - 9	6	não	32768
COBAIA PIS 6	(GL)		1176	4 - 9	6	não	32768
COBAIA PIS 7	Infestadas com ninfas F1	0/30 (0)	68	não	-	não	nr
COBAIA PIS 8	(GC)		62	não	-	não	nr
COBAIA PIS 9			74	não	-	não	nr
COBAIA PIS 10	Infestadas com ninfas F1	1/55 (1,8)	77	10 - 14	14	não	8192
COBAIA PIS 11	(GL)		73	não	não	não	512
COBAIA PIS 12			98	não	não	não	nr
COBAIA PIS 13	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/30 (0)	82	3 - 12	9	não	16384
COBAIA PIS 14	e infestadas com ninfas F1		74	3 - 11	4	não	16384
COBAIA PIS 15	(GN)		54	3 - 9	4	10	ND
COELHO PIS 2	Infestados com adultos F1	0/15 (0)	14	não	não	não	nr
COELHO PIS 3	(GC)		15	não	não	não	nr
COELHO PIS 4	Infestados com adultos F1	0/25 (0)	16	não	não	não	nr
COELHO PIS 5	(GL)		14	9 - 13	12	não	65536
COELHO PIS 6	Infestados com adultos F1	3/28 (10,7)	15	10 - 16	15	não	32768
COELHO PIS 7	(GN)		15	7 - 11	9	não	16384

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente; ND, não determinado.

*Pool de ovos testados.

Tabela G. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (PIS) na segunda geração de laboratório (F₂).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA PIS 16	Infestadas com larvas F2 (GC)	0/29 (0)*	1186	não	-	não	nr
COBAIA PIS 17			1170	não	-	não	nr
COBAIA PIS 18			1362	não	-	não	nr
COBAIA PIS 19	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com larvas F2 (GL/GN)	0/29 (0)*	1293	5 - 8	6	9	512
COBAIA PIS 20¥			1196	4 - 7	5	8	nr
COBAIA PIS 21¥			1210	4 - 7	5	8	nr
COBAIA PIS 22	Infestada com larvas F2**	1/10 (10)***	272	5 - 10	7	não	32768
COBAIA PIS 23	Infestadas com ninfas F2 (GC)	0/10 (0)	89	não	-	não	nr
COBAIA PIS 24			103	não	-	não	nr
COBAIA PIS 25			73	4 - 7	5	9	nr
COBAIA PIS 26	(GL/GN)	0/10 (0)	89	4 - 7	6	10	512
COBAIA PIS 27			50	4 - 7	6	9	1024
COBAIA PIS 28	Infestada com ninfas F2**	2/9 (22,2)	87	6 - 11	8	13	2048
COELHO PIS 8#	Infestados com adultos F2 (GC)	0/9 (0)	0	não	não	5	nr
COELHO PIS 9			9	não	-	não	nr
COELHO PIS 10			10	não	-	não	nr
COELHO PIS 11	Infestados com adultos F2 (GL/GN)	0/25 (0)	8	8 - 13	10	não	32768
COELHO PIS 12			10	não	não	não	32768
COELHO PIS 13			10	7 - 15	8	não	8192

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente; NP, dados ainda não processados.

*Pool de ovos testados.

**Larvas ou ninfas provenientes da única fêmea que fez transmissão transovariana ao final da primeira geração (F270) (cobaia PIC 22).

***Larvas testadas individualmente ao final da eclosão.

#Coelho excluído das análises.

¥Cobaia cujo resultado da sorologia foi não reagente no dia do óbito (D-8), mas que apresentaram fragmentos de fígado, baço e pulmão positivos para *Rickettsia* spp. na PCR em tempo real

Tabela H. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (PAN) na primeira geração de laboratório (F₁).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA PAN 1	Infestadas com larvas F1 (GC)	0/10 (0)*	1304	não	-	não	nr
COBAIA PAN 2			934	não	-	não	nr
COBAIA PAN 3			1422	não	-	não	nr
COBAIA PAN 4	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com larvas F1 (GL)	0/10 (0)*	900	4 - 8	6	10	ND
COBAIA PAN 5			1116	4 - 7	5	9	ND
COBAIA PAN 6			1459	4 - 8	6	9	ND
COBAIA PAN 7	Infestadas com ninfas F1 (GC)	0/10 (0)	62	não	-	não	nr
COBAIA PAN 8			75	não	-	não	nr
COBAIA PAN 9			70	não	-	não	nr
COBAIA PAN 10	Infestadas com ninfas F1 (GL)	1/80 (1,25%)	71	não	não	não	nr
COBAIA PAN 11			69	não	não	não	nr
COBAIA PAN 12			64	não	não	não	nr
COBAIA PAN 13¥	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com ninfas F1 (GN)	0/10 (0)	40	3 - 6	5	8	ND
COBAIA PAN 14¥			62	3 - 7	-	9	ND
COBAIA PAN 15¥			69	3 - 6	-	8	ND
COELHO PAN 2	Infestados com adultos F1 (GC)	0/10 (0)	11	não	não	não	nr
COELHO PAN 3			9	não	não	não	nr
COELHO PAN 4	Infestados com adultos F1 (GL)	0/20 (0)	20	não	não	não	nr
COELHO PAN 5			17	não	não	não	nr
COELHO PAN 6	Infestados com adultos F1 (GN)	0/15 (0)	8	não	não	não	nr
COELHO PAN 7			7	não	não	não	nr

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente; ND, não determinado.

*Pool de ovos testados.

¥Cobaías que não tiveram sangue colhido no dia do óbito para realização da sorologia, mas que apresentou fragmentos de fígado, baço e pulmão positivos para *Rickettsia* spp. na PCR em tempo real

Tabela I. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (PAN) na segunda geração de laboratório (F₂).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA PAN 16	Infestadas com larvas F2 (GC)	0/20 (0)*	899	não	-	não	nr
COBAIA PAN 17			902	não	-	não	nr
COBAIA PAN 18			872	não	-	não	nr
COBAIA PAN 19	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com larvas F2 (GL/GN)	0/20 (0)*	901	4 - 11	7	não	65536
COBAIA PAN 20			1030	4 - 8	7	9	512
COBAIA PAN 21			1711	4 - 11	7	não	32768
COBAIA PAN 22	Infestadas com ninfas F2 (GC)	0/10 (0)	81	não	-	não	nr
COBAIA PAN 23			91	não	-	não	nr
COBAIA PAN 24			88	não	-	não	nr
COBAIA PAN 25	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com ninfas F2 (GL/GN)	0/15 (0)	69	3 - 13	4	não	32768
COBAIA PAN 26			99	3 - 7	4	8	256
COBAIA PAN 27			77	3 - 8	4	9	512
COELHO PAN 8	Infestados com adultos F2 (GC)	0/10 (0)	6	não	não	não	nr
COELHO PAN 9			10	não	não	não	nr
COELHO PAN 10			9	não	não	não	nr
COELHO PAN 11	Infestados com adultos F2 (GL/GN)	3/15 (20)	6	10 - 15	14	não	32768
COELHO PAN 12			6	7 - 12	12	não	32768
COELHO PAN 13			8	7 - 12	não	não	131072

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente.

*Pool de ovos testados.

Tabela J. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (GSV) na primeira geração de laboratório (F₁).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA GSV 1	Infestadas com larvas F1 (GC)	0/20 (0)*	1824	não	-	não	nr
COBAIA GSV 2			1756	não	-	não	nr
COBAIA GSV 3			2025	não	-	não	nr
COBAIA GSV 4	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com larvas F1 (GL)	0/20 (0)*	1403	4 - 6	6	8	ND
COBAIA GSV 5			2118	4 - 8	5	10	ND
COBAIA GSV 6			1786	3 - 6	5	9	ND
COBAIA GSV 7	Infestadas com ninfas F1 (GC)	0/28 (0)	72	não	-	não	nr
COBAIA GSV 8			59	não	-	não	nr
COBAIA GSV 9			52	não	-	não	nr
COBAIA GSV 10	Infestadas com ninfas F1 (GL)	0/48 (0)	99	8 - 12	9	não	4096
COBAIA GSV 11			97	não	-	não	nr
COBAIA GSV 12			82	não	-	não	nr
COBAIA GSV 13	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com ninfas F1 (GN)	0/28 (0)	78	4 - 7	5	10	256
COBAIA GSV 14			77	4 - 7	6	10	512
COBAIA GSV 15			67	4 - 6	6	8	128
COELHO GSV 2	Infestados com adultos F1 (GC)	0/15 (0)	14	não	não	não	nr
COELHO GSV 3			15	não	não	não	nr
COELHO GSV 4	Infestadas com adultos F1 (GL)	0/16 (0)	14	não	não	não	nr
COELHO GSV 5			14	9 - 13	12	não	8192
COELHO GSV 6	Infestados com adultos F1 (GN)	4/22 (18,2)	15	não	não	não	nr
COELHO GSV 7			14	6 - 12	não	não	16384

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente; ND, não determinado.

*Pool de ovos testados.

Tabela K. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (GSV) na segunda geração de laboratório (F₂).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA GSV 16	Infestadas com larvas F2 (GC)	0/29 (0)*	880	não	-	não	nr
COBAIA GSV 17			995	não	-	não	nr
COBAIA GSV 18			1094	não	-	não	nr
COBAIA GSV 19	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com larvas F2 (GL/GN)	0/29 (0)*	1018	3 - 6	6	10	512
COBAIA GSV 20			753	4 - 9	8	11	16384
COBAIA GSV 21			822	4 - 6	6	8	256
COBAIA GSV 22	Infestadas com ninfas F2 (GC)	0/10 (0)	53	não	-	não	nr
COBAIA GSV 23			97	não	-	não	nr
COBAIA GSV 24			66	não	-	não	nr
COBAIA GSV 25	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i> e infestadas com ninfas F2 (GL/GN)	5/31 (16,1)	94	3 - 6	4	8	256
COBAIA GSV 26			54	3 - 6	4	8	nr
COBAIA GSV 27			77	4 - 7	6	10	512
COELHO GSV 8	Infestados com adultos F2 (GC)	0/10 (0)	6	não	não	não	nr
COELHO GSV 9			9	não	não	não	nr
COELHO GSV 10			10	não	não	não	nr
COELHO GSV 11	Infestados com adultos F2 (GL/GN)	7/30 (23,3)	11	não	não	não	nr
COELHO GSV 12			10	6 - 9	11	não	16384
COELHO GSV 13			11	6 - 10	11	13	32768
COBAIA GSV 28	Infestada com larvas F3**	9/10 (90)	520	6 - 10	8	não	16834
COBAIA GSV 29	Infestada com larvas F3**	9/10 (90)	75	7 - 12	8	não	4096
COBAIA GSV 30	Infestada com larvas F3**	3/10 (30)	2	não	não	não	8192

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente.

*Pool de ovos testados.

**Larvas provenientes de fêmeas com transmissão transovariana ao final da segunda geração (F448, F451, 453, respectivamente para cobaias GSV 28, 29 e 30).

Tabela L. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (PAMP) na primeira geração de laboratório (F₁).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA PAMP 1	Infestadas com larvas F1	0/19 (0)*	1310	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 2	(GC)		1102	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 3			1148	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 4	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/19 (0)*	1096	4 - 7	5	9	nr
COBAIA PAMP 5	e infestadas com larvas F1		1175	4 - 7	5	9	256
COBAIA PAMP 6	(GL)		1245	3 - 8	4	10	512
COBAIA PAMP 7	Infestadas com ninfas F1	0/10 (0)	99	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 8	(GC)		72	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 9			71	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 10	Infestadas com ninfas F1	3/36 (8,3)	97	7 - 11	9	14	16384
COBAIA PAMP 11	(GL)		94	5 - 13	7	não	65536
COBAIA PAMP 12			92	7 - 16	7	não	32768
COBAIA PAMP 13	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/10 (0)	98	4 - 7	-	9	512
COBAIA PAMP 14	e infestadas com ninfas F1		99	4 - 7	-	8	256
COBAIA PAMP 15	(GN)		83	3 - 8	-	9	512
COELHO PAMP 2	Infestados com adultos F1	0/10 (0)	9	não	não	não	nr
COELHO PAMP 3	(GC)		9	não	não	não	nr
COELHO PAMP 4	Infestados com adultos F1	7/15 (46,7)	10	não	não	não	nr
COELHO PAMP 5	(GL)		12	8 - 12	11	não	65536
COELHO PAMP 6	Infestados com adultos F1	10/15 (66,7)	10	10 - 14	não	não	131072
COELHO PAMP7	(GN)		10	não	não	não	nr

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente.

*Pool de ovos testados

Tabela M. Infestações experimentais com *Amblyomma sculptum* (PAMP) na segunda geração de laboratório (F₂).

Hospedeiro	Condição (grupo experimental)	Carrapatos PCR +/- carrapatos testados (%)	Número de carrapatos ingurgitados	Período de febre (DAI)	Reação escrotal (DAI)	Morte (DAI)	Título sorológico
COBAIA PAMP 16	Infestadas com larvas F2	0/18 (0)*	748	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 17	(GC)		805	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 18			433	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 19#	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/18 (0)*	119	não	não	6	nr
COBAIA PAMP 20	e infestadas com larvas F2		577	4 - 11	6	não	32768
COBAIA PAMP 21	(GL/GN)		682	4 - 11	6	não	65536
COBAIA PAMP 22	Infestada com larvas F2**	10/10 (100)	551	6 - 12	6	não	65536
COBAIA PAMP 23	Infestada com larvas F2**	6/10 (60)	264	5 - 11	6	não	8192
COBAIA PAMP 24	Infestadas com ninfas F2	0/5(0)	26	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 25	(GC)		49	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 26			70	não	-	não	nr
COBAIA PAMP 27	Inoculadas com <i>R. rickettsii</i>	0/5(0)	64	4 - 8	6	9	nr
COBAIA PAMP 28	e infestadas com ninfas F2		63	5 - 9	6	11	1024
COBAIA PAMP 29	(GL/GN)		41	4 - 13	6	não	65536
COELHO PAMP 8	Infestado com adultos F2 (GC)	0/10 (0)	NP	NP	NP	NP	NP
COELHO PAMP 9	Infestado com adultos F2 (GL/GN)	5/15 (33,3)	NP	NP	NP	NP	NP

DAI, dias decorridos após infestação; nr, não reagente.

*Pool de ovos testados.

** Larvas provenientes de fêmeas com transmissão transovariana ao final da primeira geração (F122 e F137 respectivamente para cobaias PAMP 22 e 23).

#Cobaia excluída das análises.

APÊNDICE B

Tabelas de N - S com os parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas e massas de ovos de *A. sculptum* de diferentes populações (ITU, PIC, PIS, PAN, GSV e PAMP)

Tabela N. Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (ITU) e suas massas de ovos nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos ou negativos na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC).

Parâmetros avaliados	GL		GN		GL/GN		GC
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	-
Nº de fêmeas que ingurgitaram	16	6	11	10	20	2	33
% Fêmeas infectadas*	72,7 (16/22) a	-	52,4 (11/21) b	-	90,9 (20/22) a	-	0 (0/33)
% Fêmeas com TO (FTO)*	12,5 (2/16) a	-	27,3 (3/11) a	-	20 (4/20) a	-	0 (0/33)
% Fêmeas com ovos férteis*	80 (12/15) a	66,7 (4/6) a	60 (6/10) a	90 (9/10) a	70 (14/20) a	50 (1/2) a	78,1 (25/32) a
Período de alimentação (dias)§	12,4 ± 2,56 (9 - 19)	12,8 ± 3,87 (9 - 19)	11,4 ± 1,21 (9 - 13)	11,8 ± 1,03 (10 - 13)	12 ± 2,5 (10 - 17)	13,5 ± 2,12 (12 - 15)	10,5 ± 1,68 (8 - 16)
Peso da fêmea ingurgitada (mg)§	316,2 ± 100,5 (154,3 - 501,9)	406,5 ± 192,7 (165,5 - 649,4)	378,4 ± 154,4 (142,5 - 592)	508,0 ± 90,74 (405,9 - 654,7)	363,2 ± 97,21 (173,7 - 553,9)	460,5 ± 98,5 (390,8 - 530,1)	422,7 ± 112,1 (241,8 - 672,8)
Período pré-postura (dias)§	7,9 ± 1,36 (5 - 10)	7,5 ± 2,35 (4 - 10)	9 ± 4,57 (5 - 20)	8,5 ± 4,64 (5 - 21)	6,75 ± 1,16 (6 - 11)	5,5 ± 0,71 (5 - 6)	7,06 ± 1,05 (5 - 9)
Peso da massa de ovos (mg)§	106,6 ± 65,55 (20,4 - 231,5)	125,7 ± 96,07 (29,1 - 232,4)	114,0 ± 73,21 (0,7 - 200,1)	170,9 ± 79,68 (0,9 - 278,5)	164,0 ± 69,92 (12,3 - 283)	183,3 ± 72,2 (132,2 - 234,3)	194,3 ± 82,95 (16,4 - 347,7)
IECO (%)§	31,4 ± 12,93 (7,28 - 47,53)	27,4 ± 12,51 (14,2 - 45,14)	29,2 ± 17,27 (0,178 - 60,18)	34,3 ± 14,29 (0,18 - 49,49)	43,3 ± 12,75 (7,08 - 55,59)	39,0 ± 7,33 (33,83 - 44,2)	44,2 ± 12,27 (5,67 - 56,48)
Período de incubação dos ovos (dias)§	36,8 ± 2,34 (33 - 42)	36,8 ± 1,71 (35 - 39)	36,8 ± 1,47 (35 - 39)	35,6 ± 1,42 (33 - 38)	35,9 ± 1,59 (33 - 39)	38,5 ± 4,95 (35 - 42)	35,1 ± 1,22 (33 - 38)
Taxa de eclosão (%)§	16,4 ± 21,69 (0 - 60)	69,2 ± 34,12 (0 - 90)	23,5 ± 30,56 (0 - 80)	85,0 ± 9,43 (60 - 90)	23,1 ± 30,85 (0 - 95)	45,0 ± 63,65 (0 - 90)	83,0 ± 14,91 (40 - 99,99)

Nº, número; GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; GC, grupo controle (sem exposição à infecção); pos, positivo; neg, negativo; TO, transmissão transovariana; FTO, frequência de transmissão transovariana; IECO, índice de eficiência da conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos.

*Valores analisados por Qui Quadrado e apresentados como porcentagem. Letras diferentes dentro do parâmetro avaliado diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

§Valores analisados pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn e apresentados como média ± desvio padrão (variação entre parênteses).

Tabela O. Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (PIC) e suas massas de ovos nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos ou negativos na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC).

Parâmetros avaliados	GL		GN		GL/GN		GC
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	-
Nº de fêmeas que ingurgitaram	-	23	-	24	2	24	48
% Fêmeas infectadas	0 (0/23) a	-	0 (0/24) a	-	7,7 (2/26) a	-	0 (0/48)
% Fêmeas com TO (FTO)	0	-	0	-	0 (0/2)	-	0 (0/48)
% Fêmeas com ovos férteis*	-	86,4 (19/22) a	-	95,8 (23/24) a	50 (1/2) a	83,3 (20 /24) a	95,8 (46/48) a
Período de alimentação (dias)§	-	8,5 ± 1,08	-	9,4 ± 1,53	11 ± 2,83	9,4 ± 1,4	9,2 ± 1,48
	-	(7 - 10)	-	(7 - 12)	(9 - 13)	(8 - 13)	(7 - 13)
Peso da fêmea ingurgitada (mg)§	-	778,4 ± 207,7	-	896,8 ± 161,3	512,6 ± 1,77	672,0 ± 303,9	819,5 ± 273,7
	-	(334,6 - 1243,0)	-	(517,6 - 1135,0)	(511,3 - 513,8)	(99,8 - 1507,0)	(133,9 - 1237,0)
Período pré-postura (dias)§	-	6,9 ± 1,07 (5 - 10)	-	6,8 ± 1,31 (4 - 10)	6,5 ± 2,12 (5 - 8)	6,5 ± 1,47 (5 - 12)	5,8 ± 1,11 (3 - 8)
Peso da massa de ovos (mg)§	-	392,5 ± 140,7	-	423,2 ± 118,6	192,0 ± 17,9	302,3 ± 173,3	423,2 ± 181,9
	-	(36,0 - 704,1)	-	(141,0 - 596,3)	(179,3 - 204,6)	(66,4 - 793,5)	(71,6 - 689,7)
IECO (%)§	-	47,6 ± 10,32	-	47,0 ± 9,2	37,4 ± 3,36	41,0 ± 9,81	47,6 ± 11,17
	-	(9,27 - 57,57)	-	(13,4 - 55,2)	(35,07 - 39,82)	(12,68 - 56,15)	(17,6 - 63,84)
Período de incubação	-	34,7 ± 1,06	-	34,7 ± 1,42	34,5 ± 0,70	35,6 ± 1,05	35,4 ± 1,46
dos ovos (dias)§	-	(33 - 37)	-	(33 - 38)	(34 - 35)	(34 - 37)	(32 - 39)
Taxa de eclosão (%)§	-	52,1 ± 35,78	-	66,3 ± 25,33	65,0 ± 21,21	63,1 ± 33,7	78,6 ± 27,67
	-	(0 - 99,99)	-	(0 - 99,99)	(50 - 80)	(0 - 95)	(0 - 99,99)

Nº, número; GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; GC, grupo controle (sem exposição à infecção); pos, positivo; neg, negativo; TO, transmissão transovariana; FTO, frequência de transmissão transovariana; IECO, índice de eficiência da conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos, NP, dados não processados.

*Valores analisados por Qui Quadrado e apresentados como porcentagem. Letras diferentes dentro do parâmetro avaliado diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

§Valores analisados pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn e apresentados como média ± desvio padrão (variação entre parênteses).

Tabela P. Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (PIS) e suas massas de ovos nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN), positivos ou negativos na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC).

Parâmetros avaliados	GL		GN		GL/GN		GC
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	-
N ^o de fêmeas que ingurgitaram	11	19	15	15	19	9	48
% Fêmeas infectadas*	36,7 (11/30) a	-	50,0 (15/30) ab	-	67,9 (19/28) b	-	0 (0/48)
% Fêmeas com TO (FTO)*	18,2 (2/11) a	-	6,7 (1/15) a	-	15,8 (3/19) a	-	0 (0/48)
% Fêmeas com ovos férteis*	63,6 (7/11) a	89,5 (17/19) ab	92,9 (13/14) ab	86,7 (13/15) ab	94,4 (17/18) ab	100 (9/9) ab	95,6 (43/45) b
Período de alimentação (dias)§	10,7 ± 1,90 (8 - 14)	10,2 ± 1,67 (8 - 14)	8,9 ± 1,40 (7 - 12)	9,5 ± 1,50 (7 - 12)	8,5 ± 0,51 (8 - 9)	8,4 ± 0,88 (7 - 10)	8,8 ± 1,21 (7 - 13)
Peso da fêmea ingurgitada (mg)§	660,7 ± 363,8 (110,9 - 1269,0)	558,8 ± 284,6 (208,1 - 1002,0)	834,8 ± 124,2 (657,5 - 1009,0)	881,9 ± 193,5 (354,5 - 1156,0)	811,0 ± 237,5 (320,6 - 1254,0)	709,4 ± 161,8 (451,0 - 1031,0)	826,0 ± 182,2 (242,0 - 1113,0)
Período pré-postura (dias)§	6,4 ± 1,74 (3 - 10)	6,4 ± 1,34 (3 - 9)	6,7 ± 1,06 (4 - 8)	6,0 ± 1,73 (4 - 11)	6,5 ± 0,79 (5 - 8)	6,2 ± 0,83 (5 - 8)	6,7 ± 1,68 (5 - 15)
Peso da massa de ovos (mg)§	259,0 ± 202,3 (15,9 - 677,7)	259,7 ± 162,3 (81,3 - 583,1)	416,1 ± 124,0c (109,5 - 569,0)	426,8 ± 124,9 (111,7 - 617,7)	417,0 ± 154,2 (76,8 - 631,0)	362,9 ± 124,3 (189,1 - 590,9)	443,6 ± 127,2 (2,2 - 639,9)
IECO (%)§	35,4 ± 15,49 (12,67 - 53,4)	46,6 ± 14,03 (11,56 - 62,74)	48,4 ± 11,45 (16,34 - 59,71)	48,5 ± 6,47 (31,51 - 55,49)	51,5 ± 13,48 (23,69 - 74,68)	50,8 ± 10,72 (27,72 - 61,16)	52,5 ± 9,84 (0,33 - 63,92)
Período de incubação dos ovos (dias)§	39,5 ± 2,29 (36 - 45)	40,1 ± 1,69 (36 - 43)	40,2 ± 1,18 (39 - 43)	40,2 ± 1,52 (37 - 42)	38,6 ± 1,58 (35 - 42)	38,3 ± 1,32 (36 - 40)	39,4 ± 1,82 (36 - 45)
Taxa de eclosão (%)§	22,7 ± 26,1 (0 - 70)	60,0 ± 38,57 (0 - 99,99)	57,7 ± 39,67b (0 - 98)	58,2 ± 40,89 (0 - 99,99)	69,4 ± 28,33 (0 - 95)	78,9 ± 10,54 (60 - 90)	73,6 ± 31,06 (0 - 99,99)

N., número; GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; GC, grupo controle (sem exposição à infecção); pos, positivo; neg, negativo; TO, transmissão transovariana; FTO, frequência de transmissão transovariana; IECO, índice de eficiência da conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos.

*Valores analisados por Qui Quadrado e apresentados como porcentagem. Letras diferentes dentro do parâmetro avaliado diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

§Valores analisados pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn e apresentados como média ± desvio padrão (variação entre parênteses).

Tabela Q. Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (PAN) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos ou negativos na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC).

Parâmetros avaliados	GL		GN		GL/GN		GC
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	-
Nº de fêmeas que ingurgitaram	-	37	-	15	8	12	45
% Fêmeas infectadas*	0 (0/37) a	-	0 (0/15) a	-	40 (8/20) b	-	0 (0/45)
% Fêmeas com TO (FTO)*	0	-	0	-	12,5 (1/8)	-	0 (0/45)
% Fêmeas com ovos férteis*	-	97,3 (36/37) a	-	80 (12/15) ab	66,7 (4/6) b	83,3 (10/12) ab	95,5 (42/44) ab
Período de alimentação (dias)§	-	11,1 ± 2,13	-	12,5 ± 3,44	10,5 ± 2,33	12,3 ± 2,34	11,1 ± 1,82
	-	(8 - 18)	-	(8 - 21)	(9 - 16)	(10 - 17)	(8 - 15)
Peso da fêmea ingurgitada (mg)§	-	648,2 ± 171	-	519,8 ± 197,4	648,9 ± 298,6	717,1 ± 254,0	610,6 ± 182,3
	-	(377,3 - 986,6)	-	(203,3 - 820,4)	(340,3 - 1201,0)	(137,6 - 1130,0)	(176,2 - 953,2)
Período pré-postura (dias)§	-	6,6 ± 1,13 (5 - 10)	-	6,0 ± 1,19 (4 - 8)	6,7 ± 0,75 (6 - 8)	6,8 ± 0,57 (6 - 8)	6,7 ± 1,03 (4 - 9)
Peso da massa de ovos (mg)§	-	344,0 ± 130,5	-	245,8 ± 137,1	304,2 ± 155	250,1 ± 154	295,2 ± 126,6
	-	(94,1 - 605,6)	-	(47,4 - 465,5)	(110,6 - 549,5)	(41,3 - 562)	(47,9 - 578,4)
IECO (%)§	-	51,5 ± 9,99	-	44,37 ± 13,09	42,4 ± 5,64	42,1 ± 7,84	46,4 ± 10,43
	-	(20,55 - 66,05)	-	(16,78 - 59,15)	(32,5 - 48,69)	(30,01 - 52,49)	(22,61 - 60,68)
Período de incubação	-	38 ± 1,48	-	38,3 ± 1,44	38,6 ± 1,13	38,3 ± 0,98	37,9 ± 1,47
dos ovos (dias)§	-	(36 - 41)	-	(36 - 41)	(37 - 40)	(37 - 40)	(35 - 41)
Taxa de eclosão (%)§	-	73,2 ± 27,59	-	57 ± 36,73	7,5 ± 14,79	42,9 ± 32,49	65,05 ± 31,69
	-	(0 - 99,99)	-	(0 - 99,99)	(0 - 40)	(0 - 90)	(0 - 99,99)

Nº, número; GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; GC, grupo controle (sem exposição à infecção); pos, positivo; neg, negativo; TO, transmissão transovariana; FTO, frequência de transmissão transovariana; IECO, índice de eficiência da conversão do peso da fêmea ingurgitada em ovos.

*Valores analisados por Qui Quadrado e apresentados como porcentagem. Letras diferentes dentro do parâmetro avaliado diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

§Valores analisados pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn e apresentados como média ± desvio padrão (variação entre parênteses).

Tabela R. Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (GSV) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos ou negativos na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC).

Parâmetros avaliados	GL		GN		GL/GN		GC
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	-
N ^o de fêmeas que ingurgitaram	5	23	6	23	11	21	54
% Fêmeas infectadas*	17,9 (5/28) a	-	20,7 (6/29) a	-	34,4 (11/32) a	-	0 (0/54)
% Fêmeas com TO (FTO)*	0 (0/5) a	-	16,7 (1/6) a	-	27,3 (3/11) a	-	0 (0/54)
% Fêmeas com ovos férteis*	100 (5/5) a	95,7 (22/23) a	83,3 (5/6) a	95,7 (22/23) a	100 (11/11) a	100 (21/21) a	98,1 (53/54) a
Período de alimentação (dias)§	11,8 ± 2,16 (9 - 14)	10,2 ± 1,65 (7 - 14)	8,5 ± 0,83 (8 - 10)	9,2 ± 1,37 (8 - 13)	11,6 ± 2,97 (8 - 16)	9,9 ± 1,49 (8 - 14)	9,8 ± 1,49 (8 - 14)
Peso da fêmea ingurgitada (mg)§	896,4 ± 95,27 (792,6 - 994,8)	852,6 ± 155,7 (426,6 - 1140,0)	883,6 ± 135,0 (648,5 - 998,2)	781,1 ± 183,8 (534,3 - 1271,0)	675,5 ± 268,8 (397,1 - 1352,0)	698,0 ± 238,6 (182,8 - 1223,0)	718,5 ± 219,4 (156,9 - 1201,0)
Período pré-postura (dias)§	6,0 ± 1,87 (3 - 8)	6,7 ± 1,01 (4 - 8)	7,0 ± 0,63 (6 - 8)	6,3 ± 1,05 (4 - 8)	5,6 ± 1,91 (3 - 10)	6,2 ± 1,16 (3 - 8)	6,7 ± 1,17 (3 - 10)
Peso da massa de ovos (mg)§	491,9 ± 64,76 (426,1 - 586,8)	441,6 ± 103,6 (195,8 - 597,5)	500,9 ± 93,12 (343,1 - 601,3)	415,7 ± 109,6 (250,1 - 642,9)	313,0 ± 204,4 (2,4 - 746,4)	336,4 ± 166,5 (0,7 - 671,5)	365,7 ± 160,4 (31,5 - 693,1)
IECO (%)§	55,0 ± 6,04 (45,8 - 61,58)	51,9 ± 8,78 (29,78 - 61,7)	56,5 ± 3,58 (52,67 - 60,86)	52,16 ± 6,87 (41,42 - 64,86)	44,8 ± 18,23 (0,37 - 60,78)	46,4 ± 15,38 (0,12 - 64,11)	49,7 ± 12,91 (5,28 - 63,62)
Período de incubação dos ovos (dias)§	37,6 ± 1,51 (36 - 40)	37,6 ± 1,77 (34 - 41)	38,2 ± 1,32 (36 - 40)	36,9 ± 1,73 (34 - 41)	38,6 ± 1,29 (36 - 40)	38,3 ± 0,91 (37 - 40)	37,7 ± 1,54 (33 - 41)
Taxa de eclosão (%)§	93,6 ± 6,10 (85 - 99,99)	88,3 ± 21,36 (0 - 99,99)	52,6 ± 43,44 (0 - 95)	67,0 ± 29,63 (0 - 98)	62,8 ± 39,44 (0,1 - 99,99)	87,4 ± 20,90 (10 - 99,99)	64,3 ± 42,9 (0 - 99,99)

N^o, número; GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; GC, grupo controle (sem exposição à infecção); pos, positivo; neg, negativo; TO, transmissão transovariana; FTO, frequência de transmissão transovariana; IECO, índice de eficiência da conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos, NP, dados não processados.

*Valores analisados por Qui Quadrado e apresentados como porcentagem. Letras diferentes dentro do parâmetro avaliado diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

§Valores analisados pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn e apresentados como média ± desvio padrão (variação entre parênteses).

Tabela S. Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas ingurgitadas de *A. sculptum* (PAMP) nos diferentes grupos experimentais de exposição a *R. rickettsii* (GL, GN, GL/GN), positivos ou negativos na PCR em tempo real e no grupo sem exposição à infecção (GC).

Parâmetros avaliados	GL		GN		GL/GN		GC**
	pos	neg	pos	neg	pos	neg	-
N ^o de fêmeas que ingurgitaram	7	15	6	14	NP	NP	18
% Fêmeas infectadas*	31,8 (7/22) a	-	30 (6/20) a	-	NP	NP	0 (0/18)
% Fêmeas com TO (FTO)*	14,3 (1/7) a	-	16,7 (1/6) a	-	NP	NP	0 (0/18)
% Fêmeas com ovos férteis*	85,7 (6/7) a	100 (15/15) a	100 (6/6) a	85,7 (12/14) a	NP	NP	88,9 (16/18) a
Período de alimentação (dias)§	12,1 ± 2,91 (9 - 17)	10,7 ± 2,09 (9 - 16)	8,7 ± 1,21 (7 - 10)	8,4 ± 1,21 (7 - 11)	NP	NP	9,8 ± 1,24 (8 - 13)
Peso da fêmea ingurgitada (mg)§	472,4 ± 190,6 (198,5 - 758,2)	518,7 ± 186,7 (134,5 - 824,9)	578,6 ± 173,8 (436,6 - 880,7)	699,0 ± 153,4 (315,5 - 937,3)	NP	NP	613,2 ± 215,7 (221,0 - 1012,0)
Período pré-postura (dias)§	7,9 ± 1,34 (5 - 9)	7,2 ± 1,37 (5 - 10)	6,3 ± 0,51 (6 - 7)	8,1 ± 2,75 (6 - 16)	NP	NP	7,8 ± 1,95 (6 - 14)
Peso da massa de ovos (mg)§	161,5 ± 151,9 (18,0 - 433,6)	295,6 ± 113,3 (42,3 - 497,5)	279,2 ± 147,9 (134,9 - 508,5)	321,2 ± 139,3 (89,7 - 564,9)	NP	NP	276,6 ± 126,2 (42,5 - 583,4)
IECO (%)§	32,2 ± 23,21 (5,71 - 57,19)	56,55 ± 11,64 (31,45 - 69,32)	46,39 ± 13,2 (26,71 - 59,33)	45,7 ± 14,7 (10,78 - 60,27)	NP	NP	44,31 ± 12,29 (19,23 - 58,46)
Período de incubação dos ovos (dias)§	38,3 ± 1,03 (37 - 40)	38,2 ± 0,94 (37 - 40)	38,5 ± 1,04 (37 - 40)	38,4 ± 0,90 (34 - 40)	NP	NP	38,2 ± 1,02 (37 - 40)
Taxa de eclosão (%)§	75,7 ± 38,23 (0 - 99,99)	72,4 ± 35,94 (1 - 99,99)	55,0 ± 27,39 (20 - 80)	69,9 ± 40,33 (0 - 99,99)	NP	NP	79,4 ± 37,39 (0 - 99,99)

N^o, número; GL, grupo infectado como larva; GN, grupo infectado como ninfa; GL/GN, grupo infectado como larva e reexposto à infecção como ninfa; GC, grupo controle (sem exposição à infecção); pos, positivo; neg, negativo; TO, transmissão transovariana; FTO, frequência de transmissão transovariana; IECO, índice de eficiência da conversão do peso da fêmea ingurgitada em massa de ovos, NP, dados não processados.

*Valores analisados por Qui Quadrado e apresentados como porcentagem. Letras diferentes dentro do parâmetro avaliado diferem estatisticamente ($p < 0,05$).

§Valores analisados pelos testes de Kruskal Wallis e Dunn e apresentados como média ± desvio padrão (variação entre parênteses).

**Resultados parciais.