

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**VETERINÁRIAS**

**TESE**

**Estudos biológicos de *Rhipicephalus sanguineus* e  
interação *Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* e cães  
em condições laboratoriais**

**Eliane Mattos Piranda**

**2008**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**ESTUDOS BIOLÓGICOS DE *Rhipicephalus sanguineus* E INTERAÇÃO  
*Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* E CÃES EM CONDIÇÕES  
LABORATORIAIS**

**ELIANE MATTOS PIRANDA**

*Sob a Orientação do Professor*  
**João Luiz Horacio Faccini**

*e Co-orientação do Professor*  
**Marcelo Bahia Labruna**

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2008

636.208969

62

P667e

T

Piranda, Eliane Mattos, 1977-  
Estudos biológicos de  
Rhipicephalus sanguineus e  
interação Rickettsia rickettsii, R.  
sanguineus e cães em condições  
laboratoriais/ Eliane Mattos  
Piranda. - 2008.

74f. : il.

Orientador: João Luiz Horacio  
Faccini

Tese (doutorado) - Universidade  
Federal Rural do Rio de Janeiro,  
Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 45-54.

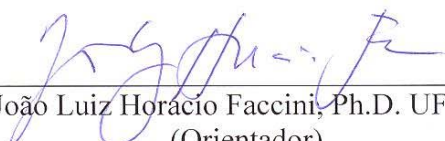
1. Cão - Parasito - Teses. 2.  
Rhipicephalus sanguineus - Biologia  
- Teses. 3. Rickettsia - Biologia -  
Teses. 4. Febre das Montanhas  
Rochosas - Teses. I. Faccini, João  
Luiz Horacio, 1947- . II.  
Universidade Federal Rural do Rio  
de Janeiro. Instituto de  
Veterinária. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE VETERINÁRIA  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

ELIANE MATTOS PIRANDA


Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Veterinária.

TESE APROVADA EM 29/02/2008.



---

João Luiz Horácio Faccini, Ph.D. UFRRJ  
(Orientador)



---

Marcelo Bahia Labruna, Ph.D. USP



---

Matias Pablo Juan Szabó, Dr. UFU



---

Carlos Luiz Massard, Ph.D. UFRRJ



---

Richard de Campos Pacheco, Dr. USP

*Ao meu amor, Paulo Henrique Duarte Caçado,  
pelo companheirismo e alegria de todos os dias e  
sempre!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus que me dá força nos momentos de dificuldades, me guiando para seguir adiante. Agradeço também pela saúde e por todas as alegrias.

Ao meu querido Paulo Cançado, sempre do meu lado com seu amor... Sempre juntos, apesar de alguns momentos distantes.

Ao professor João Luiz Horacio Faccini, mais do que meu orientador, agradeço pela confiança e incontáveis ensinamentos profissionais e da vida.

Ao professor Marcelo Bahia Labruna por ter me recebido em seu laboratório e acreditado que daria certo. Obrigada por tudo que aprendi e pela paciência.

Agradeço a minha mãe, meu irmão e minha cunhada por me apoiarem e entenderem a minha ausência. E ao meu pai (*in memoriam*) agradeço toda educação e princípios que sempre busco seguir.

A professora Kátia Maria Famadas pela amizade e apoio.

Aos professores Carlos Wilson Gomes Lopes e Maria Julia Salim Pereira (coordenadora do CPGCV-IV/UFRRJ), responsáveis por muitas lições durante estes anos.

Aos professores Carlos Luiz Massard e Gonzalo Efrain Moya pelos momentos inesquecíveis neste departamento.

A todos os professores do CPGCV por contribuírem na minha formação profissional.

Aos queridos amigos Fabiano Pimentel, Flávia Lucindo, Vanessa Raia, Raquel Lisboa, Luiz Eduardo Tavares e Adriana da Rocha Paula pessoas muito especiais.

A Luciana Freitas, Carla Uzedo e Tatiane Kawamura companheiras do Laboratório de Ixodologia. Também a todos os colegas e amigos do CPGCV pelo convívio nos momentos alegres e, às vezes, conturbados.

Aos funcionários da UFRRJ, em especial, Leonardo Teixeira (Secretaria do DPA/UFRRJ), Gilmar Sarmiento e Mauro Nunes “Zeca” (Estação P.P.W.O. Neitz, DPA/UFRRJ), Pedro Timotio e professora Maria Paz Crespi (setor de Cunicultura, IZ/UFRRJ) por todos os auxílios prestados.

A Adriano Pinter, Richard Pacheco, Tais Saito, Alexandre Ataliba, Mauricio Horta, Iara Silveira, Maria Ogrzewalska, Ricardo Cabrera, Silvio Chagas, Simone Rosa, Alessandra Ragozo, pessoas que muito me ajudaram a trabalhar e a viver em São Paulo. Assim como a toda equipe do VPS/FMVZ/USP, em especial aos professores Solange Gennari e Leonardo Richtzenhain e a doutora Hilda Pena.

A CAPES, CNPq e FAPESP pelo suporte financeiro.

Aos animais minha eterna gratidão.

## **BIOGRAFIA**

Eliane Mattos Piranda, filha de Carlos Alberto Piranda e Isauete Mattos Piranda, nasceu na cidade do Rio de Janeiro/RJ em 25 de Novembro de 1977.

Cursou o ensino fundamental e o ensino médio no Colégio Pedro II – unidade Humaitá/RJ, concluindo-os em 1992 e 1995, respectivamente.

Ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em agosto de 1997, graduando-se em outubro de 2002.

Foi estagiária do Laboratório de Insetos de Interesse Médico-veterinário no período de maio de 2000 a fevereiro de 2001, sendo bolsista de Iniciação Científica Projeto Integrado CNPq sob orientação da Professora Eliane M. V. Milward de Azevedo.

No período de agosto de 2001 a agosto de 2002, foi bolsista de Iniciação Científica (PIBIC) do CNPq sob orientação do Professor João Luiz Horacio Faccini no Laboratório de Ixodologia.

Em março de 2003, ingressou no Curso de Mestrado em Ciências Veterinárias – Área de Parasitologia Veterinária da mesma instituição, sendo bolsista CAPES.

Concluiu o Mestrado em agosto de 2004, ingressando automaticamente no Doutorado pelo Programa de Transferência de Nível (CAPES).

## RESUMO

PIRANDA, Eliane Mattos Piranda. **Estudos biológicos de *Rhipicephalus sanguineus* e interação *Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* e cães em condições laboratoriais**. 2008. 74p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A bactéria *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico de uma doença aguda e severa em humanos denominada “Rocky Mountain Spotted Fever” nos Estados Unidos e Febre Maculosa Brasileira no Brasil. A infecção se dá pela picada de carrapatos. Relatos da doença clínica nos cães são restritos aos EUA. O carrapato marrom do cão ou carrapato dos canis, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), é a espécie de carrapato mais freqüente nos trópicos e subtropicais. Estudos da biologia de carrapatos são de grande importância para o entendimento da transmissão de biogêntes. O objetivo do presente trabalho é avaliar experimentalmente a infecção nos cães com *R. rickettsii* cepa Itaipu (Mogi das Cruzes/ São Paulo, Brasil) e aspectos da biologia de *Rhipicephalus sanguineus*. Na primeira etapa, cães foram infectados com *R. rickettsii* e avaliou-se a susceptibilidade dos animais a infecção e o comportamento de *R. sanguineus* como vetor. No segundo experimento, adultos de *R. sanguineus* tiveram a viabilidade de infestar novos hospedeiros analisada. Os carrapatos foram mantidos a  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $80 \pm 5\%$  UR por três períodos de jejum. Observou-se que os cães são susceptíveis a infecção por *R. rickettsii* cepa Itaipu. Foi verificado que *R. sanguineus* se infectam com *R. rickettsii* e são capazes de transmitir o agente a cobaias. Baseado nos resultados do segundo experimento, concluem-se que *R. sanguineus* tem a viabilidade influenciada pela temperatura e tempo de jejum.

**Palavras-chave:** *Rhipicephalus sanguineus*, *Rickettsia*, cão.



## ABSTRACT

PIRANDA, Eliane Mattos Piranda. **Biological studies on *Rhipicephalus sanguineus* and interactions of *Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* and dogs under laboratory conditions.** 2008. 74p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The bacterium *Rickettsia rickettsii* is the etiological agent of an acute, severe human disease called Rocky Mountain Spotted Fever in the United States or Brazilian Spotted Fever in Brazil. The infection occurs through the tick bite. Reports of clinical illness on dogs due to this agent have been restricted to the United States. The brown dog tick or kennel tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) is the most widespread tick species throughout the tropics and subtropics. Biological studies on ticks are very important to the tick-borne pathogens transmission knowledge. For this purpose, the present study evaluated experimental infection of dogs with a Itaiçu (Mogi das Cruzes/ São Paulo, Brasil) strain of *R. rickettsii* and some biological aspects of *Rhipicephalus sanguineus*. Initially, dogs were infected with *R. rickettsii* its susceptibility and the role of *R. sanguineus* as a vector was verified. In the second part the viability of adults' ticks (*R. sanguineus*) on three different temperatures were tested. Ticks were maintained under the controlled conditions of  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  e  $80 \pm 5\%$  (temperature  $\pm$  humidity) for different times without feed. The dogs were susceptible to *R. rickettsii* infection. *R. sanguineus* was able to acquire the pathogen and to transmit *R. rickettsii* to guinea pigs. Based on the second part's results, *R. sanguineus* viability is affected by both, temperature and unfed time.

**Keywords:** *Rhipicephalus sanguineus*, *Rickettsia*, dog.

## LISTA DE ABREVIÇÕES E SÍMBOLOS

%	por cento
μL	microlitros
♀♀ii	fêmeas ingurgitadas
AA	adultos
Alt.	altitude
B.O.D.	“Biological Oxygen Demand” - demanda biológica de oxigênio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cm	centímetro
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPGCV	Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias
DNA	“deoxyribonucleic acid” – ácido desoxirribonucléico
dNTP	nucleotídeos trifosfato
DPA	Departamento de Parasitologia Animal
EDTA	“ethylenediaminetetraacetic acid” - ácido etileno diamino tetracético
EPPWON	Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz
et al.	<i>et alli</i> – e colaboradores
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMB	Febre Maculosa Brasileira
FMVZ	Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
g	grama
<i>gl</i> A	gene citrato sintase
IEN	Índice de Eficiência Nutricional
IER	Índice de Eficiência Reprodutiva
IgG	Imunoglobulina G
IV	Instituto de Veterinária
IZ	Instituto de Zootecnia
Kda	quilodalton
Lat.	latitude
LL	larvas
Long.	longitude
m	metro
mg	miligramas
MgCl <sub>2</sub>	cloreto de magnésio
mL	mililitros
mM	milimolar
ng	nanograma
NN	ninfas
°C	graus Celsius
<i>omp</i> A	“outer membrane protein A” - proteína externa de membrana A
pb	pares de bases
PCR	“polymerase chain reaction” - reação em cadeia da polimerase
pH	potencial hidrogeniônico
pmoles	pico moles
q.s.p.	quantidade suficiente para
RIFI	reação de imunofluorescência indireta
RJ	Rio de Janeiro
RMSF	“Rocky Mountain Spotted Fever”

RNA	“ribonucleic acid”- ácido ribonucleíco
S	“South” - sul
SP	São Paulo
SPG	sucro-fosfato-glutamato
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
UR	umidade relativa
USP	Universidade de São Paulo
VPS	Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal
W	“West” - oeste
x	vezes

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>CAPITULO I</b>	<b>2</b>
Avaliação da susceptibilidade do cão doméstico a infecção experimental por <i>Rickettsia rickettsii</i> e de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> como vetor do agente da Febre Maculosa Brasileira	
<b>RESUMO</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>4</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>5</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>7</b>
2.1 Carrapatos como Vetores de Riquetisioses no Brasil	7
2.2 <i>Rickettsia rickettsii</i> e os Cães	7
2.3 Manutenção de <i>Rickettsia</i> sp. na População de Carrapatos	10
2.4 Efeitos da Infecção de <i>R. rickettsii</i> sobre a Biologia de Ixodídeos	10
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>12</b>
3.1 Local do Experimento	12
3.2 Hospedeiros	12
3.3 Os Ixodídeos	12
3.3.1 <i>Amblyomma aureolatum</i>	12
3.3.2 <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	13
3.4 Infestações Experimentais	13
3.5 Grupos Experimentais	13
3.6 Procedimento Experimental para Avaliar a Susceptibilidade dos Cães a Infecção e a Capacidade Vetorial de <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	15
3.6.1 Hemograma	17
3.6.2 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)	17
3.6.3 Isolamento de <i>R. rickettsii</i> nos Grupos Experimentais	17
3.6.4 Detecção de DNA de <i>R. rickettsii</i>	17
3.7 Procedimento Experimental para Avaliação do Potencial de <i>R. sanguineus</i> como Vetor de <i>R. rickettsii</i>	18
3.7.1 Acondicionamento de larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas	18
3.7.2. Determinação da prevalência da infecção em <i>R. sanguineus</i>	18
3.7.3 Avaliação da transmissão de <i>R. rickettsii</i> por <i>R. sanguineus</i> a cobaias	19
3.7.4 Avaliação dos parâmetros biológicos de <i>R. sanguineus</i> alimentados em cães infectados e não infectados por <i>R. rickettsii</i>	22

<b>4 RESULTADOS</b>	<b>23</b>
4.1 Avaliação da Susceptibilidade do Cão Doméstico a Infecção e seu Papel como Amplificador de <i>R. rickettsii</i>	23
4.2 Determinação da Prevalência da Infecção de <i>R. rickettsii</i> em <i>R. sanguineus</i> Alimentados em Cães Infectados Experimentalmente	29
4.3 Avaliação da transmissão de <i>R. rickettsii</i> por <i>R. sanguineus</i> a Cobaias	30
4.4 Avaliação da Manutenção de <i>R. rickettsii</i> na População de <i>R. sanguineus</i>	34
4.5. Avaliação dos Parâmetros Biológicos de <i>R. sanguineus</i> Alimentados em Cães Infectados e Não Infectados por <i>R. rickettsii</i>	36
<b>5 DISCUSSÃO</b>	<b>39</b>
5.1 Avaliação da Susceptibilidade do Cão Doméstico a Infecção e seu Papel como Amplificador de <i>R. rickettsii</i>	39
5.2 Determinação da Prevalência da Infecção de <i>R. rickettsii</i> em <i>R. sanguineus</i> alimentados em Cães Infectados Experimentalmente	40
5.3 Avaliação da transmissão de <i>R. rickettsii</i> por <i>R. sanguineus</i> a Cobaias	41
5.4 Avaliação da Manutenção de <i>R. rickettsii</i> na População de <i>R. sanguineus</i>	42
5.5. Avaliação dos Parâmetros Biológicos de <i>R. sanguineus</i> Alimentados em Cães Infectados e Não Infectados por <i>R. rickettsii</i>	42
<b>6 CONCLUSÕES</b>	<b>44</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>55</b>
Viabilidade de adultos de <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Acari: Ixodidae) mantidos em três temperaturas por diferentes períodos de jejum	
<b>RESUMO</b>	<b>56</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>57</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>58</b>
<b>2 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>61</b>
2.1 Local de Execução	61
2.2 Hospedeiros	61
2.3 Obtenção dos Ixodídeos	61
2.4 Procedimento Experimental	61
2.5 Parâmetros Avaliados	62
2.6 Análise Estatística	62
<b>3 RESULTADOS</b>	<b>63</b>
<b>4 DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>5 CONCLUSÃO</b>	<b>68</b>
<b>6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>69</b>

<b>ANEXOS</b>	<b>72</b>
<b>A - Certificado da Comissão de Bioética da FMVZ/USP</b>	<b>73</b>
<b>B - Título de anticorpos encontrados na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em cães infectados por <i>R. rickettsii</i> através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1) e de alimentação de carrapatos infectados (Grupo 2) no dia 0</b>	<b>74</b>

## INTRODUÇÃO

Os carrapatos têm grande importância na transmissão de patógenos para os animais e seres humanos, destacando-se pela grande variedade de espécies que podem ser transmitidos entre protozoários, vírus, riquetsias e bactérias (SONENSHINE, 1993). E pelo fato das doenças causadas serem responsáveis por elevados custos na produção animal e alta morbidade nas pessoas acometidas (JONGEJAN e UILENBERG, 2004). Estudos da biologia de carrapatos e seu comportamento como vetor de biogente são vastos na literatura internacional e nacional. No entanto, algumas lacunas ainda existem e se preenchidas podem dinamizar os conhecimentos para futuras pesquisas sobre os mecanismos de transmissão de patógenos, dinâmica populacional e até nas medidas preventivas.

Neste cenário, a presente tese foi desenvolvida em dois capítulos. O primeiro capítulo trata do estudo da susceptibilidade do cão doméstico a infecção experimental de *Rickettsia rickettsii*, agente da Febre Maculosa Brasileira, e do “carrapato vermelho do cão”, *Rhipicephalus sanguineus*, como potencial vetor. Neste contexto, também foi avaliada a capacidade deste artrópode em manter o bioagente na natureza através dos estágios de seu ciclo subseqüentes a infecção e as alterações de seus parâmetros biológicos. Este trabalho teve como início o desejo de se estudar aspectos da transmissão de patógenos veiculados por carrapatos e técnicas de diagnóstico molecular e resultou em parte do projeto “Avaliação do papel das capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), gambás (*Didelphis aurita*) e cães domésticos na epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira”, coordenado pelo professor Marcelo Bahia Labruna (VPS/FMZ/USP) e com apoio da FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo). O projeto busca melhor compreender a epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira através do estudo de espécies de animais que possam atuar como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii* para carrapatos e a dinâmica da infecção nas populações de carrapatos em áreas endêmicas.

No segundo capítulo, a questão abordada é a viabilidade de adultos de *R. sanguineus*, isto é, a capacidade desse ixodídeo infestar novos hospedeiros e dar continuidade ao ciclo biológico após ser mantido por diferentes períodos de jejum em três temperaturas constantes. Este experimento foi realizado com o objetivo de dar continuidade à linha de pesquisa do Laboratório de Ixodologia (DPA/IV/UFRRJ) e proporcionar avanços nos estudos de bioecologia de carrapatos.

## **CAPÍTULO I**

### **AVALIAÇÃO DA SUSCEPTIBILIDADE DO CÃO DOMÉSTICO A INFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Rickettsia rickettsii* E DE *Rhipicephalus sanguineus* COMO VETOR DO AGENTE DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA**



## RESUMO

PIRANDA, Eliane Mattos Piranda. **Avaliação da susceptibilidade do cão doméstico a infecção experimental por *Rickettsia rickettsii* e de *Rhipicephalus sanguineus* como vetor do agente da Febre Maculosa Brasileira** 2008. 54p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A bactéria *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico de uma doença aguda e severa em humanos denominada “Rocky Mountain Spotted Fever” nos Estados Unidos e Febre Maculosa Brasileira no Brasil. A infecção ocorre através da picada do carrapato. Relatos da doença clínica em cães pelo agente se restringem aos Estados Unidos. O carrapato vermelho do cão ou carrapato dos canis, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), é a espécie de carrapato mais distribuída nos trópicos e subtropicais. O presente trabalho se propôs a avaliar a susceptibilidade de cães a infecção experimental por *R. rickettsii* cepa Taiacu (Mogi das Cruzes, São Paulo, Brasil) e o papel de *R. sanguineus* como vetor deste patógeno. Oito cães foram distribuídos em três grupos experimentais: G1 composto por três cães que foram inoculados via intraperitoneal com 1mL de suspensão de *R. rickettsii* cepa Taiacu; G2 formado por três cães que foram infestados experimentalmente com cinco casais de *A. aureolatum* infectados e o grupo controle composto por dois cães não infectados. Cada cão foi infestado com 200 larvas, 600 ninfas e 20 casais de *R. sanguineus* no segundo dia após a infecção com *R. rickettsii*. Os cães foram examinados diariamente. Amostras de sangue e carrapatos foram coletadas para avaliação hematológica, sorológica e análise molecular. Após os processos de ecdise e eclosão, os adultos, ninfas e larvas de *R. sanguineus* foram alimentados em cobaias (*Cavia porcellus*). Os cães foram susceptíveis a infecção por *R. rickettsii* cepa Taiacu e apresentaram, principalmente, febre e trombocitopenia. *Rhipicephalus sanguineus* foi capaz de se infectar e transmitir *R. rickettsii* a cobaias.

**Keywords:** *Rhipicephalus sanguineus*, *Rickettsia rickettsii*, cão.

## ABSTRACT

PIRANDA, Eliane Mattos Piranda. **Susceptibility of dogs to *Rickettsia rickettsii* infection and the role of *Rhipicephalus sanguineus* as a vector of the Brazilian Spotted fever's agent.** 2008. 54p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

The bacterium *Rickettsia rickettsii* is the etiological agent of an acute, severe of human disease called Rocky Mountain spotted fever in the United States or Brazilian spotted fever in Brazil. The infection occurs through the tick bite. Reports of clinical illness on dogs due to this agent have been restricted to the United States. Several serologic-based studies among healthy Brazilian dogs indicate that these animals were infected. For this purpose, the present study evaluated experimental infection of dogs with a Taiaçu (Mogi das Cruzes, São Paulo, Brazil) strain of *R. rickettsii* and the role of *Rhipicephalus sanguineus* as a vector of its pathogen. Eight dogs were assigned to 3 experimental groups: G1 was composed by 3 dogs that were each inoculated intraperitoneally with *R. rickettsii* strain Taiaçu suspended in 1 mL, G2 was composed by 3 dogs that were each infested by 5 couples of *R. rickettsii*-infected *A. aureolatum* adult ticks and the control group was composed by 2 dogs that were left uninfected. Each dog was infested with 200 larvae, 600 nymphs and 20 couple of *R. sanguineus*, at the day two after the *R. rickettsii* infection. The dogs were examined daily. Blood samples and ticks were collected to hematological evaluation, serology and molecular analysis. After the ecdysis or eclosion process adults, nymphs and larvae of *R. sanguineus* were allowed to feed on guinea pigs. The dogs were susceptible to *R. rickettsii* infection with fever and thrombocytopenia. *R. sanguineus* was able to get infected and to transmit *R. rickettsii* to guinea pigs.

**Keywords:** *Rhipicephalus sanguineus*, *Rickettsia rickettsii*, dog.

## 1 INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma doença causada pela bactéria *Rickettsia rickettsii* e transmitida pela picada de carrapatos. A doença foi descrita no Brasil na década de 30 e, nos últimos anos, ganhou destaque nos estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro com casos fatais em seres humanos. Isto pode ser explicado por ações antropogênicas e mudança no ambiente levando o homem a maior exposição aos fatores de riscos.

Atualmente, os estudos buscam melhor conhecer a epidemiologia da doença e a dinâmica do agente na natureza, através da caracterização genotípica das cepas de *Rickettsia* sp. em áreas endêmicas, da identificação das espécies de vetores e de espécies de animais que possam atuar como hospedeiros amplificadores do agente. No Brasil, onde o principal vetor é o carrapato *Amblyomma cajennense* (GUEDES et al. 2005), não há comprovação de uma espécie animal que atue como hospedeiro amplificador de *R. rickettsii*, apenas suspeitas do envolvimento de capivaras e gambás (MOREIRA; MAGALHÃES 1935; TRAVASSOS; VALLEJO 1942a,b; SOUZA et al. 2004; HORTA et al. 2005b). Ressalta-se que a espécie *A. aureolatum*, cujo hospedeiro primário do estágio adulto é o cão, também foi incriminada como vetor da Febre Maculosa em área endêmica do estado de São Paulo (PINTER, 2003).

Sabe-se que para uma espécie animal ser um hospedeiro competente de um bioagente veiculado por artrópode ela deve ser abundante na área endêmica para a doença, ser também um bom hospedeiro para o artrópode vetor em condições naturais, ser susceptível à infecção e, finalmente, manter o agente em níveis plasmáticos suficientes para infectar o vetor que se alimentem nele. No caso dos patógenos transmitidos por carrapatos, algumas espécies podem adquirir a infecção sem que o hospedeiro apresente o agente circulante na corrente sanguínea. Este processo é conhecido como “co-feeding” e vem sendo estudado, principalmente, na transmissão de arbovírus e de espiroquetas por carrapatos do gênero *Ixodes*; por isso não será o foco do presente trabalho (RANDOLPH et al., 1996). Assim, ao se investigar os cães domésticos como possíveis animais envolvidos na epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira observa-se que ele atende os dois primeiros quesitos, sendo necessário um estudo para avaliar a susceptibilidade à infecção por *R. rickettsii* e a capacidade de agir como hospedeiro amplificador da riquetsia para o carrapato infectado.

Em relação à competência vetorial dos artrópodes, Balashov (2005) apresenta algumas premissas: isolamento do agente no vetor em condições naturais, coincidência temporal e espacial da atividade do vetor com hospedeiro infectado, contato vetor/patógeno estável e, finalmente, infecção experimental do vetor com o agente. A estabilidade vetor/patógeno pode ser avaliada pelos efeitos patogênicos decorrentes da infecção no artrópode e pela sua capacidade de manter o agente na natureza por várias gerações através das transmissões trans-estadial e transovariana. Neste caso, o carrapato vermelho do cão, *Rhipicephalus sanguineus*, representa um potencial agente disseminador da riquetsia, visto sua abundância na natureza e relatos de espécimes infectados naturalmente em áreas endêmicas da Febre Maculosa (MARIOTTE et al. 1944; DEMMA et al., 2005; WIKSWO et al., 2007). Porém não há estudos sobre o comportamento desses carrapatos infectados com *R. rickettsii* no Brasil.

Neste contexto, o presente trabalho buscou avaliar a susceptibilidade do cão doméstico a infecção por *R. rickettsii* e a capacidade de *R. sanguineus* se infectar e transmitir o agente da Febre Maculosa Brasileira quando alimentados em seu hospedeiro natural (*Canis familiaris*). Assim, os objetivos específicos foram: (a) avaliar os aspectos clínicos e hematológicos de cães infectados experimentalmente por *R. rickettsii*; (b) determinar a ocorrência e duração de

riquetsemia nos cães experimentalmente infectados; (c) determinar a curva de anticorpos anti-*R. rickettsii* em cães experimentalmente infectados; (d) determinar a prevalência da infecção de *R. rickettsii* em *R. sanguineus* alimentados em cães experimentalmente infectados; (e) verificar a transmissão experimental de *R. rickettsii* por *R. sanguineus* a animais de laboratório; (f) verificar a transmissão transtadiária e transovariana de *R. rickettsii* em *R. sanguineus*; (g) avaliar os efeitos patogênicos da infecção por *R. rickettsii* sobre os parâmetros biológicos de *R. sanguineus*.

Este experimento visa contribuir com os estudos da epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira, possibilitando futuras ações investigativas e preventivas da doença.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Carrapatos como Vetores de Riquetsioses no Brasil

Estudos buscando melhor conhecer a epidemiologia das riquetsioses datam da década de 30, principalmente, no Instituto Butantan, Estado de São Paulo (MONTEIRO et al., 1932b). Monteiro et al. (1932a,c) avaliaram a transmissão do vírus do Typho Endêmico de São Paulo, posteriormente identificado corretamente como *Rickettsia rickettsii*, por algumas espécies de carrapatos. Os autores observaram que *Ornithodoros rostratus* e *Amblyomma cajennense* são susceptíveis a infecção quando alimentados em cobaias, embora as espécies apresentem comportamentos e importância distintos.

Através de infestações e inoculações experimentais, Travassos e Vallejo (1942a,b) demonstraram que o carrapato *A. cajennense* pode, alimentando-se em capivaras (*Hydrochoerus hydrochoerus*) infectar-se e, posteriormente, transmitir a infecção através da picada a outros animais e, possivelmente, ao homem.

Na década de 90, estudos foram realizados em áreas com casos humanos na tentativa de isolar o agente de *A. cajennense*, *A. triste*, *A. dubitatum* (= *A. cooperi*), *Anocentor nitens*, *R. sanguineus* e *R. (Boophilus) microplus* (= *Boophilus microplus*) coletados na vegetação e em animais domésticos e silvestres. O resultado positivo só foi encontrado em *A. cajennense* que demonstrou uma relação dos casos da doença com o período de atividade dos estágios imaturos (LEMOS et al., 1996abc; 1997a,b).

Pesquisas mais recentes confirmaram através de diagnóstico molecular a importância de *A. cajennense* na transmissão da *R. rickettsii* no Brasil (GUEDES et al., 2005). Pinter (2003) verificou a presença de cães parasitados por *A. aureolatum*, *A. cajennense* e *R. sanguineus* em área endêmica de Febre Maculosa. O autor, ao fazer teste de hemolinfa dos carrapatos e reação em cadeia pela polimerase (PCR), observou positividade em *A. aureolatum*, assim como 45,8% dos cães apresentaram soros com anticorpos anti-*R. rickettsii*.

Dentre as demais espécies de *Rickettsia* encontradas em carrapatos no Brasil, pode-se citar: *R. felis* diagnosticada em *R. sanguineus* e *A. cajennense* (GALVÃO et al., 2002; CARDOSO et al., 2006), *R. belli* diagnosticada em sete espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* (*A. aureolatum*, *A. cooperi*, *A. ovale*, *A. oblogoguttatum*, *A. humerale*, *A. sculpturatum*, *A. rotundatum*) e em *Ixodes loricatus*; *R. amblyommii* em *A. cajennense* e *A. coelebs*, *R. rhipicephali* em *Haemaphysalis juxtakochi* e, finalmente, cepa semelhante a *R. parkeri* em *A. cooperi* (PINTER 2003; LABRUNA et al. 2004abc; 2005). Embora estas espécies, exceto *R. parkeri* e *R. felis*, não sejam reconhecidas como patogênicas, exercem importante papel na manutenção do agente da Febre Maculosa Brasileira. O carrapato infectado por uma espécie de *Rickettsia* não patogênica impede a transmissão transovariana de uma espécie patogênica (BURGDORFER 1988; MACALUSO et al. 2002), o que pode explicar a baixa prevalência da infecção na população de carrapatos na natureza (PHILIP; CASPER 1981; PINTER; LABRUNA 2006).

### 2.2 *Rickettsia rickettsii* e os Cães

Na literatura das décadas de 30 e 40, também se encontram inquéritos envolvendo os cães como reservatórios do agente da Febre dos carrapatos que acometia o homem (DURAND; CONSEIL 1932; PARKER et al. 1933; BADGER 1933; TRAVASSOS 1938). Nesta época, a susceptibilidade dos animais a infecção foi demonstrada com sucessivas inoculações em cobaias com sangue e macerado de carrapatos dos cães que adoeciam durante o experimento (ANIGSTEIN; BADER 1943).

No Brasil, Gomes (1933) destacou a importância de *A. aureolatum*, naquela época ainda designado *A. ovale*, ao encontrar um exemplar parasitando um cão pertencente a uma família que tinha contraído a doença. Neste trabalho, o autor averiguou através de inoculações subcutâneas em cobaias a presença do agente nos exemplares desta espécie oriundos de zonas infectadas.

Moreira e Magalhães (1935) observaram, em laboratório, que o cão doméstico é capaz de ter a moléstia de forma fraca ou inaparente, infectando-se também através da ingestão de material biológico contaminado. Os autores ainda verificaram a presença da infecção em dois exemplares de *A. cajennense* oriundos de um cão de área endêmica de Minas Gerais, embora o agente não tenha sido encontrado no sangue, sistema nervoso central ou pulgas deste animal.

Dias (1937) reforçou a importância do cão doméstico e do *R. sanguineus* como “depositário natural” da Febre Maculosa Brasileira, diante dos relatos de animais positivos a reação de Weil-Felix nos focos endêmicos (DIAS et al. 1937), achados de carrapatos infectados na natureza e observações epidemiológicas.

Em 1937, a moléstia dita como uma variedade da “Rocky Mountain Spotted Fever” (RMSF) recebe o nome de Typho Exantemático do Brasil, no mesmo trabalho o cão (*Canis familiaris*) dentre outros animais, gambá (*Didelphis marsupialis*), cachorro do mato (*Canis brasiliensis*), coelho do mato (*Silvilagus minensis*), preá (*Cavia aprea*) e cutia (*Dasypocta azarae*), foram propostos como reservatórios naturais do agente (MOREIRA; MAGALHÃES, 1937).

No México, a “Fiebre Manchada” foi detectada em humanos por Bustamante e Varela (1943) que iniciaram estudos epidemiológicos, especulando tratar-se de uma nova espécie de *Rickettsia* sp. Em seguida, na tentativa de conhecer a extensão da doença e a presença de possíveis vetores, exemplares de *A. cajennense* e de *R. sanguineus* foram achados infectados naturalmente em um cão da região (MARIOTTE et al. 1944; BUSTAMENTE; VARELLA 1946; 1947).

Price (1954) observou que de 28 casos de RMSF, 20 pacientes tinham cães, estes ao serem examinados apresentavam adultos de *Dermacentor variabilis*. O autor ressaltou a importância desses animais na transmissão da doença aproximando o vetor, principalmente de crianças e o risco do homem se infectar ao retirar os carrapatos do animal, diferentemente do que ocorre com *D. andersoni*.

Os estudos com cães infectados com *R. rickettsii*, experimentalmente, através de inoculações intravenosas, nos EUA, demonstraram a susceptibilidade desses animais ao agente. Os sintomas clínicos (febre, inapetência e depressão) apareceram dois ou três dias após a inoculação e variaram com a dose infectante. A evolução da doença de forma aguda, resultou no aparecimento de petéquias, equimoses, epistaxis ou edema do focinho precedendo à morte do animal. Alterações hematológicas, como anemia normocítica normocrômica, trombocitopenia severa e leucocitose, e bioquímicas também foram diagnosticadas nos cães infectados. A duração e a magnitude da riquetsemia observada pressupõe que os cães possam ser fonte de infecção para os carrapatos. Os autores, ainda, sugeriram que estes animais tenham importância como sentinelas da infecção em áreas endêmicas em razão da resposta sorológica desenvolvida, e que os cães são modelos interessantes relativos às riquetsioses (KEENAN et al. 1977a,b). Segundo Shaw et al. (2001), o cão doméstico pode atuar como sentinela para infecções veiculadas por carrapatos e que sejam comuns ao cão e ao homem por três formas: diretamente quando o carrapato envolvido tem uma gama variada de hospedeiro; proporcionando maior contato do homem com o carrapato por este ser de hábitos nidícolas ou, ainda, quando o homem se expõe a agente ao manipular carrapatos infectados no cão.

Breitschwerdt et al. (1988; 1991) realizaram inoculações de doses baixas de *R. rickettsii* por via intradérmica a fim de averiguar a sintomatologia clínica da doença de forma branda em cadelas de oito meses de idade. Nestas condições, os cães apresentaram letargia, febre, anorexia, lesões oculares, discretas vesículas orais e diarreia; apesar da diminuição quantitativa de plaquetas não foram observadas lesões cutâneas.

Casos fatais de cães infectados com *R. rickettsii* são relatados na literatura com prevalência variada: 0 a 7% (GREENE et al., 1985; GREENE, 1987; GASSER et al., 2001). Mikszewski e Vite (2005) observaram alterações neurológicas como paresia, tremores e distúrbios vestibulares precedendo a morte de cães infectados por *R. rickettsii* nos EUA.

Greene et al. (1985) ao buscar diferenças entre “Rocky Mountain Spotted Fever” (RMSF) e a Erliquiose em cães verificaram que a diminuição na contagem de plaquetas em média é um achado comum as duas doenças, sendo na RMSF geralmente mais grave. Foi observado também diferenças na frequência dos casos durante o ano, sendo casos de RMSF nos cães analisados de incidência sazonal (abril a setembro); enquanto que os de erliquiose foram diagnosticados durante todo ano.

Em estudos que a susceptibilidade dos cães a *R. rickettsii* e seu potencial como fonte de infecção a carrapatos foram avaliados, observou-se o aparecimento da ricketsemia de 4 a 10 dias após a inoculação via intraperitoneal e de 6-13 dias quando a infecção se deu por ninfas ou adultos de *D. variabilis* ou *R. sanguineus* infectados. Estágios imaturos de *R. sanguineus* não se infectaram ao se alimentarem em cães após a inoculação e apenas três de 348 carrapatos adquiriram a infecção através da alimentação em cães expostos, previamente, a carrapatos positivos (NORMENT; BURGDORFER, 1984).

Ao longo dos anos, vários relatos de cães sorologicamente reativos com anticorpos anti-*R. rickettsii* foram realizados em áreas endêmicas (SHEPARD; TOPPING, 1946; SEXTON et al., 1976; FENG et al., 1979; MAGNARELLI et al., 1982; SMITH et al., 1983; BREITSCHWERDT et al., 1985; 1999; GREENE et al., 1985), inclusive no Brasil (LEMONS et al., 1996b; HORTA et al., 2004; SANGIONI et al., 2005; CARDOSO et al., 2006). A maioria desses trabalhos mostra a circulação de riquetsia do grupo da febre maculosa entre os animais domésticos como fator de aproximação do agente ao homem. Diversos casos de febre maculosa já foram relatados em cães e em seus proprietários nos EUA, enfocando a importância dos cães em disseminar carrapatos infectados para proximidades dos domicílios e ainda do ato dos proprietários removerem os parasitos de seus animais de estimação com as mãos se expondo ao agente (SPENCER; PARKER, 1930; PADDOCK et al., 2002).

No Arizona, Demma et al. (2005) evidenciaram que *R. sanguineus* pode ser o vetor da RMSF em algumas regiões, onde não são encontrados *D. variabilis* e *D. andersoni*, vetores primários da doença nos EUA. A afirmação se baseia na detecção de DNA e isolamento de *R. rickettsii*, em cultivo celular, em adultos de *R. sanguineus* não ingurgitados encontrados nas residências dos pacientes com Febre Maculosa confirmada e de uma ninfa ingurgitada em um cão pertencente a um desses pacientes. Os exames sorológicos dos cães da região também demonstraram exposição prévia dos animais a riquetsia do grupo da Febre Maculosa. Em um único macho (1,6%) de *R. sanguineus* coletado em cães da Califórnia, foi detectado DNA de *R. rickettsii*, sugerindo que outra espécie de carrapato que não de *Dermacentor* sp. seja o vetor responsável pelos casos esporádicos da doença em humanos (WIKSWO et al. 2007).

É importante relatar a existência de inúmeros trabalhos demonstrando a importante relação dos cães domésticos e seus carrapatos na transmissão de *R. conorii*, espécie de riquetsia do grupo da Febre Maculosa que acomete os seres humanos (“Boutonneuse Fever” ou Febre Maculosa do Mediterrâneo). Inquéritos sorológicos de cães foram associados aos focos da doença (HERRERO et al., 1992; MANOLI et al., 1996; SEGURA-PORTA et al., 1998; MANNELLI et al., 2003), assim como a presença de *R. sanguineus* (GILOT et al., 1990; SANTOS et al., 2002; MATSUMOTO et al. 2005).

### 2.3 Manutenção *Rickettsia* sp. na População de Carrapatos

A infectividade e patogenicidade de *Rickettsia* sp. na população de carrapatos refletem na distribuição e dinâmica do agente na natureza, visto que são diversas espécies de carrapatos que agem como vetores, algumas com ampla cadeia de hospedeiros, os carrapatos ainda possuem grande resistência a condições adversas apresentando-se em grande concentração de carrapatos por área; além do elevado potencial reprodutivo são capazes de manter o agente entre os estágios e para geração seguinte (McDADE; NEWHOUSE, 1986). Assim dentre esses fatores de importância para manutenção e a dispersão do agente na natureza, pode-se citar a transmissão entre os estágios de desenvolvimento do carrapato (trans-estadial) e para as gerações sucessivas (trans-ovariana), ainda que as espécies de animais hospedeiros dos carrapatos atuem como agente amplificador da *Rickettsia* sp. mantendo a circulante na natureza (PRICE, 1954; BURGDORFER 1988).

Para Burgdorfer (1981) as barreiras físicas e químicas do sistema digestivo dos carrapatos só são superadas quando há grande quantidade de riquetsia, visto que somente nestas condições ocorre a infecção do carrapato. Após três e cinco dias da ingestão de riquetsia, é possível encontrá-las nos hemócitos. Após a muda de ninfa e adulto, todos os tecidos estão infectados ocorrendo a multiplicação do agente, assim há transmissão trans-estadial de *R. rickettsii* de larvas para ninfas e adultos se deve a infecção disseminada, inclusive nas glândulas salivares. Enquanto a transmissão transovariana depende do grau de infecção nos tecidos do ovário, quando maciça a transmissão se dá com sucesso (100%) quando branda essa taxa varia (1,5%-13% em *D. andersoni*; 4,6-10,4% *D. variabilis* capturados em cães positivos).

Regendanz e Muniz (1936), preocupados com a proximidade dos cães com o homem e, conseqüentemente, do *R. sanguineus* realizar mudas no interior de casa ou jardins, investigaram a transmissão transestadial e transovariana das riquetsias neste ixodídeo. Larvas foram alimentadas em cobaias infectadas através de inoculação intraperitoneal. Após a muda, essas ninfas se alimentaram em cobaias sadias e, posteriormente, os adultos em cães. Observou-se a ocorrência da transmissão transestadial do agente quando ninfas mudaram para adultos e a capacidade de ninfas transmitirem-no a cobaias. Neste trabalho, os autores não comprovaram a presença de riquetsia em ovos e larvas oriundo de adultos infectados.

Price (1954) observou que ao alimentar larvas e ninfas de *D. variabilis* em roedores infectados no laboratório e os adultos em cães livres do agente, 30% das larvas da geração seguinte permaneceram infectadas com *R. rickettsii*.

A transmissão transovariana de *R. rickettsii* por *D. andersoni* mostrou ser influenciada pelo momento em que ocorre a infecção, permitindo que haja colonização dos ovários pela riquetsia e que desta maneira, os ovos e futuras larvas sejam infectadas. A replicação e invasão celular ocorrem durante a alimentação das ninfas e o desenvolvimento do adulto por isso o momento da infecção pode determinar o percentual de transmissão transovariana sucedida (BURGDORFER, 1984).

Horta et al. (2006) observaram que *R. bellii* isolada de *I. loricatus* se manteve na população de carrapatos através das transmissões trans-estadial e transovariana, sugerindo este como um importante mecanismo de manutenção do agente na natureza.

### 2.4. Efeitos da Infecção de *R. Rickettsii* sobre a Biologia de Ixodídeos

Inúmeros trabalhos científicos abordam os efeitos de patógenos na biologia dos carrapatos, desde os processos de muda, oviposição, eclosão larval e sobrevivência. Entre os estudos com *Rickettsia* sp. verifica-se que tais efeitos são evidenciados ao longo de gerações (BURGDORFER, 1988, NIEBYLSKI et al., 1999). Outros fatores importantes são: o momento em que o carrapato adquiriu a infecção e a concentração ingerida pelo vetor. No



entanto, pouco se sabe a respeito da duração e concentração de riquetsemia nos hospedeiros naturais, mas acredita-se que seja mais branda que a observada em laboratório.

Burgdorfer e Brinton (1975) observaram que *D. andersoni* ao ser infectado com *R. rickettsii*, ao longo de sucessivas gerações, há um maciço desenvolvimento de riquetsias no organismo do carrapato responsável pela mortalidade de fêmeas ingurgitadas e/ou falhas no desenvolvimento embrionário.

Burgdorfer et al. (1981) sugeriram que a competição de duas espécies de *Rickettsia* sp. pode ser um dos fatores responsáveis pela baixa prevalência de *R. rickettsii* em vetores encontrados na natureza. Em laboratório através de infecções experimentais, a transmissão transovariana de uma segunda espécie de *Rickettsia* (*R. rhipicephali* e/ou *R. montana*) em *D. andersoni* foi inibida, embora fosse possível adquirir a infecção (MACALUSO et al., 2002).

Freitas (2007) verificou que *Haemaphysalis leporispalustris* alimentados em coelhos domésticos infectados com *R. rickettsii*, à partir de inoculações, tiveram o desempenho biológico prejudicado se comparado com aqueles carrapatos alimentados em animais não-infectados.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local do Experimento

Parte do material biológico utilizado neste trabalho foi obtida e preparada no Laboratório de Ixodologia da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal / Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (EPPWON / DPA / IV / UFRRJ).

O experimento foi realizado nas dependências do Laboratório de Doenças Parasitárias e no biotério do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (VPS / FMVZ / USP).

### 3.2 Hospedeiros

Cinco cães, fêmeas de raça indefinida, com aproximadamente seis meses de idade, oriundos de uma mesma ninhada, e três cães da raça Beagle provenientes do biotério Biovet S/A (Vargem Grande Paulista, SP) da mesma idade e sexo foram utilizados neste experimento. Todos os animais apresentavam-se saudáveis e foram tratados adequadamente com medicação anti-helmíntica e imunizados com vacinas comerciais contra enterovirose, hepatite, parainfluenza e leptospirose. Os animais não tiveram contato prévio com carrapatos e/ou produtos acaricidas e apresentaram sorologia negativa para *R. rickettsii* (título inferior a 64) e *Ehrlichia canis* (título inferior a 40) (AGUIAR et al., 2007) em amostras pareadas com intervalo de 14 dias. Durante todo o experimento, os animais foram alojados em baias individuais (100x100x100cm) e receberam ração comercial e água *ad libitum*. Ao término do experimento, os animais foram tratados com doxiciclina e destinados à adoção.

Cobaias (*Cavia porcellus*), por serem consideradas animais modelo para estudos com riquetsias (WEISS; MOULDER, 1984, YU; WALKER, 2003), foram utilizadas na segunda etapa do experimento, quando se realizou o isolamento das riquetsias e as infestações com os carrapatos oriundo dos cães. Os animais com peso corporal aproximado de 500g procedentes do biotério do Instituto Butantan (São Paulo, SP) e de um biotério comercial (São Paulo, SP) foram mantidos individualmente em caixas plásticas apropriadas, onde receberam ração comercial e água *ad libitum*. Os parâmetros biológicos de saúde desses animais foram baseados em Hillyer e Quesenberry (1997).

Todos os animais utilizados neste experimento foram tratados de acordo com os princípios preconizados pela Comissão de Bioética da FMVZ / USP, de acordo com a aprovação em 17/08/2007 no processo número 913/2006 (anexo A).

### 3.3 Os Ixodídeos

#### 3.3.1 *Amblyomma aureolatum*

Os carrapatos utilizados pertenciam à primeira geração de uma colônia mantida no Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS / FMVZ / USP) oriunda de uma fêmea ingurgitada coletada em cão na cidade de Mogi das Cruzes (SP). A fêmea foi submetida à análise molecular e verificou ser negativa através da técnica de Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR) utilizando-se os “primers” *ompA* e *gltA*, que amplificam um fragmento do gene de uma proteína de membrana de 190 Kda e do gene citrato sintase, respectivamente. Desta forma, duas colônias foram mantidas através de alimentações experimentais em cobaias infectados e não infectados com *Rickettsia rickettsii*. Os espécimes ingurgitados foram

mantidos em câmaras dessecadoras a  $95\pm 2\%$  de umidade relativa e  $25\pm 1^\circ\text{C}$  de temperatura. Após a ecdise, os carrapatos foram submetidos, novamente, a análise molecular comprovando 100% de prevalência da infecção por *R. rickettsii* nos exemplares da colônia infectada (PINTER, 2004).

### 3.3.2 *Rhipicephalus sanguineus*

Os ixodídeos utilizados pertenciam à quinta geração de uma colônia de *Rhipicephalus sanguineus* estabelecida no Laboratório de Ixodologia (Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária) da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

A colônia originou-se de fêmeas ingurgitadas coletadas de cães errantes no município de Seropédica / RJ (Lat.  $22^\circ 45' \text{S}$ ; Long.  $43^\circ 41' \text{W}$ ; Alt. 33m.) e mantidas em condições controladas de  $27\pm 1^\circ\text{C}$  e mínima de 80%UR. Coelho doméstico (*Oryctolagus cuniculus*) de ambos os sexos, mestiços de Califórnia e Nova Zelândia, foram utilizados como hospedeiro para infestações experimentais de larvas, ninfas e adultos segundo técnica de capuz de orelha descrita por Neitz et al. (1971). No primeiro ano de experimento, a colônia de *R. sanguineus* foi dividida em três e conduzidas paralelamente para que no momento da realização do trabalho possuísse larvas, ninfas e adultos da mesma geração e com, aproximadamente, 20 dias de jejum (SARTOR et al., 1996), a fim de evitar influências intrínsecas ao experimento.

A identificação dos ixodídeos foi feita com base na chave dicotômica de suas características morfológicas (WALKER et al., 2003). Em adição, a identificação taxonômica foi confirmada através do seqüenciamento de DNA de um fragmento de 445 nucleotídeos do gene 16S rRNA mitocondrial, obtido pela técnica de PCR do DNA extraído de exemplares da colônia, segundo protocolo descrito por Mangold et al. (1998). Este fragmento de DNA mostrou-se 99,56% (443/445) de similaridade com a seqüência correspondente de *R. sanguineus* strain 14 16S ribossomal RNA gene (número de acesso: AY883872), disponível no GenBank.

No Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS / FMVZ) da Universidade de São Paulo, exemplares desta colônia foram submetidos à análise molecular da mesma forma que os de *A. aureolatum* a fim de se certificar a ausência de infecção por *Rickettsia* sp.

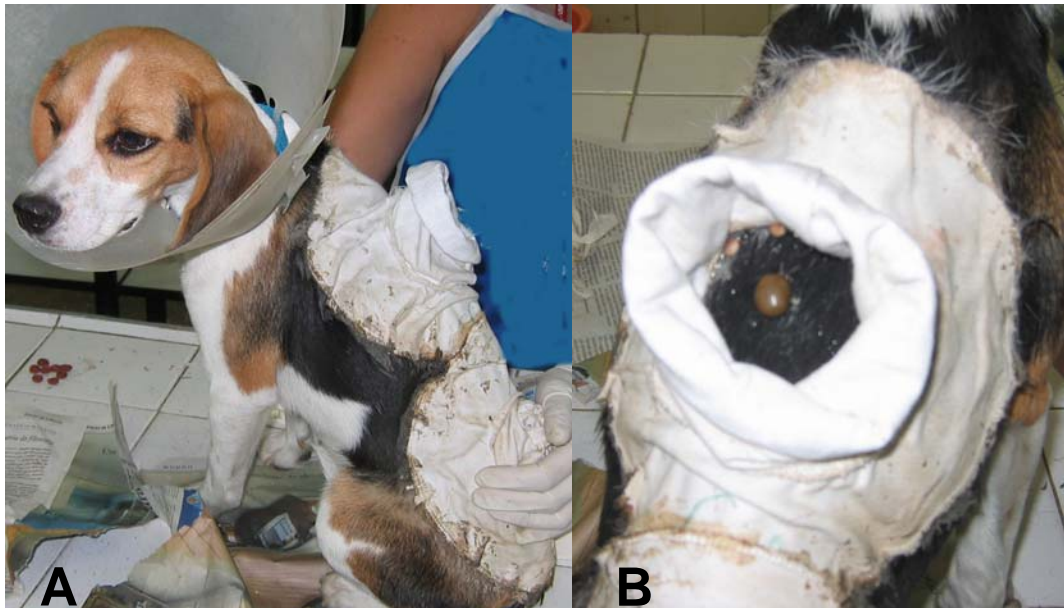
### 3.4 Infestações Experimentais

As infestações dos cães seguiram Pinter et al. (2002), sendo feitas duas câmaras dorsais distintas para cada espécie de carrapato, a fim de se evitar competição interespecífica (Figura 1). As câmaras foram confeccionadas em tecido de algodão branco, após a tricotomia foi usado um adesivo químico (Kamar heat detector adhesive®, Kamar, Steamboat Springs, CO) para mantê-las presas no corpo do animal durante todo o experimento.

Para as infestações de cobaias com carrapatos oriundos dos cães realizadas na segunda etapa do experimento, adaptou-se a técnica anterior e a utilizada por Szabó (1991) conforme visto na figura 2.

### 3.5 Grupos Experimentais

Na realização do presente trabalho, três grupos experimentais foram formados, dois grupos foram constituídos por três cães e o terceiro grupo (controle) com dois animais, sendo um da raça Beagle em cada grupo experimental. Exceto no grupo controle, os demais cães foram desafiados a infecção com *R. rickettsii* através da inoculação via intraperitoneal com 1mL. de inóculo recém descongelado de *R. rickettsii* (grupo 1) ou através da infestação experimental com adultos de *A. aureolatum* sabidamente infectados com *R. rickettsia* (grupo 2).



**Figura 1.** Infestação experimental de carrapatos em cães domésticos, utilizando duas câmaras dorsais (A). No detalhe (B), fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma aureolatum*.



**Figura 2.** Infestação experimental de carrapatos em cobaias (A). No detalhe (B), adultos de *Rhipicephalus sanguineus* no momento da infestação.

### **3.6 Procedimento Experimental para Avaliar a Susceptibilidade dos Cães a Infecção e a Capacidade Vetorial de *Rhipicephalus sanguineus***

No dia 0 (zero), cada cão do grupo 1 foi inoculado, após assepsia local, via intraperitoneal com 1mL de solução (aproximadamente 3.000 células infectadas por *R. rickettsii*) originária da terceira passagem em células Vero da cepa Itaiapu (Mogi das Cruzes/SP) conservada a  $-80^{\circ}\text{C}$  em solução tampão de sucrose-fosfato-glutamato (SPG). Enquanto os cães do grupo 2 foram infestados experimentalmente com cinco casais de *A. aureolatum* comprovadamente infectados com *R. rickettsii*. Os cães pertencentes ao grupo controle e ao grupo infectado através de inoculação (grupo 1) também foram infestados experimentalmente com cinco casais de *A. aureolatum* não infectados por *R. rickettsii*, a fim de se evitar diferenças entre os grupos tratados.

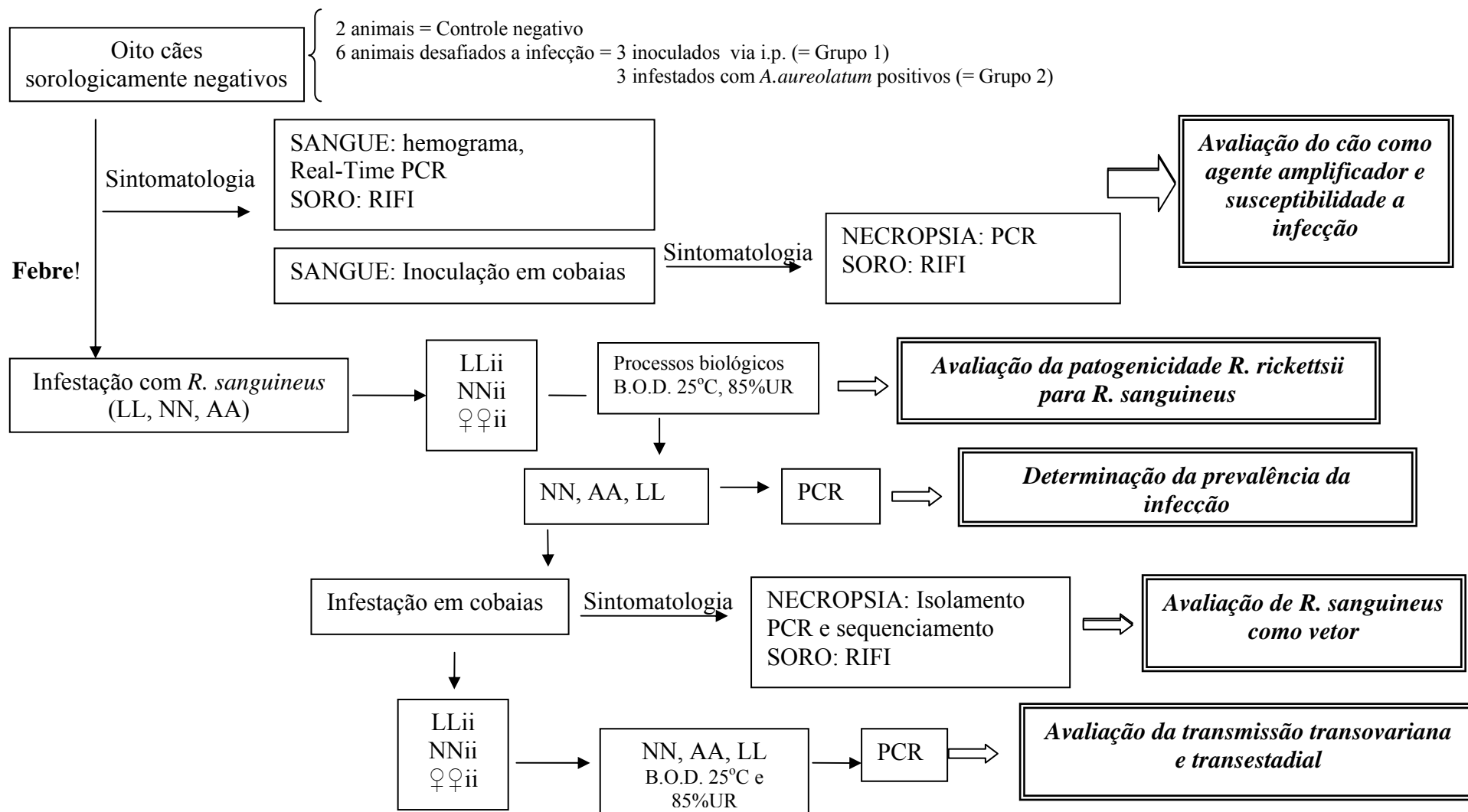
No dia 2, quando os cães do grupo 1 apresentaram febre, todos os animais do experimento foram infestados com 200 larvas, 600 ninfas e 20 casais de *R. sanguineus* livres de patógenos.

A partir do dia 0 do experimento, diariamente, cada um dos cães de cada grupo experimental foi examinado clinicamente em relação ao apetite (ausente/presente), aspecto das fezes (normal ou não), comportamento (prostrado ou não) e sua temperatura retal aferida, por um período de 30 dias. Da mesma forma, as câmaras contendo os ixodídeos foram abertas e verificadas quanto a sua integridade e aos processos de ingurgitamento e desprendimento dos espécimes alimentados.

Do dia 0 ao dia 30, amostras de 2,5 mL de sangue venoso de cada cão foram coletadas a cada 2 dias, visando a realização dos seguintes testes: hemograma completo, sorologia através da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), detecção de DNA de *R. rickettsii* através da técnica de Real-Time PCR e realização de uma prova biológica da infecção através da inoculação do sangue dos cães em cobaias.

Do dia 31 ao 90 após a infecção, a coleta de amostras de sangue para realização do teste sorológico foi realizada, porém com intervalo de sete dias entre as coletas. Na etapa final, do dia 91 ao 180, este procedimento foi realizado a cada 14 dias.

O fluxograma das etapas experimentais está apresentado na figura 3.



**Figura 3.** Fluxograma do procedimento experimental. (LL = larvas; NN=ninfas; AA=adultos; ♀♀ii = fêmeas ingurgitadas).

### 3.6.1 Hemograma

Amostras de 0,8 mL de sangue de cada cão foi acondicionado em tubos de coleta a vácuo contendo EDTA (BD Vacutainer™) e levado ao Laboratório de Hematologia Clínica do Departamento de Clínica Médica da FMVZ-USP para a realização da contagem automática de células sanguíneas no aparelho modelo ABC VET (Horiba ABX Brasil®, São Paulo, Brasil) para obtenção dos valores hematológicos: contagem de hemácias, níveis de hemoglobina, volume globular, contagem de leucócitos e plaquetas (JAIN, 1986).

### 3.6.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Amostras de 0,5 mL de sangue de cada cão e dos cobaias que não adoeceram foram acondicionados em tubos tipo Eppendorf® e centrifugadas para obtenção de soro. Estes foram mantidos a -20°C até a realização dos exames. A confecção do antígeno e as reações foram realizadas utilizando-se lâminas confeccionadas com antígeno bruto de *R. rickettsii* cultivada em células Vero, conforme descrito por Horta et al. (2004) e o conjugado anti-cão IgG e anti-cobaia IgG (Sigma®, St. Louis, USA). Os soros foram diluídos inicialmente para 1:64 e, quando detectado anticorpos nas amostras de cães, foi realizada a titulação. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio de fluorescência (BX60; Olympus®) com aumento de 400x. Uma média geométrica para cada grupo foi obtida ao transformar cada título em logaritmo de base 2. Em seguida a média aritmética foi calculada para cada dia tornando possível a construção de uma curva sorológica durante todo o experimento. O soro não reativo na diluição 1:64 foi considerado negativo (BREITSCHWERDT et al., 1988).

### 3.6.3 Detecção de DNA de *R. rickettsii* nos cães

A extração de DNA a partir do sangue dos cães foi realizada através do kit comercial (DNEasy Tissue Kit®, Qiagen, USA) conforme o protocolo preconizado pelo fabricante. As amostras com DNA extraído foram mantidas a -80°C até a realização da Real-time PCR.

Para detecção de DNA de *R. rickettsii*, as amostras de DNA do sangue dos cães foram processadas individualmente pela técnica de real-time PCR utilizando os “primers” CS-5 (5'-GAGAGAAAATTATATCCAAATGTTGAT-3') e CS-6 (5'-AGGGTCTTCGTGCATTTCTT-3'), para amplificar um fragmento de 147-bp do gene citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia* spp. Uma sonda interna fluorogênica [5' 6-FAM d(CATTGTGCCATCCAGCCTACGGT) BHQ-1 3'] (Integrated DNA Technologies, San Diego, CA, USA) foi usada na reação (Labruna et al. 2004c). A técnica de amplificação utilizando o aparelho 7500 Real Time PCR System (Applied BioSystems®, Foster City, CA, USA) foi realizada com 25 µL por reação (2,5 µL de amostra de DNA de sangue de cada animal, 2,5 µL de solução tampão para PCR (10X), 4µL de dNTP (1,25mM), 1µL MgCl<sub>2</sub> (50mM), 0,1µL de Platinum Taq DNA polymerase (5,000 U/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 1µL de cada “primer” a 10µM, 0,25µL da sonda a 20µM e água miliQ q.s.p.). As condições dos ciclos da Real-time PCR foram descritas por Labruna et al. (2004c). Para cada reação, um controle positivo (300 ng de DNA de *R. parkeri* obtido do cultivo de células Vero) e cinco controles negativos (2,5µL de água miliQ) foram preparados.

### 3.6.4 Detecção de *R. rickettsii* em cobaias

Amostras de 500µL de sangue fresco, coletadas do dia zero ao dia 30 após a infecção, foram inoculadas por via intraperitoneal em cobaias como prova biológica da presença e viabilidade de *Rickettsia* sp. circulante nos cães. As inoculações foram realizadas com réplica, isto é: duas cobaias / dia de coleta / cão. A temperatura retal das cobaias também foi avaliada diariamente. Quando a temperatura ultrapassou os 40°C por três dias consecutivos, a cobaia foi sacrificada com anestésico geral (cloridrato de ketamina) e submetida à necropsia. Fragmentos de baço foram armazenados a -80°C, e posteriormente, a extração de ácidos

nucléicos foi realizada para execução do diagnóstico molecular através da Real-Time PCR da mesma forma que realizado com as amostras de sangue dos cães.

### **3.7 Procedimento Experimental para a Avaliação do Potencial de *R. sanguineus* como Vetor de *R. rickettsii***

#### **3.7.1 Acondicionamento de larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas**

Diariamente, as câmaras de infestação foram abertas para verificação da sua integridade e recuperação dos espécimes ingurgitados. Com os objetivos de se verificar a prevalência da infecção, o potencial de *R. sanguineus* como vetor de *R. rickettsii* a animais de laboratório (cobaias) e as possíveis alterações dos processos biológicos dos carrapatos infectados, larvas e ninfas foram contadas e acondicionadas em frascos de vidros vedados com bucha de algodão na proporção de 20 espécimes/frasco (CANÇADO et al., 2007). As fêmeas ingurgitadas foram pesadas diariamente e presas em decúbito dorsal com fita adesiva em placas de Petri, após a oviposição a massa de ovos também foi pesada. Todos os exemplares de *R. sanguineus* foram mantidos em estufa tipo B.O.D. a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $80\pm 5\%\text{UR}$  para a acompanhamento dos processos de ecdise e eclosão larval.

As fêmeas ingurgitadas de *A. aureolatum* foram mantidas em câmara dessecadora ( $>95\%\text{UR}$ ) em temperatura ambiente para dar continuidade à colônia do Laboratório de Doenças Parasitárias (VPS/FMVZ-USP).

#### **3.7.2 Determinação da prevalência da infecção em *R. sanguineus***

##### **a) Teste de hemolinfa**

Todos os machos de *R. sanguineus* recuperados nos cães tiveram a porção distal de uma das patas cortada. Assim, uma ou duas gotas de hemolinfa obtidas foram despejadas em lâmina de vidro limpa e desengordurada. O material foi fixado ao calor e corado pelo método de Gimenez (BURGDORFER, 1970). As lâminas foram, posteriormente, examinadas em microscópio óptico no aumento de 1200x a fim de se visualizar estruturas coradas com características morfológicas semelhantes à *Rickettsia* sp.

##### **b) Diagnóstico Molecular**

A prevalência da infecção em larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* oriundos de carrapatos alimentados nos cães dos grupos 1 e 2 foi obtida através de diagnóstico molecular após o cálculo do “n” amostral com 95% de confiança na verificação da prevalência da infecção na população, segundo Thrusfield (2004). O cálculo considerou o grupo experimental, cada estágio de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto) e o dia de recuperação das larvas e ninfas ingurgitadas. Para determinar o número de larvas foi escolhido o dia modal de recuperação das fêmeas ingurgitadas nos cães. O tamanho da amostra está apresentado na tabela 1 abaixo.

A extração do ácido nucléico dos espécimes de *R. sanguineus* foi feita aproximadamente 25 dias após a ecdise / eclosão. A extração de DNA das larvas foi realizada em grupos de cinco indivíduos de acordo com o protocolo de fervura (HORTA et al. 2005a), enquanto das ninfas e dos adultos se deu individualmente segundo o protocolo de Chomkzynski (1933), adaptado por Sangioni et al. (2005).

O teste molecular utilizado foi a técnica de PCR com uso de seqüências iniciadoras “primers” do gene citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia* spp. (5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3' e 5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCA GGAT-3') para amplificar um fragmento de 401pb, conforme Labruna et al. (2004c). A reação foi realizada no Mastercyle Gradient, Eppendorf®, segundo Labruna et al. (2004c), contendo em cada reação 2µL (DNA de ninfas e adultos) ou 5µL (DNA de larvas) de amostra de DNA, 5µL de solução tampão para PCR (10X), 8µL de dNTP (1,25mM), 1,5µL MgCl<sub>2</sub>



(50mM), 0,3µL de Platinum Taq DNA polymerase (5,000 U/mL) (Invitrogen, São Paulo, Brasil), 2,5µL de cada “primer” a 10 µM e água mili-Q q.s.p. para volume final de 50 µL. O produto da técnica de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio.

**Tabela 1.** Tamanho da amostra de *Rhipicephalus sanguineus* submetida à análise molecular para determinação da prevalência da infecção de *R. rickettsii* na população segundo Thrusfield (2004).

Cão	<i>R. sanguineus</i> Estágio	Número de indivíduos / dia de recuperação após a infecção (d0)						Total
		d6	d7	d8	d9	d10	d11	
Grupo 1	Larvas			60	60	60		180
	Ninfas	32	32	3	0	0	0	67
	Adultos	28	46	9	2	2	0	87
Grupo 2	Larvas					90	90	180
	Ninfas	3	13	26	20	0	0	62
	Adultos	0	3	44	26	5	3	81
Controle	Larvas				30	30		60
	Ninfas	1	28	1	0	0	0	30
	Adultos	3	25	7	3	2	0	40

### 3.7.3 Avaliação da transmissão de *R. rickettsii* por *R. sanguineus* a cobaias

Os carrapatos utilizados nesta etapa procederam do dia modal de recuperação dos espécimes ingurgitados em cães infectados com *R. rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (grupo 1) e através da infestação de carrapatos infectados (grupo 2) e não infectados (grupo controle) descritos anteriormente. As larvas, ninfas e os adultos de *R. sanguineus* tinham aproximadamente 25 dias de jejum no momento da infestação, conforme utilizado nos estudos de biologia de carrapatos (SARTOR et al., 1996).

Para avaliar a capacidade vetorial das larvas, 12 cobaias (*Cavia porcellus*) foram infestados com 100 larvas de *R. sanguineus* oriundas de fêmeas alimentadas nos cães dos grupos 1 e 2. A capacidade vetorial de ninfas de *R. sanguineus* foi avaliada através da infestação de 16 cobaias com 20 espécimes cada um, sendo quatro animais com carrapatos oriundos de cães do grupo controle. O mesmo procedimento foi realizado para adultos, sendo oito cobaias na proporção de cinco casais de *R. sanguineus*/animal provenientes de cães dos grupos 1 e 2.

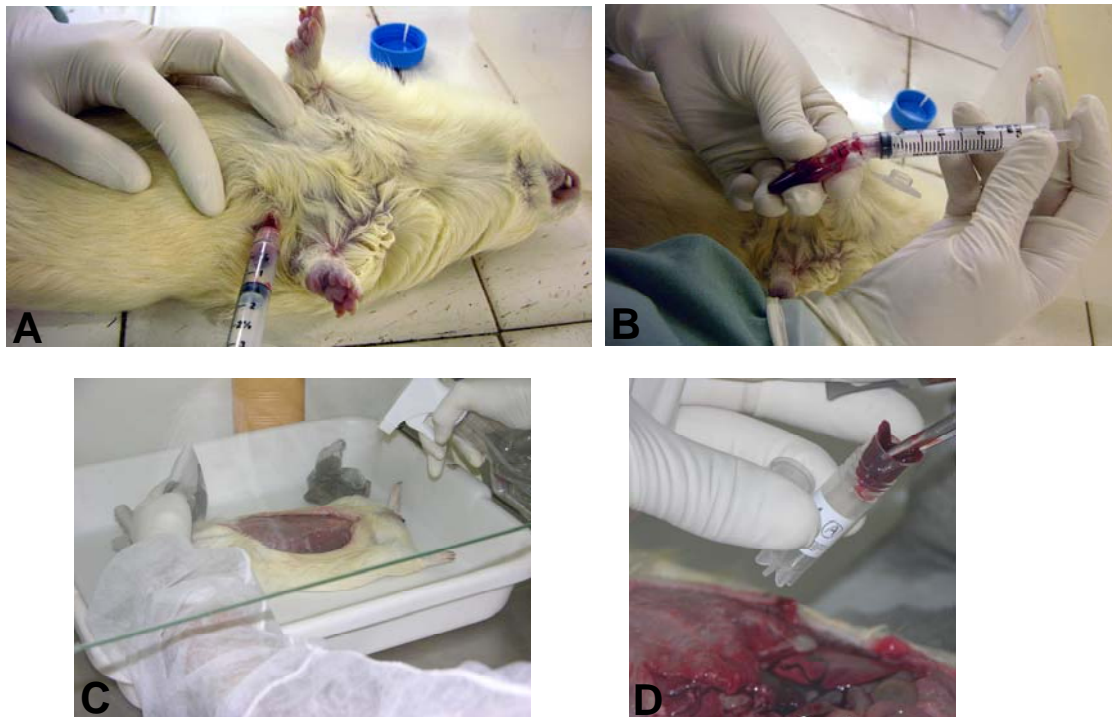
Diariamente, as cobaias foram examinadas quanto ao apetite (ausente/presente) e tiveram a temperatura retal aferida diariamente. Quando foi observada temperatura superior a 40°C por três dias consecutivos, estes animais foram sacrificados, conforme descrito anteriormente, e necropsiados retirando fragmentos de baços os quais foram conservados -80°C (figura 4). No momento da necropsia, amostras de sangue desses animais foram inoculadas em cultivo celular a fim de se realizar o isolamento do agente através da técnica de “shell vial” descrita por Marrero e Raoult (1989) e adaptada por Labruna et al. (2004c). Após a detecção de estruturas morfológicamente compatíveis com riquetsia em cultivo celular, uma amostra do cultivo foi submetida à extração de DNA através do kit comercial (DNEasy Tissue Kit®, Qiagen, USA) e à Reação de Polimerase em Cadeia (PCR). O produto amplificado foi purificado com o kit ExoSAP®-IT (USB-Corporation) e submetido ao sequenciamento genético (modelo ABI Prism 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystems®) utilizando-se o

kit Big Dye 3.1® segundo instruções do fabricante. As seqüências obtidas foram analisadas através do “BLAST Analysis” (ALTSCHUL et al., 1990) e comparadas com outras seqüências disponíveis no GenBank, possibilitando a confirmação do agente.

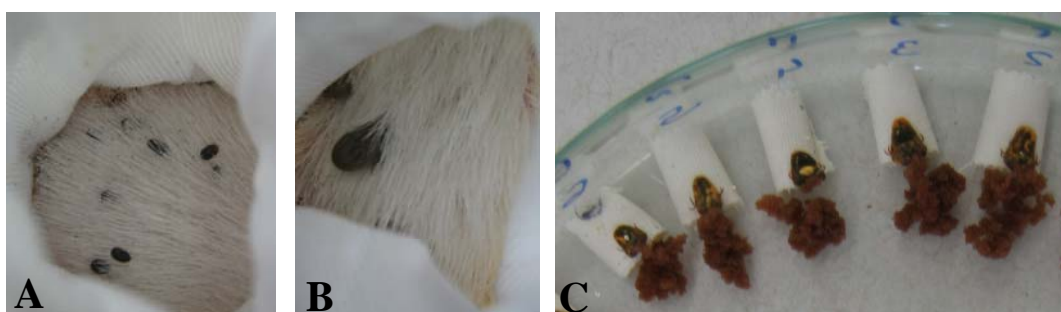
Os animais que não adoeceram após 21 dias da infestação com carrapatos foram sacrificados e amostras de soro foram armazenadas a -20°C para realização do teste sorológico (RIFI) conforme descrito anteriormente.

Os carrapatos desprendidos naturalmente, após a alimentação em cobaias, foram acondicionados em frascos de vidro ou placa de petri e mantidos em estufa tipo B.O.D. a  $24\pm 1^\circ\text{C}$  e  $80\pm 5\%\text{UR}$  para realização da muda ou postura de ovos/eclosão larval (figura 5). Após aproximadamente 25 dias de muda/eclosão os exemplares foram submetidos ao diagnóstico molecular com o objetivo de verificar a manutenção do agente através das transmissões trans-estadial e transovariana. Os protocolos de extração e conservação de DNA e de realização da PCR foram os mesmos utilizados para os carrapatos oriundos das infestações em cães.

O fluxograma desta etapa experimental está apresentado na Figura 3.



**Figura 4.** Sacrifício de uma cobaia (A) e, posterior, coleta de sangue para isolamento do agente (B). Em condições de segura, realização da necropsia do animal (C) e coleta de fragmento do baço (D).



**Figura 5.** Ninfas (A) e fêmeas ingurgitadas (B) de *Rhipicephalus sanguineus* na câmara de infestação em cobaias. Fêmeas ingurgitadas de *R. sanguineus* fazendo postura na placa de Petri em condições controladas(C).

### 3.7.4 Avaliação dos parâmetros biológicos de *R. sanguineus* alimentados em cães infectados e não infectados por *R. rickettsii*

Os parâmetros biológicos dos carrapatos oriundos dos cães infectados com *R. rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (grupo 1) e através da infestação de carrapatos infectados (grupo 2) foram observados e comparados com o do grupo controle com o objetivo de avaliar os efeitos patogênicos da infecção por *R. rickettsii* na população de *R. sanguineus*. Durante o processo de muda e oviposição, os carrapatos alimentados nos cães infectados (grupos 1 e 2) e não infectados (grupo controle) foram acompanhados diariamente para observação dos seguintes parâmetros:

- Período parasitário (dias): determinado como aquele compreendido desde o dia da infestação até o dia de desprendimento de cada fêmea.
- Percentuais de recuperação de espécimes ingurgitados e de ecdise, períodos de pré-postura e de incubação dos ovos (dias), conforme definições de Bellato e Daemon (1997a,b).
- Percentual de fêmeas férteis: relação do número de fêmeas que originaram larvas em relação ao total de fêmeas infestadas por cão.
- Índices de Eficiência Reprodutiva e Nutricional, segundo Bennet (1974). Para tais foram calculados ainda os pesos das fêmeas ingurgitadas e das massas de ovos (mg).

A comparação estatística dos parâmetros foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) ou Qui-Quadrado, ressalvado os casos de distribuição não normal. Nestes casos, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (SAMPAIO, 2002). As médias foram consideradas significativamente distintas quando  $P < 0,05$ .

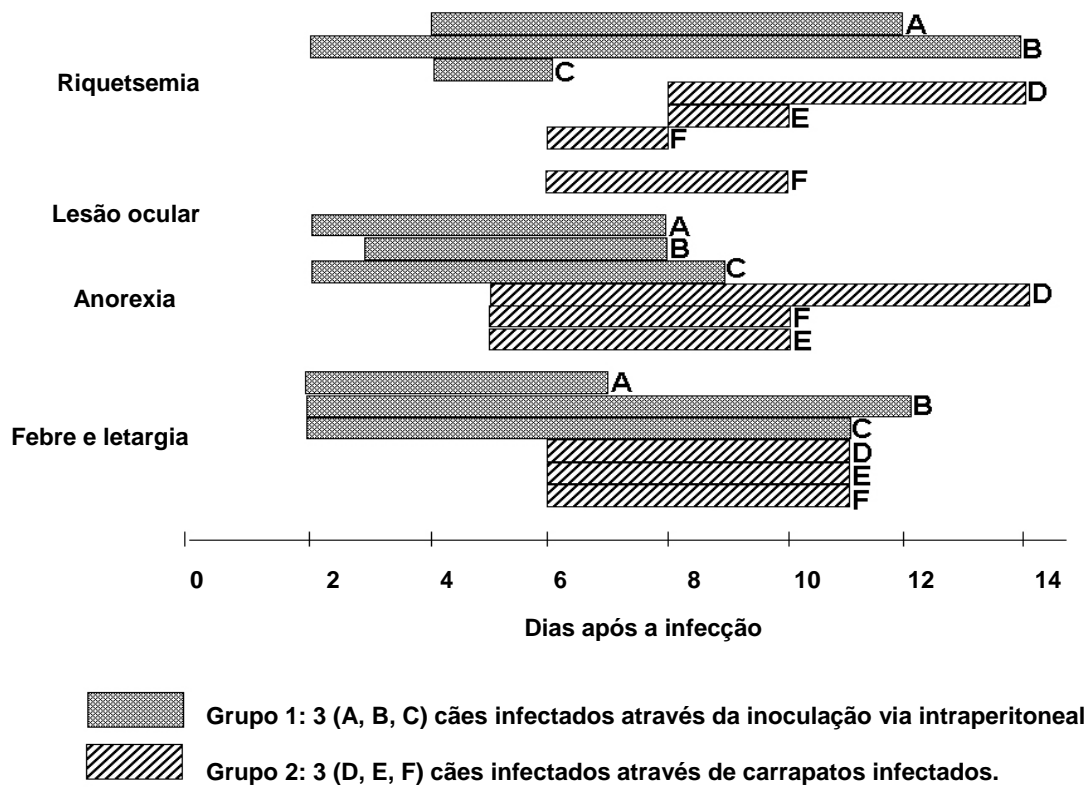
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Avaliar a Susceptibilidade dos Cães a Infecção por *R. rickettsii*

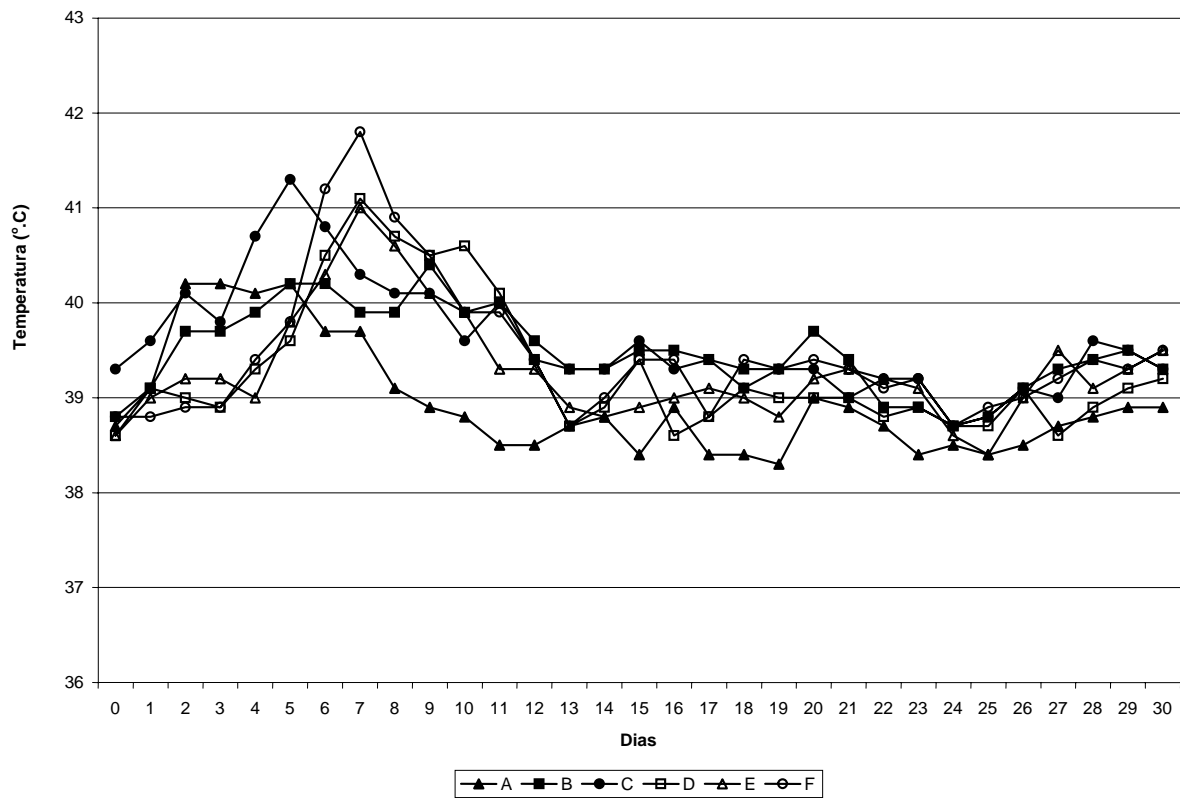
Durante todo o experimento, os cães do grupo controle não apresentaram sinais da infecção por *R. rickettsii*, isto é, não apresentaram alterações clínicas, hematológicas nem foi detectado DNA de *Rickettsia* sp. ou anticorpos reativos no sangue/soro. Enquanto que os cães que foram desafiados a infecção com *R. rickettsii* através da inoculação via intraperitoneal (grupo 1) ou através da infestação com carrapatos (grupo 2) desenvolveram sinais da infecção.

Alterações comportamentais como letargia e redução/ ausência de apetite nos cães grupos 1 e 2 foram verificadas nos períodos em que os animais apresentaram febre e riquetsemia segundo diagnóstico molecular (Figura 6). A temperatura retal excedeu a 39,5°C nos dois grupos desafiados a infecção, mas apenas no grupo 1 este quadro perdurou mais de seis dias (Figura 7). Todos os animais submetidos à infecção tiveram a temperatura retal aferida superior a 40°C por no mínimo dois dias consecutivos. Os cães do grupo 1 apresentaram febre já no segundo dia após a infecção mantendo-se assim até o sétimo, 11º e 12º dias. Neste mesmo período, os animais tiveram apetite reduzido ou ausente. No grupo 2, observou-se redução ou ausência de apetite do quinto dia até o 10º e 14º dias. Estes animais apresentaram febre do quinto ao 11º dia. Os cães infectados apresentaram um curto período de riquetsemia, exceto um único animal do grupo 1 (animal B) com 13 dias de acordo com a técnica de Real-Time PCR. Observou-se que a inoculação do sangue dos cães em cobaias comprovou o período de riquetsemia desses animais e a viabilidade da riquetsia.

Apenas um cão apresentou alterações oftálmicas entre o sexto e décimo dia após a infecção, sendo estas: conjuntivite e blefarite bilateral.

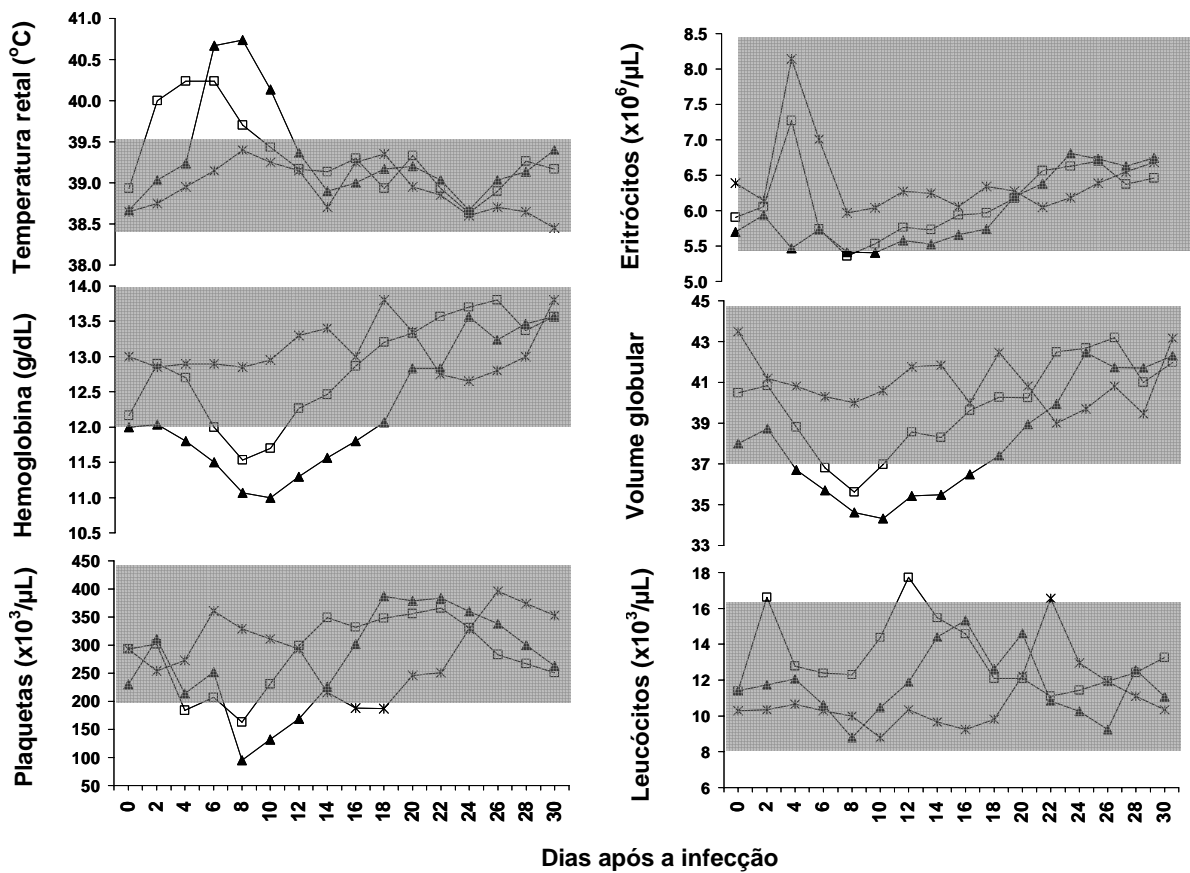


**Figura 6.** Aspectos clínicos e de riquetsemia de cães infectados experimentalmente com *Rickettsia rickettsii* (d=0) através de inoculação via intraperitoneal (grupo1: animais A, B e C) e de infestação experimental de carrapatos infectados carrapatos infectados (grupo 2: animais D, E e F).



**Figura 7.** Valores da temperatura retal aferida em cães infectados experimentalmente com *Rickettsia rickettsii* (d=0) através de inoculação intraperitoneal (grupo 1 = animais A, B e C) e de infestação experimental de carrapatos infectados s (grupo 2 = animais D, E e F).

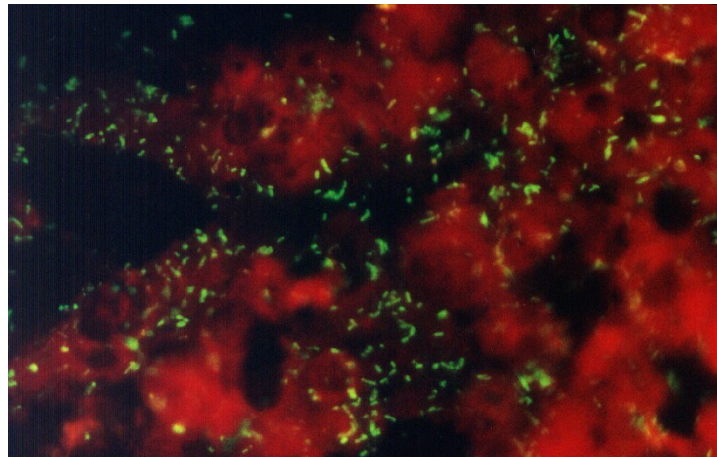
A principal alteração hematológica observada nos cães foi a trombocitopenia. Em dois dos cães do grupo 1, observou-se redução no número de plaquetas do quarto ao 10º dia, no outro animal esta alteração foi verificada somente no 10º dia. Os cães do grupo 2 apresentaram valores abaixo dos de referência do oitavo ao 12º de experimento. A diminuição no número de eritrócitos, volume globular e concentração de hemoglobina foi mais evidente nos cães do grupo 2 entre o dia oito e 12 após a infestação. Os valores médios encontrados nos exames hematológicos dos cães infectados (grupos 1 e 2) e dos cães não infectados (grupo controle) estão apresentados na Figura 8.



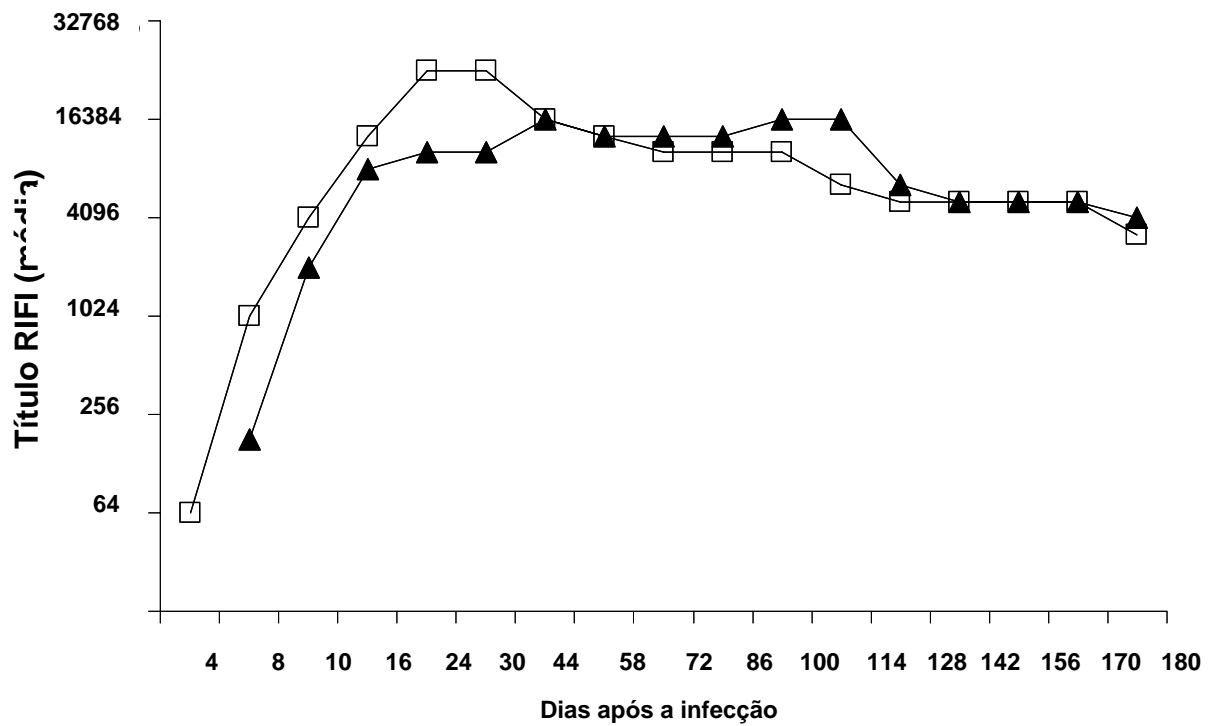
**Figura 8.** Valores médios da temperatura retal e dos exames hematológicos dos cães infectados experimentalmente com *Rickettsia rickettsii* (d=0) através de inoculação via intraperitoneal (grupo 1 = □—□), através da infestação experimental de carrapatos infectados (grupo 2 = (▲—▲) e do grupo não infectado (grupo controle = x—x). A faixa cinza indica valores de referência para cães.



Os cães do grupo 1 apresentaram sorologia positiva quatro dias após a inoculação enquanto os cães do grupo 2 foram soropositivos no oitavo e décimo dias após a infestação com carrapatos infectados (figura 10). Um cão (animal C) do grupo 1 apresentou título de 1:65536 no 24º dia após a infecção. O maior título observado nos cães do grupo 2 foi de 1:32768. O pico foi verificado nos demais cães deste grupo nos dias 24 e 44, e nos animais do grupo 2 nos dias 16, 72 e 100 após a infecção. Após seis meses, estes cães ainda apresentaram títulos de 1:2048, 1:4096 e 1:8192 (Figura 9). Os títulos obtidos nos exames de todos os animais durante o experimento estão expressos no Anexo B.



**Figura 9** Soro de cão positivo, anti-*Rickettsia rickettsii*, através da Reação de Imunofluorescência Indireta, na diluição de 1/64.



**Figura 10.** Valores médios dos títulos de anticorpos encontrados na reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) em cães infectados experimentalmente com *Rickettsia rickettsii* (d=0) através de inoculação via intraperitoneal (grupo 1 = □—□) e de infestação experimental de carrapatos infectados (grupo 2 = ▲—▲).

#### 4.2 Determinação da Prevalência da Infecção de *R. rickettsii* em *R. sanguineus* Alimentados em Cães Infectados Experimentalmente.

Os machos de *R. sanguineus* foram recuperados, quando as últimas fêmeas ingurgitadas se desprenderam, e levados ao laboratório para a realização do teste de hemolinfa. Porém não foi possível visualizar estruturas morfológicamente semelhantes à *Rickettsia* em nenhuma das lâminas coradas, apenas poucas células foram observadas nas amostras.

Todos os carrapatos alimentados nos cães do grupo controle foram negativos no diagnóstico molecular (PCR).

As 260 larvas de *R. sanguineus* provenientes de fêmeas alimentadas em cães submetidos a infecção (grupos 1 e 2) de *R. rickettsii* foram negativas na técnica de PCR.

Ninfas e adultos de *R. sanguineus* provenientes de larvas e ninfas alimentadas nos cães dos grupos 1 e 2 apresentaram o fragmento de 401pb do gene citrato sintase de *Rickettsia* sp. amplificado na PCR (figura 11). A prevalência da infecção na população de *R. sanguineus* alimentada nos cães dos grupos 1 e 2 estão apresentadas na tabelas 2 (ninfas) e 3 (adultos). A prevalência de ninfas infectadas na população de *R. sanguineus* alimentados em cães infectados foi de 19,4%, enquanto de adultos foi de 36,9%. Observa-se que nos dois estágios de desenvolvimento a maior prevalência de infecção foi obtida no grupo de cães infectados por inoculação via intraperitoneal (grupo 1). Neste grupo, os maiores valores de prevalência da infecção ocorreu em ninfas e adultos oriundos de larvas e ninfas recuperadas nos dias 6 e 7 após a infecção diferente do observado no grupo 2.

**Tabela 2.** Prevalência por dia de recuperação e a prevalência total da infecção em ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* oriundos de larvas alimentadas em cães infectados com *Rickettsia rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1) e de infestação experimental de carrapatos infectados (Grupo 2).

Cão	Dia de recuperação após a infecção (d0)				Prevalência Total
	d6	d7	D8	d9	
<b>Grupo 1</b>	28,1	28,1	3	-	28,4
<b>Grupo 2</b>	0	0	15,4	10	10,3

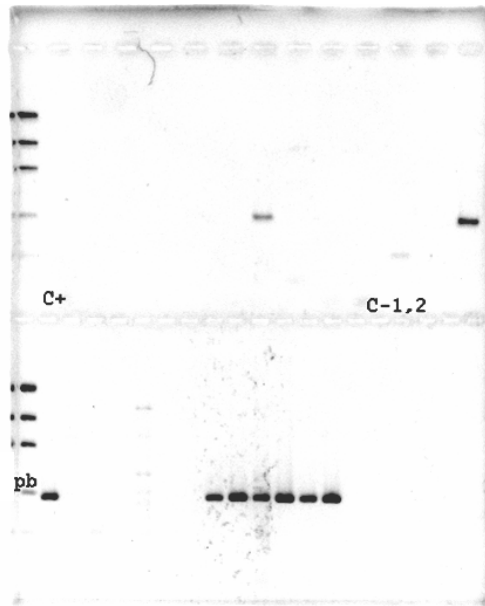
**Tabela 3** Prevalência por dia de recuperação e a prevalência total da infecção em adultos de *Rhipicephalus sanguineus* oriundos de ninfas alimentadas em cães infectados com *Rickettsia rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1) e de infestação experimental de carrapatos infectados (Grupo 2).

Cão	Dia de recuperação após a infecção (d0)						Prevalência Total
	d6	d7	d8	d9	d10	d11	
<b>Grupo 1</b>	28,6	50	22,2	0	0	-	37,9
<b>Grupo 2</b>	-	0	40,9	30,8	20	66,7	35,8

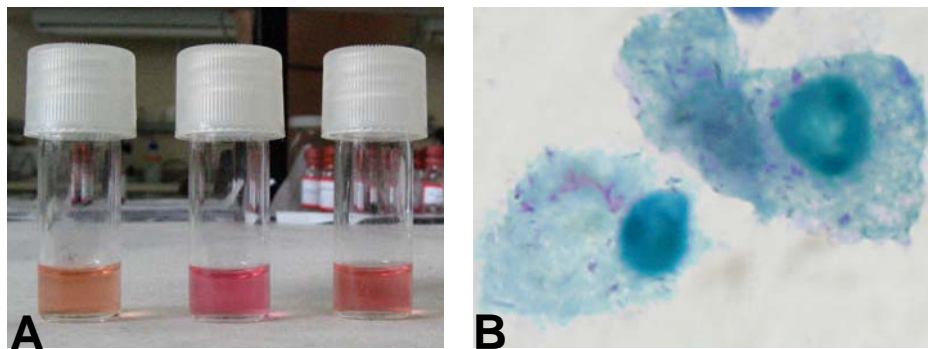
### 4.3 Avaliação da Transmissão de *R. rickettsii* por *R. sanguineus* a Cobaias

Nenhuma das 12 cobaias infestadas experimentalmente com larvas provenientes de fêmeas alimentadas em cães dos grupos 1 e 2 adoeceu durante os 21 dias de observação clínica. Com este achado, 40 fêmeas alimentadas em cães dos grupos 1 e 2, que terminaram a oviposição foram submetidas à extração de DNA e a PCR conformes os protocolos já descritos. Observou-se que 34 (94,4%) das 36 fêmeas foram positivas a reação. O soro desses animais ao serem submetidos à RIFI foram negativos na diluição de 1:64.

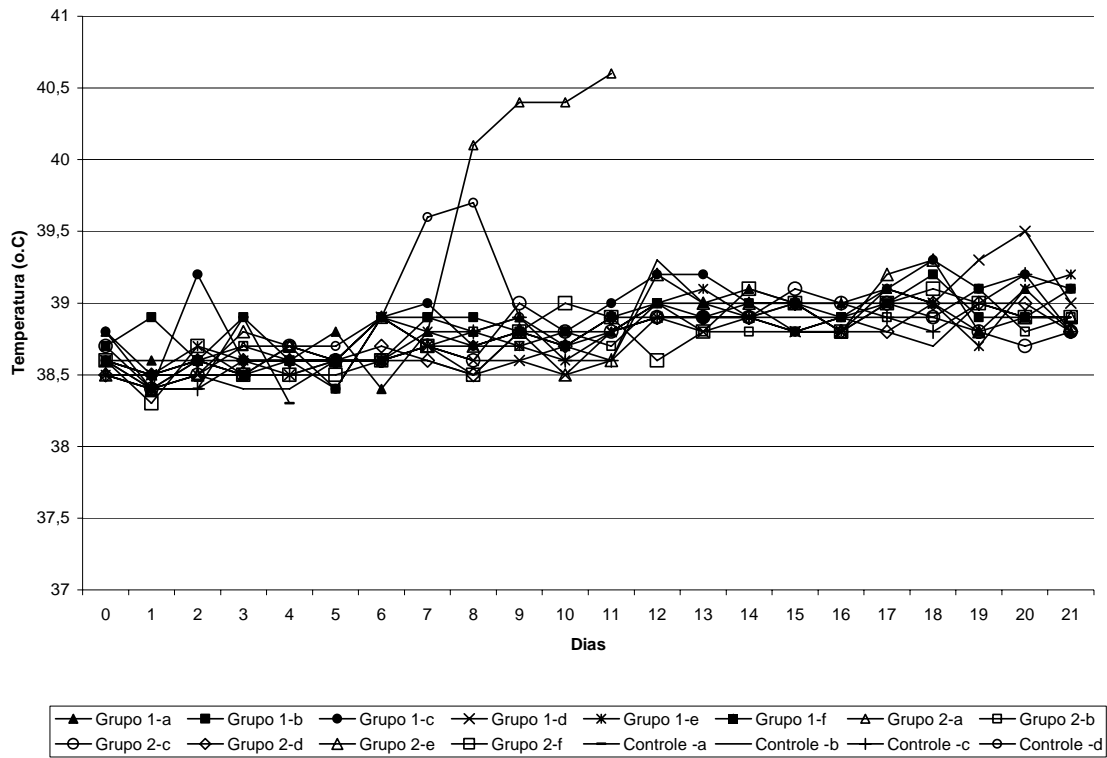
Apenas uma cobaia das 16 infestadas experimentalmente com ninfas de *R. sanguineus* oriundos de larvas alimentadas em cães dos grupos 1 e 2 adoeceu. Este animal recebeu ninfas oriundas de um cão do grupo 2. Oito dias após a infestação, o animal apresentou temperatura superior a 40°C que permaneceu por três dias consecutivos quando, então, foi sacrificado e necropsiado (Figura 13). Uma amostra do baço foi submetida à PCR, observando-se o fragmento de 401pb amplificado após a observação em gel de agarose e eletroforese. Amostras de sangue deste animal foram usadas para isolamento do agente em cultivo de células Vero seguindo a técnica de “shell vial”. No 16º dia do cultivo celular, foi possível observar estruturas intracelulares morfológicamente semelhantes à de *Rickettsia* sp. em lâminas coradas segundo Gimenez (figura 12). Após a extração de DNA do isolado, PCR, sequenciamento genético e análise das seqüências de nucleotídeos foi possível verificar 100% de similaridade com *R. rickettsii* depositada no GenBank. Finalmente, amostras de soro de todos os 16 animais foram submetidos à análise sorológica através da reação de Imunofluorescência indireta, e apenas o animal que adoeceu foi reativo na titulação de 1:64.



**Figura 11.** Gel de agarose 2% com padrão de peso molecular (“Low DNA Mass Ladder”, Invitrogen®), controles positivo (C+), negativos (C- 1,2) e seis amostras com bandas amplificadas.

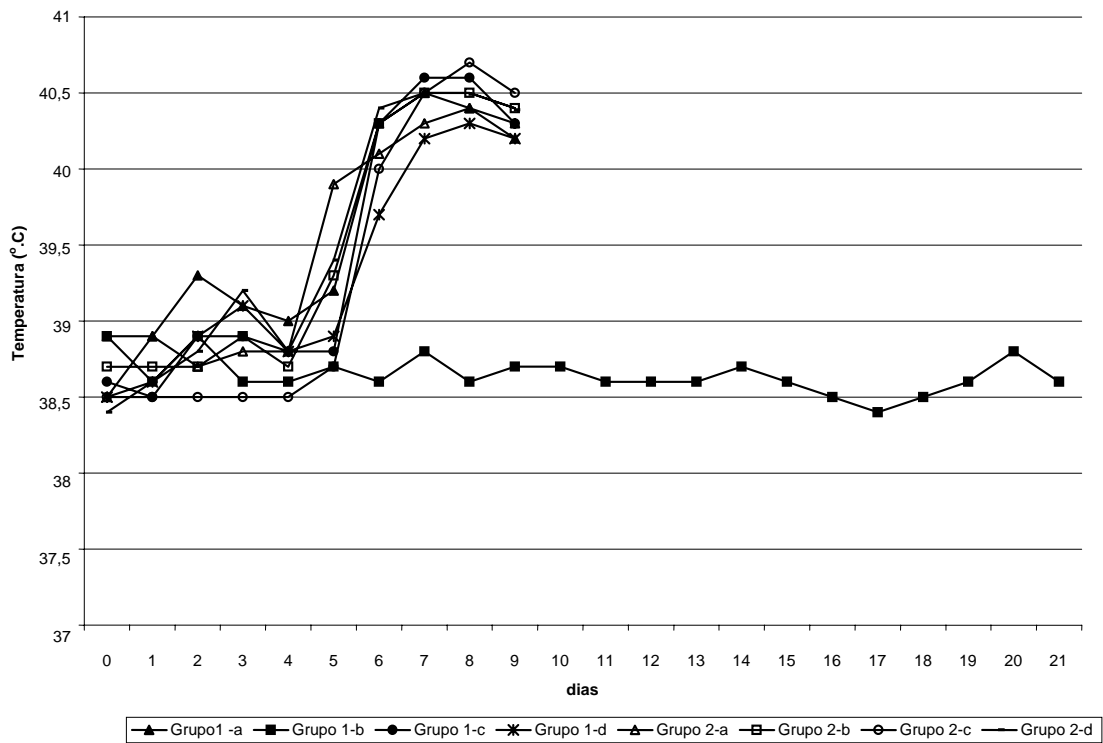


**Figura 12.** Meio de cultivo para isolamento de *Rickettsia rickettsii* segundo a técnica de “shell vial” (A) e estruturas morfológicamente semelhantes a *Rickettsia* sp. em lâmina contendo amostra corada pelo método de Gimenez (B).



**Figura 13.** Valores da temperatura retal aferida em cobaias infestadas experimentalmente com ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* (d=0) oriundas de larvas alimentadas em cães infectados com *Rickettsia rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1 = animais a, b, c, d, e, f) e de infestação experimental de carrapatos infectados (Grupo 2 = animais a,b,c, d, e, f) e nos cães do grupo controle (controle= a, b, c, d).

Sete dos oito animais infestados com adultos de *R. sanguineus* provenientes de ninfas alimentadas em cães do grupo 1 e 2 apresentaram febre do sexto ao nono dia após a infestação quando foram sacrificados e necropsiados (Figura 14). As amostras de cultivo celular foram positivas após 14 dias. Assim como realizado anteriormente, a análise das seqüências de nucleotídeos confirmou a infecção por *R. rickettsii* nos animais que adoeceram. As amostras de soro foram reativas a RIFI na diluição de 1:64, exceto o soro do animal que não adoeceu durante os 21 dias de observação após a infestação com carrapatos.



**Figura 14.** Valores da temperatura retal aferida em cobaias infestadas experimentalmente com adultos *Rhipicephalus sanguineus* (d=0) oriundos de ninfas alimentadas em cães infectados com *Rickettsia rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (grupo 1 = animais a, b, c, e d) e de infestação experimental de carrapatos infectados (grupo 2 = animais a,b,c e d).

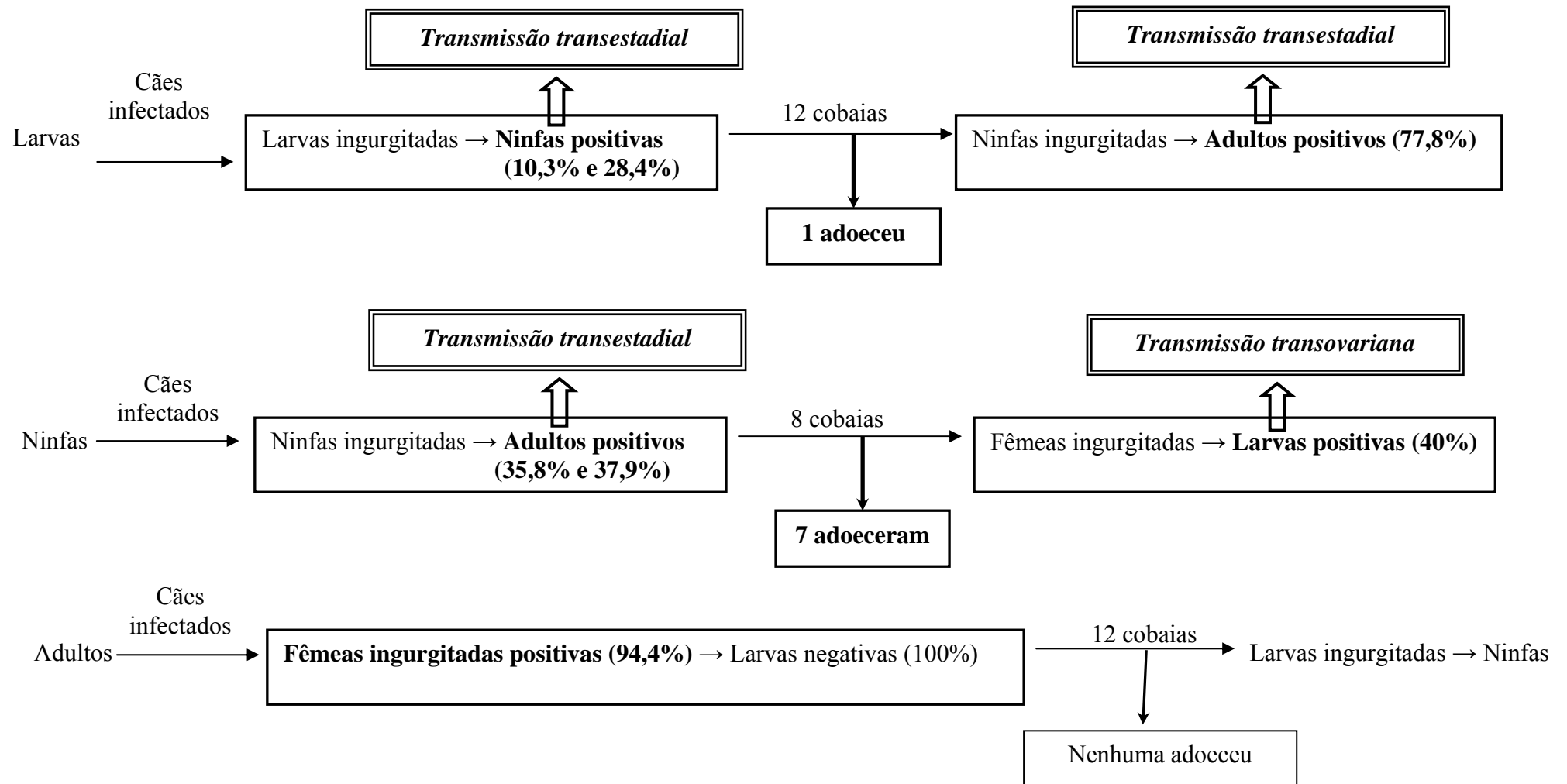
#### **4.4 Avaliação da Manutenção de *R. rickettsii* na População de *R. sanguineus***

Amostras de carrapatos oriundos de cobaias que adoeceram e estavam positivos a infecção por *R. rickettsii* foram submetidas ao diagnóstico molecular (figura 15). Assim, não foi realizada PCR das ninfas oriundas de larvas alimentadas em cobaias, visto que nenhum animal adoeceu e que 100% das larvas que as originaram foram negativas, embora 100% das fêmeas após terminarem a oviposição tenham sido positivas a PCR.

Dezoitos adultos oriundos de ninfas alimentadas em cobaias tiveram DNA extraído e submetidos à PCR. Sete de nove (77,78%) carrapatos oriundos do animal que adoeceu foram positivos no diagnóstico molecular. Este resultado demonstrou a transmissão transtadial de *R. rickettsii* em *R. sanguineus*: sendo que a infecção ocorreu quando as larvas foram alimentadas em cães infectados e se manteve nas ninfas e nos adultos.

Um total de 210 larvas oriundas de adultos alimentados em cobaias que adoeceram com a infestação de *R. sanguineus* foram submetidas ao diagnóstico molecular. Na PCR, 84 (40%) foram positivas. As quatro quenógenas e as larvas (30) referentes ao animal que não adoeceu foram negativas a PCR. A transmissão transovariana de *R. rickettsii* foi constatada quando a infecção se deu na alimentação de ninfas de *R. sanguineus* em cães infectados.





**Figura 15.** Diagrama da manutenção da infecção de *Rickettsia rickettsii* na população de *Rhipicephalus sanguineus* mantida através de infestações experimentais em cães infectados (grupo 1 e 2) e, posteriormente, em cobaias livres de patógenos.

#### **4.5 Avaliação dos Parâmetros Biológicos de *R. sanguineus* Alimentados em Cães Infectados e Não Infectados por *R. rickettsii***

Os parâmetros biológicos referentes às fases parasitária e não-parasitária de fêmeas de *R. sanguineus* ingurgitadas em cães dos grupos 1, 2 e controle estão expostos na tabela 4. Oito fêmeas ingurgitadas em cães infectados através da inoculação via intraperitoneal morreram em menos de 72 horas após a recuperação. Esses carrapatos tinham coloração mais escura que o normal. Os maiores percentuais de recuperação e de fêmeas férteis foram observados nos carrapatos alimentados no grupo 2, assim como o maior período parasitário. O processo de eclosão larval não foi acompanhado diariamente, mas constatou-se que em todos os grupos experimentais foi realizado com sucesso (>90% eclosão larval).

Os dados obtidos nas fases parasitária e não-parasitária dos estágios imaturos de *R. sanguineus* alimentados em cães infectados com *R. rickettsii* (grupos 1 e 2) e não infectados (grupo controle) são apresentados na tabela 5 e 6. Em função da grande quantidade de atividades no laboratório, não foi possível acompanhar diariamente os processos de muda, mas foi possível verificar que: após três dias do início da ecdise ninfal a maioria dos frascos apresentavam mais de 90% de ecdise e que uma semana após o início da ecdise de adulto a maioria também já havia realizado a muda. Apesar de não se ter o dia preciso do final do processo, verificou-se que nenhum dos grupos experimentais se comportou de forma diferente dos demais. Os percentuais de recuperação de larvas e ninfas ingurgitadas nos cães infectados foram inferiores aos do grupo controle. As larvas de *R. sanguineus* alimentadas nos cães do grupo 2 e as ninfas referentes aos cães do grupo 1 retrataram melhor desempenho no processo de muda (maior percentual de ecdise).

**Tabela 4.** Parâmetros biológicos referentes às fases parasitária e não-parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* ingurgitadas em cães infectados com *Rickettsia rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1) e de infestação experimental de carrapatos infectados (Grupo 2) e em cães não infectados (Grupo Controle) e mantidas em estufa tipo B.O.D. a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\%\text{UR}$ .

Parâmetro	Cães do Grupo		Cães infectados	
	Controle	Grupo 1	Grupo 1	Grupo 2
<b>Período Parasitário</b>	$7,7\pm 0,7^b$	$7,6\pm 1,1^{ab}$		$9,4\pm 1,2^a$
<b>% de Recuperação</b>	$77,5^b$	$65^c$		$91,7^a$
<b>% de Fêmeas Férteis</b>	$72,5^b$	$51,7^c$		$91,7^a$
<b>IEN</b>	$68,1\pm 10,9^a$	$66,5\pm 13,8^a$		$72,2\pm 5,2^a$
	(24,7-76,2)	(13,7-76,9)		(60,0-92,7)
<b>IER</b>	$56,3\pm 12,6^a$	$56,6\pm 13^a$		$61,2\pm 4,4^a$
	(18,8-64,5)	(9,6-64,6)		(49,8-77,9)
<b>Peso das Fêmeas ingurgitadas (mg)</b>	$117,6\pm 34,5^a$	$126,8\pm 30,5^a$		$120,7\pm 28,4^a$
	(51,8-197,2)	(71-201,7)		(56,4-192,9)
<b>Peso da massa de ovos (mg)</b>	$68,6\pm 26,8^a$	$75,2\pm 25,4^a$		$73,8\pm 19,7^a$
	(10,8-117,1)	(10,1-123,5)		(33-124,6)
<b>Período de Pré-Postura (dias)</b>	$5,5\pm 0,7^a$	$5,6\pm 2,3^a$		$4,4\pm 1,3^b$
	(5-7)	(3-15)		(2-7)
<b>Período de Incubação (dias)</b>	$28,3\pm 0,7^a$	$29,00\pm 1,5^a$		$27,8\pm 0,8^b$
	(27-30)	(27-34)		(26-29)

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ( $P<0,05$ ).

IEN e IER: Índices de Eficiência Nutricional e Reprodutiva, respectivamente, segundo Bennet (1974).

\*Valores apresentados como: média aritmética  $\pm$  desvio padrão (amplitude entre parênteses).

**Tabela 5.** Parâmetros biológicos referentes às fases parasitária e não-parasitária de larvas de *Rhipicephalus sanguineus* ingurgitadas em cães infectados com *Rickettsia rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1) e de infestação experimental de carrapatos infectados (Grupo 2) e em cães não infectados (Grupo Controle) e mantidas em estufa tipo B.O.D. a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\%\text{UR}$ .

Parâmetro	Grupo Controle	Cães infectados	
		Grupo 1	Grupo 2
Período Parasitário	$5\pm 0,3^a$	$4,6\pm 0,7^b$	$4,5\pm 0,6^b$
% de Recuperação	$89,9^a$	$47,9^b$	$24,2^c$
% de Ecdise	$82,7^{ab}$	$80,6^b$	$85,8^a$

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ( $P<0,05$ ).

\*Valores apresentados como: média aritmética  $\pm$  desvio padrão (amplitude entre parênteses).

**Tabela 6.** Parâmetros biológicos referentes às fases parasitária e não-parasitária de ninfas de *Rhipicephalus sanguineus* ingurgitadas em cães infectados com *Rickettsia rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1) e de infestação experimental de carrapatos infectados (Grupo 2) e em cães não infectados (Grupo Controle) e mantidas em estufa tipo B.O.D. a  $24\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\%\text{UR}$ .

Parâmetro	Grupo Controle	Cães infectados	
		Grupo 1	Grupo 2
Período Parasitário	$5,3\pm 0,5^b$	$6,6\pm 0,8^a$	$4,8\pm 0,7^c$
% de Recuperação	$92^a$	$71,7^b$	$45,3^c$
% de Ecdise	$76,3^a$	$74,2^a$	$68^b$

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ( $P<0,05$ ).

\*Valores apresentados como: média aritmética  $\pm$  desvio padrão (amplitude entre parênteses).

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Avaliação da Susceptibilidade do Cão Doméstico a Infecção

A sintomatologia dos cães infectados com *R. rickettsii* cepa oriunda de área endêmica (Mogi das Cruzes/SP) do Brasil foi semelhante às encontradas nos estudos de “Rocky Mountain Spotted Fever” (RMSF) (BREISCHWERDT et al., 1988; NORMENT; BURGDORFER, 1984; KENNAN et al., 1977a, b). A variação no grau de morbidade pode ser explicada pela dose/via de inoculação ou particularidades das cepas e dos hospedeiros (raça, idade) utilizados nos diferentes trabalhos. No presente trabalho, não foram observados comprometimento neurológico e desenvolvimento de lesões petequiais e esquimóticas relatadas na literatura (GASSER et al., 2001; MIKSZEWSKI; VITE, 2005). Como visto na literatura, a doença não é comumente fatal aos cães mesmo quando estes não são tratados.

A ausência de sinais dermatológicos pode ser explicada pelo número de plaquetas que os animais infectados apresentaram durante o experimento. Embora tenha sido inferior aos de referência, não atingiu os limiares ( $30$  a  $50 \times 10^3$ /uL) que a literatura aponta como suficiente para ocasionar lesões de vasos superficiais. Outro fator relevante é a duração dessas células na circulação sanguínea do animal, proporcionando um quadro clínico e hematológico reversível, sem danos acumulativos.

As diferenças encontradas nos grupos 1 e 2 eram esperadas em razão da concentração e via de inoculação do agente. No grupo 1, um único e grande estímulo a resposta imune do hospedeiro é proporcionado no momento da inoculação via peritoneal. Enquanto que no grupo 2, os cães foram infectados através do processo alimentar do carrapato infectado, necessitando de maior tempo para a transmissão do agente propriamente dita, além de se ter doses inferiores a presente no inóculo (BALASHOV, 2005).

Breitschwerdt et al. (1991) observaram temperatura retal superior a  $39,6^\circ\text{C}$  entre o segundo e quinto dia em todos os cães inoculados via intradérmica como o primeiro sinal da doença e, na maioria dos animais, a temperatura atingiu  $40^\circ\text{C}$ , resultados semelhantes aos dados aqui apresentados. O comportamento e apetite foram alterados a partir do dia 3 até o dia 5 após a inoculação e só foi normalizado no dia 14. No presente trabalho, este longo período de sintomatologia foi verificado apenas no grupo infectado através da alimentação dos carrapatos, isto pode ser explicado pela via de infecção. Neste caso, as particularidades morfofisiológicas dos ixodídeos e seu processo de alimentação têm grande importância no desenvolvimento da doença (SPENCER, 1923). Segundo Burgdorfer (1988) ocorre reativação da riquetsia no organismo do carrapato a partir da sua fixação no hospedeiro, diferente do que ocorre na infecção através da inoculação, quando a riquetsia já se encontra ativada.

Este é o primeiro trabalho buscando detectar a presença de DNA de *R. rickettsii* em sangue de cães infectados através do Real-Time PCR que mostrou ser uma técnica eficaz, visto o adoecimento das cobaias com sangue dos cães no período em que se detectou a presença de DNA de *Rickettsia*. O período de riquetsemia e o início de sua detecção corroboram os encontrados através do isolamento do agente em cultura de células (BREITSCHWERDT et al., 1988; 1991; BUHLES et al., 1975; DAVIS et al., 1981). Assim, confirma-se que os cães tenham um período curto de riquetsias circulantes, embora a patogenicidade permaneça viável.

A trombocitopenia encontrada nos cães infectados com *R. rickettsii* se dá em razão da replicação de riquetsias no endotélio vascular, a reação inflamatória desencadeia processos de

ativação plaquetária e distúrbios vasculares (aumento da permeabilidade e do tempo de coagulação, por exemplo) segundo Davidson et al. (1990). O processo patogênico é semelhante ao observado nos seres humanos acometidos com a doença (WALKER, 1989). Greene et al. (1985) ao buscar diferenças entre RMSF e Erliquioses em cães verificaram que a diminuição na contagem de plaquetas é o achado mais comum nas duas doenças, sendo na RMSF geralmente mais grave. No entanto, deve-se ressaltar que a trombocitopenia presente na Erlichiose Canina se dá por depressão medular que difere da patogênese da infecção por *R. rickettsii* como já descrito. No Brasil, não há estudos comparativos, mas sabe-se que a infecção por *Ehrlichia canis* se caracteriza por trombocitopenia cíclica, leucopenia e até pancitopenia com anemia arregenerativa nos casos crônicos (ALMOSNY et al., 2000). Greene et al. (1985) observaram diferenças na frequência dos casos durante o ano, sendo casos de RMSF nos cães analisados de ocorrência sazonal (abril a setembro); enquanto que os de erlichiose foram diagnosticados durante todo ano. Tais observações seriam de grande valia no entendimento da epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira, buscando associá-las a frequência de espécies de carrapatos vetores. Outros autores relataram anemia em cães inoculados com *R. rickettsii* via peritoneal ou intradérmica (KEENAN et al., 1977a,b; BREITCHWERDT et al., 1988).

Após os seis meses de experimento, foi verificado a presença de títulos altos nos cães dos grupos 1 e 2. Este fato ressalta o papel do cão como sentinela da circulação do agente na natureza, assim como visto em outras infecções veiculadas por carrapatos (SHAW et al., 2001). Keenan et al. (1977a) detectaram anticorpos 12 meses após a infecção experimental com *R. rickettsii*. Deve-se considerar que a soropositividade não representa uma infecção recente, embora altos títulos em animais na natureza possa indicar a ocorrência de re-infecção (SMITH et al., 1983). Tal observação é de grande valia em área endêmica, uma vez que os cães podem ser bons indicadores da prevalência e da localização do foco da riquetsioses (FENG et al., 1979; SANGIONI et al., 2005). É importante ressaltar que os fármacos utilizados no tratamento da RMSF são comumente preconizados no tratamento da Erlichiose Canina inclusive no Brasil. Os cães infectados experimentalmente com *R. rickettsii* e tratados com doxiciclina, tetraciclina, enrofloxacina e clorofenicol apresentaram títulos a reação da Imunofluorescência indireta a partir do dia 10 e, ainda, no dia 75 após a infecção, os mesmos variaram entre 1:84 e 1:1024 (BREITSCHWERDT et al. 1991; 1999). Estes valores foram inferiores a dos animais não tratados, fato que deve ser considerado nos inquéritos sorológicos de áreas endêmicas de carrapatos.

## **5.2 Determinação da Prevalência da Infecção de *R. rickettsii* em *R. sanguineus* Alimentados em Cães Infectados Experimentalmente.**

Os resultados obtidos no presente trabalho diferem dos resultados de Norment e Burgdorfer (1984), onde os cães experimentalmente infectados com *R. rickettsii* não desenvolveram riquetsemia suficiente para infectar mais que 1% de carrapatos *R. sanguineus*. Os autores observaram que os carrapatos positivos obtidos, foram apenas ninfas alimentadas em cães infectados através do parasitismo de *D. andersoni* sabidamente infectados. Enquanto Price (1954) verificou alto percentual de adultos de *D. variabilis* infectados em cães, visto que este é o único estágio que parasita o cão.

As larvas de *R. sanguineus* oriundas de fêmeas alimentadas nos cães infectados apresentaram-se negativas a infecção ainda que 100% das fêmeas que terminaram a oviposição tenham sido positivas. Este fato sugere que a transmissão transovariana não tenha ocorrido em razão do momento em que ocorreu a infecção (BURGDORFER, 1984). Este resultado não permite afirmar que larvas de *R. sanguineus* não adquirem a infecção.

A maior prevalência de infecção obtida no grupo de cães infectados através da inoculação via intraperitoneal (grupo 1) pode ser explicada por uma infecção onde há maior quantidade de riquétsia já ativada (BURGDORFER, 1988). Observa-se também que os carrapatos positivos foram recuperados nos dias de riquetsemia dos cães. Visto o alto percentual de adultos positivos (66,7%) recuperados dos cães do grupo 2 no dia 11, quando apenas um cão apresentava riquetsemia, pode-se sugerir que *R. sanguineus* não adquira a bactéria nas últimas horas de alimentação. No entanto, um experimento direcionado deve ser realizado para averiguar tal afirmação visto que o sangue periférico ingerido pelo carrapato pode apresentar concentração de riquétsia diferente da encontrada no sangue coletado diretamente da veia para o diagnóstico.

A prevalência da infecção de *R. rickettsii* encontrada em ninfas e adultos de *R. sanguineus* aponta para a importância dos cães na epidemiologia da Febre Maculosa, pois são animais de grande proximidade com o homem, assim como *R. sanguineus* e seu comportamento gregário. Observa-se que o cão apresenta riquetsemia suficiente para infectar todos os estágios de desenvolvimento de *R. sanguineus*. Estudos adicionais são necessários para avaliar se a riquetsemia do cão possibilita a infecção de outras espécies de carrapatos, principalmente aquelas de baixa especificidade parasitária, como *A. cajennense*, visto que suas larvas e ninfas são frequentemente encontradas em cães (LABRUNA; PEREIRA, 2001) e por ser o vetor reconhecido da Febre Maculosa Brasileira (GUEDES et al. 2005).

### 5.3 Avaliação da Transmissão de *R. rickettsii* por *R. sanguineus* a Cobaias

Os resultados apresentados demonstram a capacidade de ninfas e adultos de *R. sanguineus* transmitirem *R. rickettsii*. O maior número de cobaias adoeceu após a infestação de adultos (87,4%) do que de ninfas (8,3%) oriundos de *R. sanguineus* alimentados em cães infectados experimentalmente, condizendo com os valores de prevalência da infecção encontrados entre os dois estágios. Embora as ninfas oriundas dos cães do grupo 1 terem maior prevalência da infecção (28,4%), o único animal que adoeceu foi infestado com ninfas provenientes dos cães do grupo 2 (infecção através de infestação experimental de carrapatos infectados), fato que aproxima os resultados deste experimento das condições naturais visto que nos trabalhos de campo a prevalência de carrapatos naturalmente infectados com *R. rickettsii* é baixo (LABRUNA et al., 2004c). A ausência de transmissão de *R. rickettsii* por larvas de *R. sanguineus* se deve a ausência da transmissão transovariana do agente quando o carrapato se infectou quando adulto e não pela incapacidade vetorial do carrapato.

É importante observar que esta infecção no cão pode ser adquirida e transmitida por outra espécie de carrapato, principalmente aquelas de baixa especificidade parasitária (McDADE; NEWHOUSE, 1986). Nos cães de áreas rurais, adultos de *A. aureolatum* são encontrados e comprovados vetores do agente da Febre Maculosa Brasileira (PINTER; LABRUNA, 2006), semelhante ao que ocorre nos EUA, onde apenas os adultos de *Dermacentor variabilis* são encontrados nos cães. Enquanto, larvas e ninfas de *A. cajennense* têm baixa especificidade parasitária sendo encontradas facilmente em cães e seres humanos (LABRUNA; PEREIRA, 2000), fazendo do cão susceptível a infecção por *R. rickettsii* um importante disseminador do agente. Conseqüentemente, a espécie *R. sanguineus* não representa apenas um vetor competente, mas principalmente um disseminador de *R. rickettsii*, visto que seu parasitismo em seres humanos é ocasional. Outro fator é proporcionar a infecção em cães que são animais domésticos de grande contato com seres humanos; aproximando o agente, principalmente, de crianças. O ato de retirar e espremer o carrapato pelo homem já foi demonstrada como uma via de infecção, ocasionando a doença (PADDOCK et al., 2002).

Assim, por se tratar de uma doença que acomete o homem de forma aguda e fatal, um único *R. sanguineus* infectado representa um potencial vetor e deve ser considerado nos estudos de epidemiologia da doença.

#### **5.4 Avaliação da Manutenção de *R. rickettsii* na População de *R. sanguineus***

Os resultados obtidos neste experimento demonstram a ocorrência da transmissão transestadial de *R. rickettsii* entre larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*, importante fator de manutenção do agente na natureza segundo Burgdorfer (1988). Assim como observado por Horta et al. (2006) em *Ixodes loricatus* infectados com *R. bellii*.

A ausência de transmissão transovariana, neste experimento, foi observada quando os adultos foram infectados ao se alimentarem nos cães. Pode se pensar que assim como observado em *D. andersoni* (BURGDORFER, 1984) este processo de transferência de agente para próxima geração seja influenciado pelo momento em que ocorre a infecção, permitindo ou não que haja colonização dos ovários pela riquetsia e que desta maneira, os ovos e futuras larvas sejam infectadas. A replicação e invasão celular ocorrem durante a alimentação das ninfas e o desenvolvimento do adulto por isso o momento da infecção pode determinar o percentual de transmissão transovariana sucedida (BURGDORFER, 1984).

Regendanz e Muniz (1936) observaram a transmissão transestadial quando larvas de *R. sanguineus* foram alimentadas em cobaias infectadas com *R. rickettsii* através de inoculação intraperitoneal. Embora a transmissão transestadial de ninfas para os adultos tenha sido considerada apenas pelo adoecimento de cobaias após a inoculação de uma solução contendo parte do carrapato adulto semi-ingurgitado. Os autores não observaram o processo de alimentação dos adultos nos cães nem a sintomatologia desses hospedeiros. Os ovos e larvas oriundos de fêmeas alimentadas em cães foram inoculados em cobaias, a fim de se averiguar a permanência das riquetsias o que não foi comprovado com o adoecimento dos animais.

Matsumoto et al. (2005) buscaram avaliar *R. sanguineus* como modelo na transmissão de *R. conorii*, alimentando ninfas e adultos em coelhos previamente infectados através de inoculação intravenosa. Os autores observaram que 24% das ninfas ingurgitadas eram positivas e, no entanto, 74% mudaram para adulto a infecção se manteve em apenas 2% dos carrapatos. Enquanto que 90% das fêmeas recuperadas que realizaram postura fértil 90% foi positiva na técnica de PCR.

As diferenças observadas nas taxas de transmissão do agente entre a população de carrapatos podem ser explicadas pelas técnicas utilizadas para o diagnóstico ao longo do tempo de pesquisa, assim como características intrínsecas as espécies envolvidas. É importante observar que esses mecanismos não são suficientes para manter por si só *R. rickettsii* circulante na natureza, visto o comprometimento de sua viabilidade e na fecundidade dos carrapatos a cada geração (McDADE; NEWHOUSE, 1986).

#### **5.5 Avaliação dos Parâmetros Biológicos de *R. sanguineus* Alimentados em Cães Infectados e Não Infectados por *R. rickettsii***

As alterações encontradas nos parâmetros biológicos de *R. sanguineus* alimentados em cães infectados e não infectados (grupo controle) podem representar possíveis efeitos patogênicos a população de carrapatos. Embora os resultados encontrados no presente estudo não tenham prejudicado o desempenho da população, acredita-se que ao longo das gerações a sobrevivência, eclosão larval e sucesso na muda possam ser comprometidos. Burgdorfer (1988) e Niebylski et al. (1999) observaram em infecções experimentais de *D. andersoni* com *R. rickettsii* efeitos patogênicos na colônia a partir da quinta geração infectada. Entre os



estudos com *Rickettsia* sp. verifica-se que tais efeitos são evidenciados ao longo de gerações (BURGDORFER, 1988, NIEBYLSKI et al., 1999). A mortalidade de fêmeas ingurgitadas de *D. andersoni* infectadas e na baixa eclosão larval foi verificada por Burgdorfer e Brinton (1975) em razão da maciça infecção no organismo do carrapato. No estudo com infecção experimental de *R. conorii* em *R. sanguineus*, foi observado efeito deletério na longevidade e no sucesso de muda e fecundidade dos estágios alimentados em coelhos infectados através de inoculações sucessivas após a infestação com os carrapatos, embora não tenha sido observado doença clínica nos animais (MATSUMOTO et al., 2005). Santos et al. (2002) observaram elevada mortalidade (50-70%) das ninfas ingurgitadas e também má formação em 50% dos adultos que realizaram a muda.

Os carrapatos alimentados em cães infectados através do parasitismo de *A. aureolatum* (grupo 2) apresentaram Índices de Eficiência Reprodutiva e Nutricional, assim como parâmetros relacionados a produção de ovos e eclosão larval semelhante ou superiores ao dos carrapatos alimentados em cães não infectados (grupo controle). Este grupo representava condições próximas daquelas encontradas na natureza, sugerindo que tal efeito seja uma particularidade da relação vetor/patógeno. Observação semelhante foi feita por Freitas (2007) ao avaliar os aspectos biológicos de *Haemaphysalis leporispalustris* alimentados em coelhos infectados com *R. rickettsii*. O grupo oriundo de hospedeiros infectados a partir de inoculações teve o desempenho biológico prejudicado se comparado com aqueles carrapatos alimentados em animais não-infectados. Em contraposição, as larvas alimentadas junto a machos previamente infectados, situação próxima à condição natural segundo a autora, apresentaram os parâmetros biológicos das fases parasitária e não-parasitária de larvas, ninfas e adultos superiores ou semelhantes ao do grupo não infectado.

## 6 CONCLUSÕES

A partir do experimento realizado e análise de seus resultados pode-se concluir que:

- Os cães domésticos são susceptíveis a infecção experimental de *R. rickettsii* cepa Taiaçu (Mogi das Cruzes, SP/Brasil).
- As principais alterações verificadas nos cães infectados são: febre, prostração, trombocitopenia, sendo possível ocorrer alteração ocular.
- Cães infectados por *R. rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal apresentam riquetsemia do dia 2 ao 8, enquanto os animais infectados através da infestação experimental de carrapatos infectados apresentam riquetsias circulantes do dia 8 a 11 após a infecção.
- Cães infectados por *R. rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal apresentam anticorpos anti-*R. rickettsii* a partir do dia 4, enquanto que nos cães os animais infectados através da infestação experimental de carrapatos infectados a resposta sorológica é observada após 8 dias da infecção.
- Após seis meses de experimento, os cães ainda apresentam títulos de anticorpos anti-*R. rickettsii* superiores a 2048.
- Larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* adquirem a infecção quando alimentados em cães experimentalmente infectados por *R. rickettsii*.
- Ninfas e adultos de *R. sanguineus* são capazes de transmitir *R. rickettsii*.
- Há transmissão de *R. rickettsii* entre os estágios de larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus*.
- Quando ninfas de *R. sanguineus* são infectadas com *R. rickettsii* em cães, ocorre transmissão transovariana da bactéria.
- Quando adultos de *R. sanguineus* são infectados com *R. rickettsii* em cães, não ocorre transmissão transovariana da bactéria.
- Larvas, ninfas e adultos de *R. sanguineus* alimentados em cães infectados com *R. rickettsii* através da inoculação intraperitoneal apresentam os parâmetros relacionados à fase parasitária alterados.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, D.M.; CAVALCANTE, D.G.; PINTER, A.; GENNARI, S.M.; CAMARGO, M.A.; LABRUNA, M.B. Prevalence of *Ehrlichia canis* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in dogs and *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) Ticks from Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 44, n. 1, p. 126-132, 2007.

ALMOSNY, N.R.P.; MASSARD, C.L.; SILVA, G.V.O.; XAVIER, M.S. Avaliação clínica de cães infectados experimentalmente por *Ehrlichia canis*. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 7, supl., p. 100-110, 2000.

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

ANIGSTEIN, L.; BADER, M. N. Investigation on *Rickettsia* diseases in Texas. I. Epidemiological role of ticks common to the Gulf Coast in relation to local spotted fever. *Texas Reports on Biology and Medicine.*, n.1, p. 105-116, 1943.

BADGER, L.F. Rocky Mountain Spotted Fever: susceptibility of the dog and sheep to the virus. *Public Health Report*, v. 48, p. 791-795, 1933

BALASHOV, Y.S. Bloodsucking insects and ticks and mite, vectors of transmissible infections of humans and domestic animals. *Entomological Review*, v. 85, n. 8, p. 990-1007, 2005.

BELLATO, V.; DAEMON, E. Efeitos de três diferentes temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.6, n.1, p. 21-27, 1997a.

BELLATO, V.; DAEMON, E. Influência da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitaria de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.6, n.1, p. 15-19, 1997b.

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

BREITSCHWERDT, E. B.; DAVIDSON, M.G.; AUCOIN, D.P.; LEVY, M.G.; SZABADOS, N.S.; HEGARTY, B.C.; KUEHNE, A.L.; JAMES, R.L. Efficacy of chloramphenicol, enrofloxacin, and tetracycline for treatment of experimental rocky mountain spotted fever in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 35, n. 11, p. 2375-2381, 1991.

BREITSCHWERDT, E. B.; MEUTEN, D. J.; WALKER, D. H., LEVY; M., KENNEDY; K., KING, M.; CURTIS, B. Canine Rocky Mountain spotted fever: a kennel epizootic. *American Journal of Veterinary Research*, v. 46, n. 10, p. 2124-2128, 1985.

BREITSCHWERDT, E. B.; PAPICH, M.G.; HEGARTY, B.C.; GILGER, B.; HANCOCK, S.I.; DAVIDSON, M.G. Efficacy of doxycycline, azithromycin, or trovafloxacin for treatment of experimental rocky mountain spotted fever in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 43, n. 4, p. 813–821, 1999.

BREITSCHWERDT, E. B.; WALKER, D. H.; LEVY, M. G.; BURGDORFER, W.; CORBETT, W. T.; HURLBERT, S. A.; STEBBINS, M. E.; CURTIS, B. C.; ALLEN, D. A. Clinical, hematologic and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 49, n. 1, p. 70-76, 1988.

BUHLES, W.C.; HUXSOLL, D.L.; RUNCH, G.; KENYON, R.H.; ELISBERG, B.L. Evaluation of primary blood monocyte and boné marrow culture for the isolation of *Rickettsia rickettsii*. *Infectious Immunology*, v. 12, p. 1457-1463, 1975.

BURGDORFER, W. *Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain Spotted Fever and Scrub Typhus*. p. 33-50. In: BURGDORFER, W.; ANAKER, R.L. (ed.) *Rickettsiae and rickettsial diseases*. Academic Press, Inc., New York, 1981.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* v. 19, p. 1010-1014, 1970.

BURGDORFER, W. Vertical Transmission of Spotted Fever Group and Scrub Typhus *Rickettsiae*.p.77-92, 1984.

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

BURGDORFER, W.; Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. p. 33-35, In: WALKER, D.H. (ed) *Biology of Rickettsial Diseases*, v. 2, CRC Press, Boca Raton, FL. 1988.

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

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsiasis en Mexico. *Revista Del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, n.1, p. 3-14, 1947.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Estúdios de Fiebre Manchada em México hallazgo del *Amblyomma cajennense* naturalmente infectado, em Veracruz. *Revista Del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, n.2, p. 75-78, 1946.

BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Una nueva rickettsiosis em México: existênciã de la Fiebre Manchada Americana em los estados de Sinaloa y Sonora. *Revista Del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, n.3, p. 180-211, 1943.

CANÇADO, P.H.D.; PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.H. Influência do comportamento gregário nos processos de muda de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) em condições laboratoriais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 16, n.4, p.205-210, 2007.

CARDOSO, L.D.; FREITAS, R.N; MAFRA, C.L.; NEVES, C.V.B.; FIGUEIRA, F.C.B.; LABRUNA, M.B.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H.; GALVÃO, MA.M. Caracterização de *Rickettsia* spp. circulante em foco silencioso de febre maculosa brasileira no Município de Caratinga, Minas Gerais, Brasil. *Caderno de Saúde Pública*, v. 22, n.3, p.495-501, 2006.

CHOMKZYNSKI, P. A. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, v. 15, n. 3, p. 532-537, 1993

DAVIDSON, M.G.; BREITSCHWERDT, E.B.; WALKER, D.H.; LEVY, M.G.; CARLSON, C.S.; HARDLE, E.M.; GRINDEM, C.A.; NASISSE, M.P. Vascular permeability and coagulation during *Rickettsia rickettsii* infection in dogs. *American Journal of Veterinary Research* v. 51, p. 165-170, 1990.

DAVIS, J.P.C.; WILFERT, C.M.; SEXTON, D.J.; BURGDORFER, W.; CASPER, E.A.; PHILIP, R.N. Serologic comparison of *R. rickettsii* isolated from patients in North Carolina to *R. rickettsii* isolated from patients in Montana. p. 139-147. In: BURGDORFER, W.; ANAKER, R.L. (ed.) *Rickettsiae and rickettsial diseases*. Academic Press, Inc., New York, 1981.

DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.D.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D.; BLAU, D.M.; EREMEEVA, M.E.; DASCH, G.A.; LEVIN, M.L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S.R.; CHEEK, J.E.; SWERDLOW, D.L.; MCQUISTON, J.H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *The New England Journal of Medicine*, v.353, n. 6, p. 587-594, 2005.

DIAS, E. O cão como provável reservatório do vírus da Febre Maculosa Brasileira. *Brasil Médico*, n. 51, p. 1245-1247, 1937.

DIAS, E.; MARTINS, A. V.; RIBEIRO, D. J. Typho exanthematico no Oeste de Minas Geraes. Reações de Weil-Felix positivas obtidas com o soro de comunicantes e de cães. *Brasil Medico*, n. 24, p. 652-655, 1937.

DURAND, P.; CONSEIL, E. Role du chien comme reservoir du virus dans la fiebre boutonneuse. *Archive Institut Pasteur Tunis*, n. 21, p. 239-250, 1932.

FENG, W. C.; MURRAY, E. S.; ROSENBERG, G. E.; SPIELMAN, j. M.; WANER, J. L. Natural infection of dogs on Cope Cod with *Rickettsia rickettsii*. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 20, n. 3, p. 322-325, 1979.

FREITAS, L.H.T. Avaliação da biologia e da infecção por *Rickettsia rickettsii* em *Haemaphysalis leporispalustris* (Acari: Ixodidae) utilizando coelho doméstico como hospedeiro. 2007, 88f., Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica. 2007.

GALVÃO, M.A.M.; BOUYER, D.H.; OLANO, J.P.; LEITE, R.C.; WALKER, D.H. *Rickettsia felis* in *Amblyomma cajennense* ticks, Brazil. In: *International Conference on*

*Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, Book of Abstracts. Ljubljana: MIDA/Institute of Microbiology and Immunology, Medical Faculty; 2002. p. 103.

GASSER, A.M., BIRKENHEUER, A.J., BREITSCHWERDT, E.B. Canine Rocky Mountain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 37, p. 41-48, 2001.

GILOT, B.; LAFORGE, M.L.; PICHOT, J.; RAOULT, D. Relationships the between *Rhipicephalus sanguineus* complex ecology and Mediterranean spotted fever epidemiology in France. *European of Journal Epidemiology*, v. 6, p. 357-362, 1990.

GOMES, L. S. Typho exanthemático de São Paulo. *Brasil Medico*, n. 52, p. 919-922, 1933.  
GREENE, C.E. Rocky Mountain spotted fever. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 191, p. 666-671, 1987.

GREENE, C.E.; BURGDORFER, W.; CAVAGNOLO, R.; PHILIP, R.N.; PEACOCK, M. G. Rocky Mountain spotted fever in dogs and its differentiation from canine ehrlichiosis *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 186, n. 5, p. 465-72, 1985.

GUEDES, E.; LEITE, R.C.; PRATA, M.C.A; PACHECO, R.C.; WALKER, D.H.; LABRUNA, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 100, n.8, p. 841-845, 2005.

HERRERO, C.; PELAZI, C.; ALVAR, J.; MOLINA,R.; VAZQUEZ, J.; CASAL, J.; MARTIN-BOURGON, C. Evidence of the presence of spotted fever group rickettsiae in dogs and dog ticks of the central provinces in Spain. *European Journal of Epidemiology*, v. 8, n. 4, p. 575-579, 1992.

HILLYER, E.V; QUESENBERY, K.E. *Ferrets, rabbits and rodent: clinical medicine and surgery*. W.B. Saunders Company, 1997, 432p.

HORTA, M. C. ; PINTER, A. ; CORTEZ, A. ; SOARES, R. M. ; GENNARI, S. M. ; SCHUMAKER, T. T. S. ; LABRUNA, M. B. *Rickettsia felis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) in *Ctenocephalides felis felis* (Siphonaptera: Pulicidae) in the State of São Paulo, Brazil. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 57, n. 3, p. 321-325, 2005a.

HORTA, M. C.; LABRUNA MB, SANGIONI LA, VIANNA MC, GENNARI SM, GALVÃO MA, MAFRA CL, VIDOTTO O, SCHUMAKER TT, WALKER DH. 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*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 71, n. 1, p. 93-97, 2004.

HORTA, M.C.; PINTER, A.; SCHUMAKER,T.T.S. ; LABRUNA, M.B. Natural Infection, Transovarial transmission, and transstadial survival of *Rickettsia bellii* in the tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Annals New York Academic of Sciences*, v. 1078, p. 285–290, 2006.

HORTA, M.C.; PINTER, A.; SOUZA, C.E.; JOPPERS, A.M.; YAI, L.; LABRUNA, M.B.; SCHUMAKER, T.T.S. *Rickettsia* infection in opossums (*Didelphis* spp) in São Paulo State, Brazil. *4th International Conference on Rickettsiae and Rickettsial Diseases*, p166, Logroño, Espanha, 2005b.

JAIN, N.C. *Shalm's veterinary hematology*. 4 ed. Philadelphia: Lea & Febiger, 1986, 1221p.

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

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C.; HUXSOLL, J. D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K.; CAMPBELL, J. M.; STEPHENSON, E. H. Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Mountain Spotted Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 135, n. 6, p. 911-917, 1977a.

KEENAN, K. P.; BUHLES, W. C.; HUXSOLL, J. D. L.; WILLIAMS, R. G.; HILDEBRANDT, P. K. Studies on the pathogenesis of *Rickettsia rickettsii* in the dog: clinical and clinicopathologic changes of experimental infection. *American Journal of Veterinary Research*, v. 38, n. 6, p. 851-856, 1977b.

LABRUNA, M.B.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. Molecular evidence for a spotted fever group *Rickettsia* species in the tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v.41, p. 533–537, 2004a.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. *Revista Clínica Veterinária*, v.6, p. 24-32, 2001.

LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; POPOV, V.; WALKER, D.H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the state of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 41, p. 1073–1081, 2004b.

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, 2004c.

LABRUNA; M.B; CAMARGO, L.M.A; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondônia, Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 127, p.169–174, 2005.

LEMOS, E. R. S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; FREIRE, N. M. S.; AMORIM, M; GAZETA, G. S. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: Seasonal activity of ticks collected in an endemic area in São Paulo, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina tropical*. v. 30, n. 3, p. 181-185, 1997a.

LEMOS, E. R. S.; MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARÃES, M. A. A.; SANSEVERINO, S. R.; MOURA, A. Primary isolation of spotted

fever group Rickettsiae from *Amblyomma cooperi* collected from *Hydrochaeris hydrochaeris* in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 3 p. 273-275, 1996a.

LEMOS, E.R.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARAES, M. A.; CHAGAS, N. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: serological survey of dogs and horses in an endemic area in the State of Sao Paulo, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, v. 38, n. 6, p. 427-30, 1996b.

LEMOS, E.R.; MACHADO, R. D.; COURA, J. R.; GUIMARAES, M. A.A.; SERRA-FREIE, N.M. Infestation by ticks and detection of antibodies to spotted fever group Rickettsiae in wild animals captured in the state of São Paulo, Brazil: a preliminary report. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 91, n. 6, p. 701-702, 1996c.

LEMOS, E.R.S.; MACHADO, R.D.; PIRES, F.D.A; MACHADO, S.L.; COSTA, L.M.C.; COURA, J.R. Rickettsiae-infected ticks in an endemic area of spotted fever in the State of Minas Gerais, Brazil *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 4, p. 477-481, 1997b.

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

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho endêmico de São Paulo. VII. Pesquisas dos vírus em alguns arthropodos sob condições naturais. *Brasil Médico*, n.8, p. 169-172, 1932b.

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho exanthematico de São Paulo. XI. Novas experiências sobre a transmissão experimental por carrapatos – (*Boophilus microplus* e *Amblyomma cajennense*). *Brasil Medico*, n.8, p. 169-172, 1932c.

MACALUSO, 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, n. 6, p. 809-813, 2002.

MAGNARELLI, L. A.; ANDERSON, J. F.; PHILIP, R. N. Antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs and prevalence of infected ticks of southern Connecticut. *American Journal of Veterinary Research*, v. 43, p. 656-659, 1982.

MANGOLD, A.J.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastrata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, v.84, n.6, p.478-484, 1998.

MANNELLI, A.; MANDOLA, M.L.; PEDRI, P; TRIPOLI, M.; NEBBIA.P. Associations between dogs that were serologically positive for *Rickettsia conorii* relative to the residences of two human cases of Mediterranean spotted fever in Piemonte (Italy). *Preventive Veterinary Medicine*, v. 60, p.13–26, 2003.

MARIOTTE, C. O.; BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente com Fiebre Manchada de las Montaña Rocosas, em Sonora (México). *Revista Del Instituto de Salubridad y Enfermedades Tropicales*, n.4, p. 297-300, 1944.



- MAROLI, M.; KHOURY, C.; FRUSTERI, L.; MANILLA, G. Diffusione della zecca del cane (*Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806) in Italia: un problema di salute pubblica. *Ann. Ist. Super. Sanità*, v. 32, p. 387-397, 1996.
- MARRERO, M.; RAOULT, D. Centrifugation-shell vial technique for rapid detection of Mediterranean spotted fever rickettsia in blood culture. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.40, n.2, p. 197-199, 1989.
- MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Experimental Infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 5, n. 4, p. 363-372, 2005.
- MCDADE, J.E.; NEWHOUSE, V.F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Annual Review of Microbiology*, v. 40, p. 287-309, 1986.
- MIKSZEWSKI, J.S., VITE, C.H. Central nervous system dysfunction associated with Rocky Mountain spotted fever infection in five dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, v. 41, p. 259-66, 2005.
- MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthematico de Minas Gerais. *Brasil Médico*, n. 21, p. 583-584, 1937.
- MOREIRA, J. A.; MAGALHÃES, O. Typho exanthematico em Minas Gerais. *Brasil Medico*, n. 21, p. 465-470, 1935.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F. ; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the kanroo paralysis ticks (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, n. 3, p.215-224, 1971.
- NIEBYLSKI, M.K.; PEACOCK, M.G.; SCHWAN, T.G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *Applied and Experimental Microbiology*, v. 65, n.2, p. 773-778, 1999.
- NORMENT, B.R.; BURGDORFER , W. Susceptibility and reservoir potential of dog to spotted fever-group rickettsiae. *American Journal of Veterinary Research*, v. 45, n. 9, p. 1706-1710, 1984.
- PADDOCK, C. D.; BRENNER, O.; VAID, C.; BOYD, D. B.; BERG, J. M.; JOSEPH, R. J.; ZAKI, R. S.; CHILDS, J. E. Short report: concurrent Rocky Mountain Spotted Fever in a dog and its owner. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 66, n. 2, p. 197-199, 2002.
- 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.
- PHILIP, R.N.; CASPER, E.A. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in Western Montana. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 30, p. 230-238, 1981.

PINTER, A. *Aspectos epidemiológicos da Febre Maculosa em uma área endêmica do município de Mogi das Cruzes (SP) e estudo em laboratório do ciclo de vida do vetor Amblyomma aureolatum (Acari: Ixodidae)*. 2003, 100f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses), Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* 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 New York Academic Sciences*, v.1078, p. 523–529, 2006.

PINTER, A; LABRUNA, M.B. Competência vetorial de *Amblyomma aureolatum* na transmissão da bactéria *Rickettsia rickettsii*. In: XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino Americano de Riquetsioses, Ribeirão Preto, SP, p. 368, 2006.

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

RANDOLPH, S.E.; GERU, L.; NUTTALL, P.A. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitology Today*, v. 12, n. 12, p.472-479, 1996

REGENDANZ, P.; MUNIZ, J. Pesquisas sobre a transmissão de Typho exanthematico de S. Paulo por ixodídeos. *Brasil Médico*, n. 3, p. 45-48, 1936.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2002, 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 265p.

SANGIONI, L.A.; HORTA, M.C.; VIANNA, M.C.; GENNARI, S.M.; SOARES, R.M.; GALVAO, M.A.; SCHUMAKER, T.T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M.B. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. *Emerging Infectious Diseases*, v, 11, n. 2, p. 265-70, 2005.

SANTOS, A.S.BACELLAR, F. SANTOS-SILVA, M. Ultrastructural study of the infection process of *Rickettsia conorii* in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Vector Borne Zoonotic Disease*, v. 2, p. 165-177, 2002.

SARTOR, A.A.; CUNHA, D.W.; DAEMON, E. Aspectos da biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 18060) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório: fase não parasitária de larvas e ninfas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.18, n.1, p. 14-17, 1996.

SEGURA-PORTA,F.; DIESTRE-ORTIN, G.;ORTUNO-ROMERO, A.; SANFELIU-SALA, I.; FONT-CREUS, B.; MUNOZ-SPIM, E.; CASAL-FÁBREGA, J. Prevalence of antibodies

to spotted fever group Rickettsiae in human beings and dogs from an endemic area of Mediterranean Spotted Fever in Catalonia, Spain. *European Journal of Epidemiology*, v. 14, p. 395-398, 1998.

SEXTON, D.J., BURGDORFER, W., THOMAS, L., NORMENT, B.R. Rocky Mountain Spotted Fever in Mississippi: survey for spotted fever antibodies in dogs and for spotted fever group rickettsiae in dog ticks. *American Journal of Epidemiology*, v. 103, p. 192-197, 1976.

SHAW, S. E.; DAY, M. J.; BIRTLES, R. J.; BREITSCHWERDT, E. B. Tick-borne infectious diseases of dogs. *Trends in Parasitology*, v. 17, n. 2, p. 74-80, 2001.

SHEPARD, C. C.; TOPPING, N. H. Rocky Mountain spotted fever. A study of complement fixation in the serum of certain dogs. *Journal of Infectious Diseases*, v. 78, p. 63-68, 1946.

SMITH, R.C.; GORDON, J.C.; GORDON, S.W.; PHILIP, R.N. Rocky Mountain spotted fever in an urban canine population. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 183, n. 12, p. 1451-1453, 1983.

SONENSHINE, D. E. *Biology of ticks*. 2 Vols New York Oxford University Press. 1993. f.465.

SOUZA, C.E.; CALIC, S.B.; CAMARGO, M.G.O.; SAVINI, E.S.M.; SOUZA, S.S.A.L.; LIMA, V.L.C.; NETO, E.J.R.; YOSHINARI, N.H. O papel da capivara *Hydrochaeris hydrochaeris* na cadeia epidemiológica da febre maculosa brasileira. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, suppl., p 203-205, 2004.

SPENCER, R. R.; PARKER, R.R. Infection by means other than tick bites. *Hygienic Lab Bull*, v. 154: p. 60-63, 1930.

SPENCER, R.R. Rocky Mountain Spotted Fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. *Public Health Reports*, v. 38, n. 8, p. 333-339, 1923.

SZABO, M.P.J. *Aspectos da imunologia comparada em cães, hamsters e cobaias a carrapatos Rhipicephalus sanguineus*. 1991. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental Comparada), Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991.

THRUSFIELD, M. *Epidemiologia Veterinária*, Editora Roca, 2ª ed. 2004, 572p.

TRAVASSOS, J. Le chien, reservoir de virus possible du typhus exanthematique de São Paulo. *Comptes rendus des seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales* n. 129, p. 24-26, 1938.

TRAVASSOS, J.; VALLEJO, A.F. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. Possibilidade desses cavídeos representarem o papel de depositários transitórios do vírus na natureza. *Memórias do Instituto Butantan*, v. 15, p. 73-86, 1942b.

TRAVASSOS, J; VALLEJO, A.F. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da Febre Maculosa. *Memórias do Instituto Butantan*, tomo XV, p. 87-90, 1942a.

VALLEJO, A.F. Spotted fever in México. *Memórias do Instituto Butantan*, n. 19, p. 159-180, 1946.

WALKER, A.R.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J.L.; ESTRADA-PENA, A.; HORAK, I.G.; LATIF, A.A.; PEGRAM, R.G.; PRESTON, P.M. 2003 *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species*. . In: Special Publication International Cons. Ticks Tick-Borne Dis-2. Atalanta, Houten, The Netherlands, 221pp.

WALKER, D.H. Rocky Mountain Spotted Fever: a disease in need of microbiological concern. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 2, n.3, p. 227-240, 1989.

WEISS, E.; MOULDER, J.W. The rickettsias and chlamydias. 1984. In: KRIEG, N.R.; Holt, J.G. Editors, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 687–739p.

WIKSWO, M. E.; HU, R.; METZGER, M. E.; EREMEEVA, M. E. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* ticks from California. *Journal of Medical Entomological*, v. 44, n. 1, p. 158-162, 2007.

YU, X. J.; WALKER, D. H. The order rickettsiales. In: DWORKIN, M. *The Prokaryotes: an evolving electronic resource for the microbiology communiy*, 3rd ed. New York: Springer-Verlag, 2003. Disponível em: <<http://link.springer-ny.com/link/service/books/10125>>. Acesso em: 12 de janeiro de 2005.

## CAPÍTULO II

### VIABILIDADE DE ADULTOS DE *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) MANTIDOS EM TRÊS TEMPERATURAS POR DIFERENTES PERÍODOS DE JEJUM<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup>Em 27/11/2007 enviado para publicação no periódico “Experimental and Applied Acarology” como: Piranda, EM; Cançado, PHD; Raia, VA; Almeida, TK; Labruna, MB; Faccini, JLH. The effect of temperature on the free-living females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and its viability to infest a new host.

## RESUMO

PIRANDA, Eliane Mattos Piranda **Viabilidade de adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) mantidos em três temperaturas por diferentes períodos de jejum.** 2008. 16p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

A literatura referente à biologia *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) e a sua importância na transmissão de agentes patogênicos é muita vasta, no entanto é carente de estudos sobre a viabilidade desses indivíduos. A capacidade do parasita infestar o hospedeiro e dar continuidade ao seu ciclo biológico é de grande praticidade para a rotina de atividades experimentais envolvendo a biologia de ixodídeos e pode ser de grande valia para o entendimento da transmissão de agentes patogênicos e para o desenvolvimento de estratégias de controle. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade de adultos de *R. sanguineus* mantidos a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\% \text{UR}$  por três períodos de jejum. Foram analisados os parâmetros relacionados à infestação experimentais em coelhos domésticos e aos processos subsequentes. A partir dos resultados obtidos, conclui-se que adultos de *R. sanguineus* mantidos a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\% \text{UR}$  por três a 20 dias de jejum mantêm a sua viabilidade inalterada e sugere que a observação de parâmetros biológicos em estudos desta espécie de ixodídeo se dê até o momento em que se observe 50% de mortalidade sem comprometimento do estudo.

**Palavra-chave:** *Rhipicephalus sanguineus*, carrapato, viabilidade.

## ABSTRACT

PIRANDA, Eliane Mattos Piranda. **Viability of *Rhipicephalus sanguineus* adults (Acari: Ixodidae) held in three temperatures for different fasting periods.** 2008. 16p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

*Rhipicephalus sanguineus* biology (Latreille, 1806) and its importance to the transmission of pathogenic agents present a wide literature; however, it lacks studies about this species viability. The capacity of the parasite infesting the host and prolonging its biological cycle are of practical importance to the experimental activities routine involving the ixodid biology. It may be also relevant to understand the transmission of pathogenic agents and to develop control strategies. The current study evaluates the viability of *R. sanguineus* adults held at  $18 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $80 \pm 5\%$  RH for three fasting periods. The parameters related to the experimental infestation in domestic rabbits and to the subsequent processes were analyzed. Based on the results, it is concluded that *R. sanguineus* adults held at  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $32 \pm 1^\circ\text{C}$  and  $80 \pm 5\%$  RH from three to twenty fasting days do not change its viability. It suggests that the biological parameters in studies of this ixodid species may be observed when 50% mortality is achieved without compromising the study.

**Keywords:** *Rhipicephalus sanguineus*, ticks, viability.

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie de carrapato *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) possui ampla distribuição geográfica (WALKER et al. 2003), inclusive em todo território brasileiro (RIBEIRO et al., 1996; LABRUNA; PEREIRA, 2001). Este ixodídeo é de grande importância veterinária por transmitir agentes patogênicos aos carnívoros domésticos e silvestres (HOOGSTRAAL, 1985). Relatos de parasitismo desta espécie de carrapato em seres humanos (GODDARD 1989; GUGLIELMIONE et al. 1991; GUGLIELMONE et al. 2003; DANTAS-TORRES et al. 2005) e seu possível envolvimento na transmissão de bioagentes como *Ehrlichia* spp. (PEREZ et al. 1996; UNVER et al. 2001) e *Rickettsia* spp. (BUSTAMANTE 1943; DEMMA et al. 2005; WIKSWO et al. 2007) têm sido investigados. Recentemente, *R. sanguineus* foi incriminado como um possível vetor da Leishmaniose Visceral Canina entre os animais (COUTINHO et al. 2005).

Pesquisas envolvendo parâmetros biológicos de *R. sanguineus*, incluindo a influência de fatores abióticos como temperatura e umidade relativa, vêm sendo realizadas desde a década de 60 (SWEATMAN 1967; YODER et al. 2006), no entanto, sem relatar a viabilidade desde artrópode e a possibilidade de dar continuidade ao seu ciclo biológico (Quadro 1). Srivastava e Varma (1964) observaram a sobrevivência de machos e fêmeas durante meses, mas relataram apenas a capacidade de adultos com sete dias após ecdise se fixarem e se alimentarem em coelhos. Somente Bastos (1997a) buscou avaliar, em laboratório, a viabilidade de *R. sanguineus* mantidos a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e observou que adultos logo após a ecdise e com até 120 dias de jejum têm a capacidade de se alimentar em coelhos domésticos e de realizar os processos biológicos subseqüentes à infestação.

O conjunto de informações a respeito da viabilidade dos carrapatos em condições de laboratório é de grande praticidade para a rotina de atividades experimentais envolvendo a biologia de ixodídeos, possibilitando melhor direcionamento dos resultados obtidos. Além disso, o conhecimento da viabilidade de *R. sanguineus* pode ser de grande valia para o entendimento da transmissão de agentes patogênicos e para o desenvolvimento de estratégias de controle. Neste contexto, o presente trabalho visa avaliar a viabilidade de adultos de *R. sanguineus*, mantidos em jejum a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  ou  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$  de temperatura constante e umidade relativa de  $80\pm 5\%$ , por diferentes períodos, antes de serem levados a infestar coelhos domésticos em condições experimentais.

Em relação a outras espécies de ixodídeos, a literatura registra poucos dados sobre viabilidade em condições controladas de laboratório. É importante ressaltar que os dados sobre viabilidade complementam aqueles sobre sobrevivência, já que o fato de sobreviverem longos períodos em jejum não representa a real capacidade de dar continuidade ao ciclo biológico, e conseqüentemente, sua importância bioecológica. Bastos (1997a) avaliou a viabilidade de carrapatos *Amblyomma cajennense* mantidos a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e infestados experimentalmente em coelhos domésticos, observando alto poder infestante para larvas de 15 a 60 dias e para ninfas de 15 a 90 dias de idade. Gladney et al. (1970) demonstrou que 1% das larvas de *Amblyomma americanum* com um dia após a ecdise se fixaram e que este percentual aumentou para 70% quando as larvas foram infestadas em cobaias após quatro dias da ecdise. No entanto, os autores não observaram o efeito de jejum prolongado sobre o percentual de recuperação de carrapatos ingurgitados.

Trabalhos passados avaliaram a idade mínima necessária para larvas e ninfas de algumas espécies de ixodídeos se fixarem ao seu hospedeiro e, em sua maioria, não consideraram os processos subseqüentes nos resultados. Em condições naturais, Laranja (1979)



verificou um decréscimo na obtenção de fêmeas a partir de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de idade mais avançada, no entanto, sem comprometer o desempenho reprodutivo das mesmas. Davey (1987) observou que a idade mínima para larvas de *R. (B.) microplus* se fixarem em seu hospedeiro natural é de quatro dias. Gauss e Furlong (2002), ao estudarem o comportamento de larvas infestantes de *R. (B.) microplus* em pastagens de *Brachiara decumbens*, verificaram uma diminuição no número de fêmeas recuperadas a partir dos 45 dias de idade das larvas, alcançando níveis mais baixos aos 60 dias. Sutherst e Bourne (2006) buscaram avaliar os efeitos da dessecação e de baixas temperaturas na viabilidade de ovos e na eclosão larval de *R. (B.) microplus*, mas se restringiram aos dados de percentual de eclosão e de mortalidade, sem avaliar o potencial infestante (viabilidade) dessas larvas. Os autores sugerem que longos períodos de estresse aos ovos podem refletir na sobrevivência dessas larvas.

**Quadro 1.** Dados de literatura sobre percentual de recuperação de larvas, ninfas e fêmeas ingurgitadas e longevidade de larvas, ninfas e adultos de *Rhipicephalus sanguineus* alimentados em coelhos.

Autor	Ano	Condições Laboratoriais	% Recuperação			Longevidade (dias)		
			LLii	NNii	♀♀ii	LL	NN	AA
FELDMAN-MUHSAN	1964	18°C; 90%UR.	*	$\chi=70$	*	78	*	*
SRIVASTAVA & VARMA	1964	25°C; 100%UR.	*	*	*	até 120	*	*
		29°C; 100%UR.	*	*	*	até 60	*	*
		25°C; 100%UR.	*	*	*	*	*	7 meses
PAUL et al.	1970	27±1°C; 70±5%UR.	*	*	*	24-38	36-44	80-93
SARDEY & RAO	1973	28,8; -32°C; 78-82%UR.	*	*	*	5-30	4-18	59-60
		30°C; 50%UR.	*	*	*	*	4-18	59-60
		37°C; 70 e 80%UR.	*	*	*	*	4-5	59-60
		30°C; 50, 70 e 80%UR.	*	*	*	*	4-5	59-60
CUNHA	1978	T°C ambiente	*	*	*	23-92	7-56	42-165
SARTOR et al.	1996	27±1°C; 80±10%UR.	41,45	64,26	78,66	57-61	14-74	58-116
BELLATO & DAEMON	1997ab	18±1°C; 80±10%UR.	*	$\chi=82,4$	$\chi=76,0$	-	$\chi=100,67$	$\chi=2228,5$
		27±1°C; 80±10%UR.	$\chi=66,04$	$\chi=92,2$	$\chi=82,67$	$\chi=50,12$	$\chi=55,92$	$\chi=113,03$
		32±1°C; 80±10%UR.	$\chi=48,22$	$\chi=88,3$	$\chi=85,32$	$\chi=48,63$	$\chi=40,85$	$\chi=78,63$

LLiii= larvas ingurgitadas; Nnii= ninfas ingurgitadas; ♀♀ii= fêmeas ingurgitadas

LL= larvas; NN= ninfas; AA= adultos.

$\chi$  = média

\*= não descrito pelo autor

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Local de execução

O experimento foi realizado no Laboratório de Ixodologia e nas dependências da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

### 2.2 Os hospedeiros

Como hospedeiros experimentais foram utilizados coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus* L., 1758) cedidos a título de empréstimo pelo Setor de Cunicultura da UFRRJ. Os animais utilizados eram mestiços (Califórnia X Nova Zelândia) de ambos os sexos, sem contato prévio com carrapatos e produtos acaricidas.

Esses animais foram mantidos no abrigo destinado a coelhos na EPPW O. Neitz em gaiolas individuais, onde receberão ração comercial e água *ad libitum* diariamente. O protocolo de Princípios Éticos em Pesquisa Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foi seguido neste experimento.

### 2.3 Obtenção dos ixodídeos

Uma colônia de *R. sanguineus* foi estabelecida no laboratório a partir de fêmeas ingurgitadas coletadas de cães errantes do campus da UFRRJ. A identificação dos ixodídeos foi feita com base na chave dicotômica de suas características morfológicas (WALKER et al., 2003). Em adição, a identificação taxonômica foi confirmada através do seqüenciamento de DNA de um fragmento de 445 nucleotídeos do gene 16S rRNA mitocondrial, obtido por PCR de DNA extraído de exemplares da colônia, segundo protocolo descrito por MANGOLD et al. (1998). Este fragmento de DNA mostrou-se 99,56% (443/445) de similaridade com a seqüência correspondente de *R. sanguineus* strain 14 16S ribosomal RNA gene (número de acesso: AY883872), disponível no GenBank.

Esta colônia foi mantida em condições controladas de  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\%$  UR e através de infestações experimentais em coelhos domésticos, com exemplares de 20 dias de idade seguindo a proposição de Sartor et al. (1996) e a técnica descrita por Neitz et al. (1971).

### 2.4 Procedimento experimental

Para o presente estudo, cada um dos seis coelhos foi infestado com aproximadamente 900 ninfas obtidas de 250mg de larvas ingurgitadas viáveis. Diariamente, os capuzes foram abertos para o recolhimento dos espécimes ingurgitados. Estes eram pesados e distribuídos em seringas plásticas fechadas com bucha de algodão, cada uma contendo aproximadamente 450mg de ninfas ingurgitadas. As seringas foram mantidas em três estufas tipo B.O.D., sendo cada uma ajustada para uma das seguintes temperaturas:  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Todas as três estufas forneciam umidade relativa de  $80\pm 5\%$ . Nas estufas, foram observados o início da ecdise e sexagem dos adultos. Destas ninfas ingurgitadas, foram obtidos carrapatos adultos nas três condições distintas de temperatura, que foram utilizados para infestar coelhos sem infestações prévias, na proporção de 14 casais de *R. sanguineus* para cada coelho totalizando 84 casais de carrapatos.

Antes de serem levados a infestar os novos hospedeiros, os carrapatos adultos originários de cada uma das três temperaturas de incubação ( $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ ,  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), foram deixados a três diferentes períodos de jejum: três dias após a ecdise, 20 dias após a ecdise, e um terceiro período de jejum determinado como o número de dias transcorridos para

que 50% dos adultos morressem dentro da incubadora. Para cada tratamento, foram utilizados seis coelhos, totalizando 54 animais infestados.

O processo de ingurgitamento sobre os coelhos foi observado diariamente. As fêmeas ingurgitadas naturalmente desprendidas dos coelhos foram coletadas, limpas com uma solução de hipoclorito a 1%, pesadas e acondicionadas em placas de Petri com auxílio de fita adesiva. As fêmeas ingurgitadas de todos os tratamentos foram mantidas a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\%$ UR para observação dos parâmetros relacionados à oviposição e a eclosão larval, garantindo assim a não interferência do tratamento aplicado no estágio não alimentado. A cada três dias, a postura de cada fêmea foi pesada e acondicionada em tubo de ensaios vedados com bucha de algodão para observação do processo de eclosão larval nas mesmas condições descritas para as fêmeas.

### **2.5. Parâmetros avaliados**

Os parâmetros biológicos observados foram: percentual de recuperação de fêmeas ingurgitadas, período de postura, percentual de eclosão larval definidos por Bellato e Daemon (1997a,b), e o Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) definido por Bennet (1974). O período parasitário foi determinado como aquele compreendido desde o dia da infestação até o dia de desprendimento de cada fêmea.

Para melhor expressar a viabilidade dos espécimes neste estudo, fez-se necessário obter o percentual de fêmeas que originaram larvas em relação ao total de fêmeas infestadas por coelho e o número de larvas obtidas a partir de cada infestação de adultos. Este último foi calculado com base no peso total da postura de cada fêmea e seu percentual de eclosão larval, segundo Coelho (1993).

### **2.6. Análise estatística**

A comparação estatística dos parâmetros supracitados foi realizada por Análise de Variância (ANOVA) e Teste t, ressalvado os casos de distribuição não normal. Nestes casos, foi utilizado o teste não paramétrico Kruskal-Wallis (SAMPAIO, 2002). As médias foram consideradas significativamente distintas quando  $P < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS

A temperatura de  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  retardou o processo de ecdise e a mortalidade dos carrapatos adultos em jejum, que alcançou 50% aos 136 dias do início da ecdise. Este período de 136 dias de jejum foi adotado neste grupo porque correspondeu ao número de dias em que 50% dos adultos morreram por inanição. No momento da infestação, observou-se que a maioria dos adultos mantidos a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  com apenas três dias de jejum movimentava-se lentamente, só se fixando ao hospedeiro após 72 horas de exposição. A incubação por 20 dias a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  gerou um número significativamente maior de fêmeas férteis, as quais geraram um maior número de larvas, quando comparadas com as fêmeas dos outros dois grupos mantidos a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$  (três e 136 dias em jejum) (Tabela 1). A similaridade do IER mostra que a relação entre o peso da fêmea ingurgitada e a sua produção de massa de ovos não foi influenciada pelos períodos de jejum a  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ .

A Tabela 2 apresenta os parâmetros referentes às infestações de adultos de *R. sanguineus* mantidos a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\% \text{UR}$ . Pode-se verificar que os adultos infestados com três e 20 dias de jejum não tiveram diferença significativa na produção de larvas, nem quanto ao percentual de recuperação de fêmeas ingurgitadas e o período parasitário. Por outro lado, infestações com adultos de 128 dias em jejum, mantidos a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$ , resultaram em baixo percentual de recuperação de fêmeas gerando poucas larvas eclodidas.

A Tabela 3 apresenta os parâmetros referentes às infestações de adultos de *R. sanguineus* mantidos a  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $80\pm 5\% \text{UR}$ . Observa-se que os percentuais de fêmeas de *R. sanguineus* que originaram larvas e o número de larvas obtidas não diferiram significativamente entre as infestações realizadas com adultos de três e 20 dias de jejum, embora o período de postura, IER e o percentual de eclosão tenham sido diferentes significativamente. Já as infestações dos coelhos com adultos mantidos por 94 dias de jejum a  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$  (período correspondente ao número de dias em jejum, em que 50% dos adultos morreram por inanição) não obtiveram sucesso, demonstrando como a manutenção por longo período de jejum em temperatura elevada influenciou na viabilidade de adultos da espécie. Apenas três fêmeas ingurgitadas foram recuperadas deste tratamento, sendo que nenhuma realizou postura, razão pela qual os parâmetros relacionados a este tratamento não foram analisados estatisticamente.

**Tabela 1.** Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas de *Rhipcephalus sanguineus*. As fêmeas foram mantidas a 18±1°C e 80±5%UR antes da infestação (período em jejum) e a 27±1°C e 80±5%UR para a fase reprodutiva, após se alimentarem em coelhos domésticos (período parasitário).

Parâmetros biológicos	Idade dos carrapatos adultos (número de dias em jejum) antes de serem infestados nos coelhos		
	3	20	136
Nº de fêmeas expostas aos coelhos	84	84	84
Nº de fêmeas recuperadas (%)	48 <sup>b</sup> (57,1)	64 <sup>a</sup> (76,2)	21 <sup>c</sup> (25)
Nº de fêmeas férteis (%)	15 <sup>b</sup> (17,9)	34 <sup>a</sup> (40,5)	13 <sup>b</sup> (15,5)
Período Parasitário (dias)*	12,7±1,9 <sup>a</sup> (9-15)	10,9±2,0 <sup>b</sup> (7-14)	12,0±2,3 <sup>ab</sup> (9-17)
Período Postura (dias)*	14,4±2,8 <sup>a</sup> (9-21)	16,1±4,2 <sup>a</sup> (9-25)	16,9±4,0 <sup>a</sup> (9-23)
IER*	48,1±12,3 <sup>a</sup> (13,4-64,3)	49,9±12,9 <sup>a</sup> (3,8-66,6)	52,8±15,2 <sup>a</sup> (23,6-69,0)
% eclosão* <sup>+</sup>	1,5±1,4 <sup>b</sup> (1-5)	11,8±18,1 <sup>a</sup> (1-70)	7,0±8,6 <sup>ab</sup> (1-25)
Número de larvas por postura fértil*	2,1±6,3 <sup>b</sup> (0-46)	53,8±149,3 <sup>a</sup> (0-950)	10,4±40,9 <sup>b</sup> (0-226)

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ( $P<0,05$ ).

IER: Índice de Eficiência Reprodutiva, segundo Bennet (1974)

\*Valores apresentados como: média aritmética ± desvio padrão (amplitude entre parênteses)

<sup>+</sup> Não inclui as posturas com 0% de eclosão

**Tabela 2.** Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas de *Rhipcephalus sanguineus*. As fêmeas foram mantidas a 27±1°C e 80±5%UR antes da infestação (período em jejum) e a 27±1°C e 80±5%UR para a fase reprodutiva, após se alimentarem em coelhos domésticos (período parasitário).

Parâmetros biológicos	Idade dos carrapatos adultos (número de dias em jejum) antes de serem infestados nos coelhos		
	3	20	128
Nº de fêmeas expostas aos coelhos	84	84	84
Nº de fêmeas recuperadas (%)	66 <sup>a</sup> (78,6)	70 <sup>a</sup> (83,3)	16 <sup>b</sup> (19,1)
Nº de Fêmeas férteis (%)*	58 <sup>a</sup> (69,1)	64 <sup>a</sup> (76,2)	14 <sup>b</sup> (16,7)
Período Parasitário (dias)	8,7±1,8 <sup>b</sup> (6-11)	8,8±1,4 <sup>b</sup> (7-11)	10,3±2,1 <sup>a</sup> (8-14)
Período Postura (dias)*	15,1±2,5 <sup>a</sup> (6-18)	14,7±2,2 <sup>a</sup> (9-18)	14,3±3,7 <sup>a</sup> (6-19)
IER*	64,3±10,1 <sup>ab</sup> (28,6-80,7)	66,0±8,6 <sup>a</sup> (33,2-88,2)	58,3±11,9 <sup>b</sup> (37,3-69,8)
% de eclosão* <sup>+</sup>	75,2±32,1 <sup>a</sup> (1-99)	72,1±30,8 <sup>a</sup> (1-99)	58±41,1 <sup>a</sup> (5-99)
Número de larvas	1130,7±1016,6 <sup>a</sup> (0-3262)	1310±1020 <sup>a</sup> (0-3199)	175,2±520,4 <sup>b</sup> (0-2206)

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ( $P<0,05$ ).

IER: Índice de Eficiência Reprodutiva, segundo Bennet (1974)

\*Valores apresentados como: média aritmética ± desvio padrão (amplitude entre parênteses)

<sup>+</sup> Não inclui as posturas com 0% de eclosão

**Tabela 3.** Parâmetros biológicos e reprodutivos de fêmeas de *Rhipcephalus sanguineus*. As fêmeas foram mantidas a 32±1°C e 80±5%UR antes da infestação (período em jejum) e a 27±1°C e 80±5%UR para a fase reprodutiva, após se alimentarem em coelhos domésticos (período parasitário).

Parâmetros biológicos	Idade dos carrapatos adultos (número de dias em jejum) antes de serem infestados nos coelhos		
	3	20	94
Nº de fêmeas expostas aos coelhos	84	84	84
Nº de fêmeas recuperadas (%)	70 <sup>a</sup> (83,3)	68 <sup>a</sup> (80,9)	3 <sup>b</sup> (3,6)
Nº de fêmeas férteis	64 <sup>a</sup> (76,2)	68 <sup>a</sup> (80,9)	0 <sup>b</sup> (0)
Período Parasitário (dias)*	8,9±2,1 <sup>a</sup> (7-16)	9,3±1,7 <sup>a</sup> (7-13)	8,7±1,2 <sup>a</sup> (8-10)
Período Postura (dias)*	13,9±2,9 <sup>b</sup> (2-22)	15,2±2,6 <sup>a</sup> (9-21)	-
IER*	61,3±11,4 <sup>b</sup> (1,6-77,6)	65±9,3 <sup>a</sup> (6,5-95,4)	-
% de eclosão* <sup>+</sup>	91±30,5 <sup>a</sup> (1-99)	67,9±32,7 <sup>b</sup> (1-99)	-
Número de larvas	1033,4±856,8 <sup>a</sup> (0-2555)	1183,5 <sup>a</sup> (0-2934)	-

Valores seguidos de letras diferentes na mesma linha indicam diferenças estatisticamente significantes ( $P < 0,05$ ).

IER: Índice de Eficiência Reprodutiva, segundo Bennet (1974)

\*Valores apresentados como: média aritmética ± desvio padrão (amplitude entre parênteses)

<sup>+</sup> Não inclui as posturas com 0% de eclosão



#### 4. DISCUSSÃO

O presente trabalho mostra que a temperatura na fase de jejum exerce influência significativa na sobrevivência e nos parâmetros subseqüentes a infestação de adultos de *R. sanguineus*. Tanto a temperatura de 18°C como a de 32°C na fase de jejum foram prejudiciais ao carrapato, se comparadas a de 27°C, como demonstrado por Bellato e Daemon (1997a,b).

Ao nosso conhecimento, este é o primeiro estudo sobre a viabilidade de adultos de *R. sanguineus* em três períodos de jejum, mantidos em três temperaturas distintas, e de seus processos subseqüentes. Um único trabalho prévio (BASTOS, 1997b) avaliou somente os parâmetros referentes a infestações de *R. sanguineus* mantidos a 27±1°C e relatou que o período parasitário, embora sem diferença significativa, se prolongou com adultos infestados com mais de 75 dias de jejum. Ainda no estudo de Bastos (1997b), o percentual de recuperação de fêmeas ingurgitadas foi considerado alto para todas as idades, ainda que com 90, 105 e 120 dias os valores tenham sido inferiores aos dos adultos mais jovens. Resultados semelhantes foram observados no presente estudo. Analisando-se o IER, constatou-se que este foi significativamente menor para as fêmeas com 75 dias de idade e pode ser explicada pelo fato de algumas das fêmeas terem realizado posturas com pouco peso. Bastos (1997b) considerou alto os percentuais de eclosão larval obtidos nas infestações com adultos mantidos a 27±1°C, recém mudados (100%) e até 120 dias de jejum (88,13±21,80%), muito embora obtivesse percentuais de fêmeas recuperadas superiores (80% e 62,1%, respectivamente) aos obtidos neste trabalho, além de não apresentar o percentual de fêmeas recuperadas que originaram larvas (% fêmeas férteis).

## 5 CONCLUSÕES

Com base no presente trabalho, pode-se concluir que adultos de *R. sanguineus* mantidos a  $27\pm 1^{\circ}\text{C}$  e  $32\pm 1^{\circ}\text{C}$  por três e 20 dias de jejum são capazes de dar continuidade ao ciclo com maior sucesso. Ao contrário, os indivíduos adultos mantidos a temperatura constante de  $18\pm 1^{\circ}\text{C}$ , que dificilmente serão capazes de estabelecer uma nova população. Propõe-se também que a observação de parâmetros biológicos em estudos desta espécie de ixodídeo se dê até o momento em que se observe 50% de mortalidade, uma vez que a partir deste percentual a viabilidade dos indivíduos é comprometida e, conseqüentemente, sua importância na bioecologia.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BASTOS, A.L. *Aspectos da biologia de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) e Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) em condições de experimentais*. 1997. 56p. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1997a.
- BASTOS, K.M.S. *Ritmo de queda e poder (ou potencial) infestante de Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório*. 1997. 40p. Tese (Doutorado em Parasitologia Veterinária) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1997b.
- BELLATO, V.; DAEMON, E. Efeitos de três diferentes temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.6, n.1, p. 21-27, 1997a.
- BELLATO, V.; DAEMON, E. Influência da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.6,n.1, p. 15-19, 1997b.
- BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini). *Acarologia*, v. 16, p. 1652-1661, 1974.
- BUSTAMANTE, M.E. Una nueva rickettsiosis en Mexico- Existencia de La Fiebre Manchada Americana en los Estados de Sinaloa y Sonora. *Revista Del Instituto de Salubridad y Enfermidades Tropicales*, Tomo IV, n. 3, p. 189-211, 1943.
- COELHO, C.F. *Biologia da fase não parasitária de Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) sob condições de laboratório: aspectos da oviposição*.1993. 52p. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1993.
- COUTINHO, M.T.Z.; BUENO, L.L.; STERZIK, A.; FUJIWARA, R.T.; BOTELHO, J.R.; DE MARIA, M.; GENARO, O.; LINARDI, P.M. Participation of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the epidemiology of canine visceral leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, v.128, p. 149-155, 2005.
- CUNHA, D.W. *Estudos da toxicidade de alguns carrapatos comumente encontrados no Brasil (Acarina: Ixodidae)*. Dissertação (Mestrado em Parasitologia Veterinária) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Itaguaí, 1978.
- DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S.P; FIGUEREDO, L.A.. Primeira descrição de parasitismo humano por *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) no Brasil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.38, supl. 1, p. 411-415, 2005.
- DAVEY, R.B. Effect of age of *Boophilus microplus* larvae (Acari: Ixodidae) on attachment to cattle. *Journal of Medical Entomology*, v. 24, n. 1, p. 118-120, 1987.
- DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.D.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D.; BLAU, D.M.;

EREMEEVA, M.E.; DASCH, G.A.; LEVIN, M.L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S.R.; CHEEK, J.E.; SWERDLOW, D.L.; MCQUISTON, J.H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *The New England Journal of Medicine*, v.353, n. 6, p. 587-594, 2005.

FELDMAN-MUHSAN, B. Laboratory colonies of *Rhipicephalus*. *Bull. Wed. Helth. Org.*, v. 31, p. 587-589, 1964.

GAUSS, C.L.B.; FURLONG, J. Comportamento de larvas infestantes de *Boophilus microplus* em pastagens de *Brachiaria decumbens*. *Ciência Rural*, v. 32, n.3, p. 462-472, 2002.

GLADNEY, W.J.; DRUMMOND, R.O.; WHETSTONE, T.M.; ERNST, S.E. Effect of age on the attachment rate of the parasitic stages of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Linnaeus) (Acarina: Ixodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, v.7, n.1, p. 92-95, 1970.

GODDARD, J. Focus of human parasitism by brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*, v.26, n.6, p. 628-629, 1989.

GUGLIELMONE, A.A., ESTRADA-PEÑA, A., KEIRANS, J.E., ROBBINS, R.G., 2003. *Ticks (Acari: Ixodidae) of the Neotropical zoogeographic region*. In: Special Publication International Cons. Ticks Tick-Borne Dis-2. Atalanta, Houten, The Netherlands, 173 pp.

GUGLIELMONE, A.A.; MANGOLD, A.J.; VINABAL, A.E. Ticks (Ixodidae) parasiting humans in four provinces of north-western Argentina. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v.85, n. 5, p. 539-542, 1991.

HOOGSTRAAL, H. Ticks, p 347-369. In: Gaafar, S.M., Howard, W.E.; Marsh, R.E. Eds. *Parasites, pests and predators*. Netherlands: Elsevier Sci. Publ. Co., Amsterdam, 1985, 575p.

LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C. Carrapato em cães no Brasil. *Clínica Veterinária*, n.30, p. 24-32, 2001.

LARANJA, R.J. *O poder infestante da larva de Boophilus microplus (Canestrini, 1887) em diferentes condições e períodos de envelhecimento*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 30p, 1979.

MANGOLD, A.J.; BARGUES, M.D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, v.84, n.6, p.478-484, 1998.

NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F. ; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the kanroo paralysis ticks (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, n. 3, p.215-224, 1971.

PAUL, C.F.; KAPOOR, D.; PERITI, S.C. Studies on the life-history and development of ticks. *Labdev. J. Sci.*, n. 8, v. 2, p. 80-83, 1970.

PEREZ, M., RIKISHA, Y., WEN, B. Ehrlichia canis-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *Journal of Clinical Microbiology*, v.34, p.2133–2139, 1996.

RIBEIRO, A.L.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Estudo das variações morfológicas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) no Brasil. *Revista da Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 18, p. 25-33, 1996.

SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002, 265p.

SARDEY, M.R.; RAO; S.R. Observations on the life-history and bionomics of *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) under different temperatures and humidities. *Indian Journal of Animal Sciences*, v. 43, n. 9, p. 867-869, 1973.

SARTOR, A.A.; CUNHA, D.W.; DAEMON, E. Aspectos da biologia de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae) em condições de laboratório: fase não parasitária de larvas e ninfas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.18, n.1, p. 14-17, 1996.

SRIVASTAVA, S.C.; VARMA, M.G.R. The culture of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Ixodidae) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, v. 1, n. 2, p. 154-157, 1964.

SUTHERST, R.W.; BOURNE, A.S. The effect of desiccation and low temperature on the viability of eggs and emerging larvae of the tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini) (Ixodidae). *International Journal for Parasitology*, n.36, p. 193-200, 2006.

SWEATMAN, G.K. Physical and biological factors affecting the longevity and oviposition of engorged *Rhipicephalus sanguineus* females ticks. *The Journal of Parasitology*, v. 53, n.2, p. 432-445, 1967.

UNVER, A., PEREZ, M., ORELLANA, N., HUANG, H., RIKISHA, Y. Molecular and antigenic comparison of *Ehrlichia canis* isolates from dogs, ticks, and a human in Venezuela. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 39, p. 2788–2793. 2001.

WALKER, A.R.; BOUATTOR, A.; CAMICAS, J.L.; ESTRADA-PENA, A.; HORAK, I.G.; LATIF, A.A.; PEGRAM, R.G.; PRESTON, P.M. 2003 *Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species*. . In: Special Publication International Cons. Ticks Tick-Borne Dis-2. Atalanta, Houten, The Netherlands, 221pp.

WIKSWO, M.E.; HU, R.; METZGER, M.E.; EREMEEVA, M.E. Detection of *Rickettsia rickettsii* and *Bartonella henselae* in *Rhipicephalus sanguineus* Ticks from California. *Journal of Medical Entomology*, v. 44, n. 1, p. 158-162, 2007.

YODER, J.A.; BENOIT, J.B.; RELLINGER, E.J.; TANKH, J.L. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the new Rocky Mountain spotted fever vector, *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology*, v.20, p. 365–372, 2006.

## ANEXOS

ANEXO A: certificado da Comissão de Bioética da FMVZ/USP.

ANEXO B: Título de anticorpos encontrados na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em cães infectados por *R. rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1) e de alimentação de carrapatos infectados (Grupo 2) no dia 0.

## ANEXO A



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

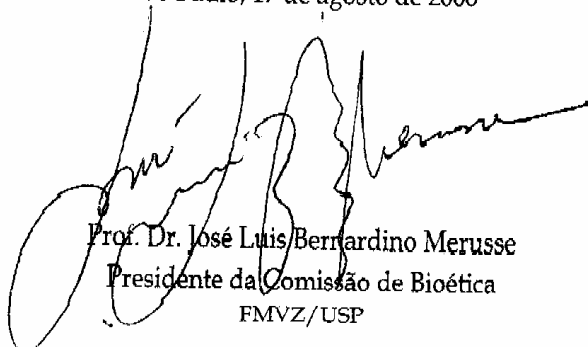
Comissão Bioética

## CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Avaliação da transmissão experimental de *Rickettsia rickettsii* por *Rhipicephalus sanguineus* em cães (*Canis familiaris*)", protocolado sob o nº913/2006, utilizando 40 (quarenta) coelhos, 08 (oito) cães e 240 (duzentos e quarenta) cobaias, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Bioética da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 16/08/06".

(We certify that the Research "Experimental transmission of *Rickettsia rickettsii* by *Rhipicephalus sanguineus* feeding on dogs", protocol number 913/2006, utilizing 248 (two hundred and forty eight) animals, under the responsibility of Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by Bioethic Commission of the School of Veterinary Medicine and Zootechny of University of São Paulo and was approved in the meeting of the day 08/16/2006).

São Paulo, 17 de agosto de 2006



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

## ANEXO B

Título de anticorpos encontrados na reação de imunofluorescência indireta (RIFI) em cães infectados por *R. rickettsii* através de inoculação via intraperitoneal (Grupo 1) e de alimentação de carrapatos infectados (Grupo 2) no dia 0. Os animais do grupo controle não foram reativos no teste.

Grupo / Cão	Dias após a infecção de <i>R. rickettsii</i>										
	0	4	6	10	16	24	30	44	58	72	
1	A	-	1:64	1:512	1:1024	1:16384	1:32768	1:32768	1:8192	1:8192	1:8192
	B	-	1:64	1:128	1:512	1:4096	1:16384	1:16384	1:32768	1:16384	1:16384
	C	-	1:64	1:2048	1:2048	1:32768	1:65536	1:65536	1:16384	1:16384	1:8192
2	D	-	-	-	1:512	1:32768	1:16384	1:16384	1:16384	1:8192	1:4096
	E	-	-	1:128	1:2048	1:2048	1:8192	1:8192	1:16384	1:16384	1:16384
	F	-	-	1:256	1:8192	1:8192	1:8192	1:8192	1:16384	1:16384	1:32768

Grupo / Cão	Dias após a infecção de <i>R. rickettsii</i>								
	86	100	114	128	142	156	170	180	
1	A	1:8192	1:8192	1:8192	1:4096	1:4096	1:4096	1:4096	1:4096
	B	1:16384	1:16384	1:8192	1:8192	1:8192	1:8192	1:8192	1:4096
	C	1:8192	1:8192	1:4096	1:4096	1:4096	1:4096	1:4096	1:2048
2	D	1:4096	1:4096	1:4096	1:4096	1:2048	1:2048	1:2048	1:2048
	E	1:16384	1:32768	1:32768	1:8192	1:8192	1:8192	1:8192	1:4096
	F	1:32768	1:32768	1:32768	1:8192	1:8192	1:8192	1:8192	1:8192